

# VNIVERSITATĪ VALÈNCIA

Departamento de Fisiología



## **Pterostilbeno, un polifenol natural con efectos antitumorales mediados por la permeabilización de la membrana lisosomal**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

**María L. Rodríguez Romero**

Dirigida por:

**Dr. Ángel L. Ortega Valero**

**Dr. José M. Estrela Arigüel**

**Dr. Salvador Mena Mollá**

**Valencia, 2014**



Don Ángel L. Ortega Valero, Doctor en Biología y profesor contratado doctor del Departamento de Fisiología de la Universidad de Valencia.

Don José M<sup>a</sup> Estrela Arigüel, Doctor en Medicina y catedrático del Departamento de Fisiología de la Universidad de Valencia.

Don Salvador Mena Mollá, Doctor en bioquímica por la Universidad de Valencia y técnico Superior del Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM)-Universitat Politècnica de València.

CERTIFICAN:

Que María L. Rodríguez Romero, Licenciada en Farmacia por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo nuestra dirección la presente tesis titulada:

**“Pterostilbeno, un polifenol natural con efectos antitumorales mediados por la permeabilización de la membrana lisosomal.”** Para la obtención de título de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia, Junio de 2014.

Fdo. Ángel L. Ortega Valero

Fdo. Salvador Mena Mollá

Fdo. José M<sup>a</sup> Estrela Arigüel



***A mi familia***



# AGRADECIMIENTOS

---

Parece que fue ayer la primera vez que entré por la puerta de este departamento para solicitar una beca de colaboración y... aquí estoy, casi seis años después, a punto de convertirme en doctora, por fin!!! Quién me lo iba a decir a mí... Sin embargo, este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda y el apoyo de mucha gente a la que ahora, en agradecimiento, quiero dedicar unas palabras.

Quiero dar las gracias de manera especial a mis directores de tesis. Al *Dr. José M<sup>a</sup> Estrela Arigüel*, que me brindó la oportunidad de entrar en su grupo de investigación y ha sido un excelente maestro. Al *Dr. Ángel Ortega*, gracias por tu absoluta dedicación, tu apoyo incondicional, tu optimismo, tu buen humor y tus ganas de trabajar, que, sin lugar a duda, se contagian y han hecho que disfrute de mi trabajo, y mil gracias por esta portada de tesis tan maravillosa y tan bonita!! Eres tan gracioso y tan artista!! Al *Dr. Salvador Mena* gràcies per ser el millor mestre, per ensenyar-me no sols a treballar al laboratori sinó a raonar i saber el perquè de les coses, i per ajudar-me incondicionalment sempre que ho he necessitat.

Gracias también a todos los miembros de mi grupo de investigación. Al *Dr. Julián Carretero*, gracias por ser el primero en darme la oportunidad de conocer este mundillo científico con esa maravillosa beca de colaboración, y gracias por tener siempre la puerta abierta para cualquier cosa que he necesitado (esta tesis no la puedes odiar, eh!). Al *Dr. Miguel Asensi*, gracias por la ayuda que me has ofrecido durante todos estos años, y por tus lecciones sobre ciencia (fisiológica y polifenólica) y sobre la vida misma, además, solo tú tienes el poder de hacer funcionar el masas!! A mi "*puli*", gracias por ser mi compañera y mi amiga, gracias por tu paciencia, por tu sonrisa, tu apoyo y tu ánimo. No dejes de luchar, porque sé que en la vida y en tu carrera te espera un enorme éxito. Gracias también a los miembros más jóvenes del grupo: *Dan*, eres un tío grande y único, llegarás lejos; *Juanlu*, gracias por saber arrancarme siempre una sonrisa y por ser tan, tan, tan gracioso!; *Toni*,

ànim amb la tesis i moooooolta paciència, tu ja saps perquè ho dic; *Mariam y Paula* gracias por vuestro compañerismo y por ser tan majas!!

Por supuesto quiero dar las gracias a todos y cada uno de mis compañeros del departamento: a los demás componentes de "fisiologascachondas.com", el *Dr. Salva Pérez*, la "casi post-doc" *Ana Martínez y Isabel Torres* (Chabe para los amigos), gracias por todos esos momentos maravillosos que hemos pasado juntos dentro y fuera del laboratorio en esas cenas míticas!!! Quiero dar las gracias también al *Dr. Javier pereda* y a *Pain*, al *Dr. Juan Sastre*, al *Dr. Javier Miranda*, a la *Dra. Chelo Burguete*, a la *Dra. Teresa Jover*, al *Dr. Jose M<sup>a</sup> Centeno*, a *Salvador Banacloche* y como no, a *Pilar*, mi secre favorita. Gracias a vosotros y a todas aquellas personas que han pasado por el departamento y que me han hecho sentir como si formara parte de una gran familia!! Sin todos vosotros este duro viaje no hubiera sido igual!!

Pero sin duda, a quien realmente tengo que darle las gracias por el apoyo incondicional, la confianza y el cariño que siempre me han dado es mi familia. Esta tesis también es cosa vuestra!!!! Papá, Mamá, gracias por creer que soy una persona capaz y que puedo conseguirlo, gracias por vuestras palabras y sabios consejos, gracias por estar siempre a mi lado, gracias por quererme y apoyarme incondicionalmente en todo lo que hago. La tesis, como todos los logros de mi vida os la debo a vosotros. Gracias también a mi hermana, palomita, palomita, que haremos contigo?? Gracias por tu cariño incondicional de hermana y por esas risas que nos echamos!! Te quiero tal como eres, aunque a veces sea difícil!! Estoy orgullosa de ti!!

Finalmente, aunque no en importancia, quiero dar las gracias a Jorge. Gracias por estar a mi lado en esta última etapa, la más dura, apoyándome, devolviéndome la confianza en mí misma cuando la pierdo, soportando mis cambios de humor y haciéndome sonreír. Gracias por ser como eres.

A todos los citados y a los que olvidé citar, de verdad, muchísimas gracias!!

# ÍNDICE

---

LISTA DE ILUSTRACIONES .....	1
LISTA DE FIGURAS.....	3
LISTA DE TABLAS.....	5
ABREVIATURAS.....	7
INTRODUCCIÓN .....	9
1. POLIFENOLES NATURALES .....	11
1.1. Origen, clasificación y estructura química .....	11
1.1.1. Ácidos fenólicos.....	12
1.1.2. Flavonoides.....	13
1.1.3. Taninos .....	16
1.1.4. Lignanos.....	18
1.1.5. Estilbenos .....	19
1.2. Propiedades terapéuticas .....	20
1.2.1. Polifenoles y enfermedades cardiovasculares .....	21
1.2.2. Polifenoles y enfermedades neurodegenerativas .....	22
1.2.3. Polifenoles y cáncer.....	23
1.3. Biodisponibilidad de los Polifenoles.....	25
1.3.1. Absorción.....	26
1.3.2. Metabolismo .....	27
1.3.3. Transporte en plasma y captación por los tejidos .....	31
1.3.4. Eliminación .....	31
1.3.5. Efectos biológicos de los metabolitos .....	34
1.3.6. Mejora de la biodisponibilidad de los polifenoles .....	34
2. CÁNCER .....	37
2.1. Conceptos generales .....	37

2.2. Epidemiología.....	38
2.3. Causas .....	40
2.4. Naturaleza biológica de cáncer .....	43
2.4.1. Aspectos genéticos y epigenéticos del cáncer .....	46
2.4.1.1. Proto-oncogenes y oncogenes .....	46
2.4.1.2. Genes supresores de tumores .....	47
2.4.1.3. Micro-ARNs .....	49
2.4.1.4. Mecanismos epigenéticos.....	50
2.4.2. Telómeros y cáncer .....	51
2.4.3. Alteración del metabolismo celular.....	52
2.4.4. Alteraciones del ciclo celular .....	53
2.4.4.1. Senescencia .....	58
2.4.5. Alteración de los procesos de muerte celular .....	58
2.4.5.1. Apoptosis .....	59
2.4.5.2. Autofagia .....	63
2.4.5.3. Necrosis y necroptosis .....	67
2.4.5.4. Muerte celular lisosomal.....	68
2.4.6. Papel de Hsp70 en el cáncer.....	72
2.5. Adaptación tumoral al tratamiento oncológico .....	74
3. LOS POLIFENOLES NATURALES EN LA TERAPIA CONTRA EL CÁNCER	77
3.1. Quimioterapia y radioterapia.....	77
3.2. Bioterapia .....	80
3.3. Melanoma .....	81
3.4. Cáncer colorrectal .....	83
3.5. Cáncer de pulmón .....	86
3.6. Otros cánceres .....	87

4. EL PTEROSTILBENO, UN ANÁLOGO NATURAL DEL RESVERATROL, EN LA TERAPIA CONTRA EL CÁNCER .....	88
4.1. Origen, clasificación y estructura química .....	88
4.2. Biodisponibilidad del pterostilbeno vs. resveratrol .....	90
4.3. Toxicidad .....	92
4.4. Aplicaciones biomédicas del pterostilbeno.....	93
4.4.1. Actividad antioxidante y antiinflamatoria .....	94
4.4.2. Actividad antitumoral .....	96
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	99
MATERIAL Y MÉTODOS .....	105
1. Sustrato biológico .....	107
2. Polifenoles naturales .....	107
3. Inhibidores .....	108
4. Controles positivos .....	109
5. Cultivos celulares .....	110
6. Estudio de proliferación y viabilidad celular .....	111
7. Estudio de la citotoxicidad celular: Método de la sulforodamina B	112
7.1. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC50) .....	113
8. Análisis de distribución del ciclo celular .....	114
9. Determinación de la incorporación de 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU).....	116
10. Estudio de la muerte celular por microscopía automatizada de fluorescencia.....	117
10.1. Preparación de la muestra .....	118
10.2. Captura y análisis de imagen.....	118
11. Detección de apoptosis por microscopía óptica de fluorescencia.	120
12. Determinación de la actividad caspasa-3/7 .....	121
13. Análisis de proteínas mediante <i>Western Blot</i> .....	122

13.1. Extracción de proteínas.....	122
13.2. Electroforesis y transferencia de proteínas .....	123
13.3. Inmunodetección .....	123
14. Determinación de la actividad LDH.....	125
15. Detección de autofagia por microscopía confocal.....	127
15.1. Transfección transitoria de las células tumorales humanas .	127
15.2. Tratamiento celular, preparación de la muestra para microscopía confocal y análisis de imagen. ....	129
16. Visualización lisosomal por tinción de células vivas con <i>Lysotracker®</i> <i>red</i> .....	129
17. Detección de la relocalización del naranja de acridina por citometría de flujo .....	130
18. Inmunocitoquímica .....	131
19. Determinación de la actividad cisteín y aspartil catepsina .....	133
20. Silenciamiento génico de Hsp70 (Hsp72) .....	135
21. Análisis de PTER y sus metabolitos por UPLC-MS/MS .....	137
22. Análisis estadístico .....	141
RESULTADOS .....	143
1.COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS ANTITUMORALES DEL PTEROSTILBENO Y EL RESVERATROL.....	145
1.1. Efectos citotóxicos del pterostilbeno en comparación con el resveratrol.....	145
1.2. Efecto citostático del pterostilbeno en comparación con el resveratrol: Alteración del ciclo celular y de la síntesis de ADN ....	147
2. ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR EL PTEROSTILBENO.....	150
2.1. Apoptosis.....	151
2.1. Necrosis.....	159
2.2. Autofagia .....	164

3. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LA PERMEABILIZACIÓN DE LA MEMBRANA LISOSOMAL EN LA CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR EL PTER.....	168
3.1. Silenciamiento de Hsp70, un protector de la membrana lisosomal .....	176
4. METABOLISMO CELULAR DEL PTEROSTILBENO .....	181
DISCUSIÓN .....	187
1. Acción antitumoral del pterostilbeno vs resveratrol .....	190
1.1. Efecto citotóxico.....	190
1.2. Efecto citostático.....	191
2. Mecanismos de muerte celular inducidos por el pterostilbeno .....	193
3. El pterostilbeno induce alteraciones lisosomales.....	199
3.1. Papel de Hsp70, un inhibidor de la permeabilización de la membrana lisosomal, en el efecto citotóxico del pterostilbeno....	202
4. Efecto del metabolismo celular del pterostilbeno en su acción antitumoral .....	204
CONCLUSIONES .....	207
BIBLIOGRAFÍA .....	211



# LISTA DE ILUSTRACIONES

---

<b>Ilustración 1:</b> Estructura química de los ácidos fenólicos y sus derivados.....	13
<b>Ilustración 2:</b> Estructura química de los flavonoides .....	16
<b>Ilustración 3:</b> Estructura química de los lignanos .....	19
<b>Ilustración 4:</b> Estructura química de los estilbenos .....	20
<b>Ilustración 5:</b> Biodisponibilidad de los Polifenoles (PFs).....	33
<b>Ilustración 6:</b> Número de nuevos casos y de muertes por cáncer en el mundo. Fuente: GLOBOCAN 2008 (IARC) ( <a href="http://globocan.iarc.fr/">http://globocan.iarc.fr/</a> ).....	39
<b>Ilustración 7:</b> Incidencia de cáncer de pulmón en el mundo en ambos sexos. Fuente: GLOBOCAN 2008 (IARC) ( <a href="http://globocan.iarc.fr/">http://globocan.iarc.fr/</a> ).....	41
<b>Ilustración 8:</b> Características de las células tumorales. Adaptado de (Hanahan and Weinberg, 2011).....	45
<b>Ilustración 9:</b> Fases del ciclo celular (Weinberg, 2007).....	54
<b>Ilustración 10:</b> Control del ciclo celular (Weinberg, 2007) .....	57
<b>Ilustración 11:</b> Regulación de la apoptosis (Favaloro et al., 2012) .....	62
<b>Ilustración 12:</b> Proceso autofágico (Mackeh et al., 2013) .....	66
<b>Ilustración 13:</b> Muerte celular lisosomal. Adaptado de (Boya and Kroemer, 2008). LMP: Permeabilización de la membrana lisosomal.....	71
<b>Ilustración 14:</b> Estructura química del RESV vs. PTER.....	89
<b>Ilustración 15:</b> Líneas celulares utilizadas cultivadas <i>in vitro</i> durante 48h ..	107
<b>Ilustración 16:</b> Ejemplo de curva para determinar la IC50 .....	114
<b>Ilustración 17:</b> Histograma del ciclo celular obtenido por citometría de flujo .....	115
<b>Ilustración 18:</b> Hidrólisis proteolítica del sustrato de las caspasas-3/7 (Z-DEVD) <sub>2</sub> -Rh11 .....	121
<b>Ilustración 19:</b> Reacción enzimática acoplada para la detección de la actividad LDH .....	126
<b>Ilustración 20:</b> Esquema de la transfección con Lipofectamina LTX .....	128

<b>Ilustración 21:</b> Esquema de la determinación de la actividad catepsina .....	134
<b>Ilustración 22:</b> Esquema de la preparación de muestras para el análisis por UPLC-MS/MS .....	139
<b>Ilustración 23:</b> Gradiente de elución: % de B (MetOH).....	140

# LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1:</b> Efecto del PTER y el RESV en el crecimiento tumoral <i>in vitro</i> . .....	146
<b>Figura 2:</b> Efecto del PTER y el RESV en la distribución del ciclo celular. ....	148
<b>Figura 3:</b> Efecto del PTER y el RESV en la síntesis del ADN. ....	150
<b>Figura 4:</b> Inducción de apoptosis .....	152
<b>Figura 5:</b> Inducción de la actividad caspasa-3/7 por el PTER. ....	153
<b>Figura 6:</b> Contribución de la apoptosis dependiente de caspasas a la muerte celular inducida por el PTER. ....	154
<b>Figura 7:</b> Fragmentación de PARP. ....	156
<b>Figura 8:</b> Capacidad del inhibidor pancaspasa Z-VAD-FMK: Fragmentación de PARP. ....	157
<b>Figura 9:</b> Actividad del inhibidor pancaspasa Z-VAD-FMK: % de células apoptóticas. ....	158
<b>Figura 10:</b> Liberación de actividad LDH al medio extracelular. ....	160
<b>Figura 11:</b> Porcentaje de necrosis inducido por el PTER. ....	161
<b>Figura 12:</b> Contribución de la necrosis a la muerte celular inducida por el PTER. ....	162
<b>Figura 13:</b> Capacidad de Nec-1 como inhibidor de necrosis. ....	163
<b>Figura 14:</b> Efecto del PTER en el flujo autofágico: Niveles de LC3 .....	165
<b>Figura 15:</b> Efecto del PTER en el flujo autofágico: niveles de p62/SQSTM1. ....	166
<b>Figura 16:</b> Efecto del PTER en el flujo autofágico. Localización de LC3. ....	167
<b>Figura 17:</b> Tinción lisosomal con <i>LysoTracker</i> . ....	169
<b>Figura 18:</b> Tinción con naranja de acridina .....	171
<b>Figura 19:</b> Inmunofluorescencia de la localización de aspartil y cisteín catepsinas. ....	172
<b>Figura 20:</b> Determinación de la actividad cisteín y aspartil catepsina citosólica vs. total. ....	173

<b>Figura 21:</b> Contribución de las catepsinas en la muerte celular inducida por el PTER. ....	174
<b>Figura 22:</b> Inmunocitoquímica de tubulina tras tratamiento con PTER. ....	175
<b>Figura 23:</b> Niveles basales de la proteína de choque térmico Hsp70. ....	176
<b>Figura 24:</b> Silenciamiento de Hsp70.....	177
<b>Figura 25:</b> Viabilidad celular tras el silenciamiento de Hsp70.....	178
<b>Figura 26:</b> Actividad catepsina tras silenciamiento de Hsp70.....	179
<b>Figura 27:</b> Estudio de la muerte celular inducida por el PTER tras silenciar Hsp70. ....	180
<b>Figura 28:</b> Variación de la cantidad de PTER en función del tiempo de incubación.....	182
<b>Figura 29:</b> Detección por UPLC-MS/MS de PTER y sus metabolitos. ....	184
<b>Figura 30:</b> Ejemplo de cromatogramas obtenidos tras el análisis por UPLC-MS/MS.....	185

# LISTA DE TABLAS

---

<b>Tabla 1:</b> Resumen de anticuerpos utilizados en los ensayos por <i>western blot</i> .....	124
<b>Tabla 2:</b> Resumen de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los ensayos de inmunocitoquímica. ....	132
<b>Tabla 3:</b> Condiciones para la espectrometría de masas. Kiloelectronvoltio (KeV); milibar (mbar) .....	140
<b>Tabla 4:</b> Transiciones seleccionadas. Masa/carga (m/z); Electronvoltio (Ev) .....	141
<b>Tabla 5:</b> IC50 de PTER y RESV para las cuatro líneas tumorales <i>in vitro</i> . ....	147



# ABREVIATURAS

---

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AIF</b>	Factor inductor de apoptosis
<b>AP-1</b>	Proteína activadora 1
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>BrdU</b>	5-Bromo-2'-deoxiuridina
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CDK</b>	Quinasa dependiente de ciclinas
<b>CHX</b>	Cicloheximida
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>CURC</b>	Curcumina
<b>DISC</b>	Complejo de señalización inductor de muerte
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTT</b>	1,4-Ditiotreitol
<b>ECVs</b>	Enfermedades cardiovasculares
<b>EDTA</b>	Ácido Etilendiaminotetracético
<b>EGCG</b>	Epigallocatequina-3-galato
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>EGTA</b>	Ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetil)-N,N,N',N'-teraacético
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>Hsp</b>	Proteína de choque térmico
<b>IAPs</b>	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
<b>IC50</b>	Concentración inhibitoria 50
<b>IP</b>	Yoduro de propidio
<b>LAMP-2</b>	Proteína 2 asociada a la membrana lisosomal
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>MDR</b>	Multirresistencia a fármacos
<b>MetOH</b>	Metanol
<b>miARN</b>	Micro-ARN
<b>MMP-9</b>	Metaloproteinasa-9
<b>MnSOD</b>	Manganeso superóxido dismutasa

<b>MRP</b>	Proteínas de multirresistencia a fármacos
<b>mTOR</b>	<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
<b>ncARNs</b>	ARNs no codificantes
<b>Nec-1</b>	Necrostatina-1
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear κB
<b>Nrf2</b>	Factor relacionado con el factor nuclear eritroide-2
<b>O.M.S</b>	Organización mundial de la salud
<b>PARP</b>	Proteína poli ADP-ribosa polimerasa
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PFA</b>	Parafolmaldehído
<b>PI3K</b>	Fosfatidil-inositol 3-quinasa
<b>PTER</b>	Pterostilbena
<b>PTER-GLU</b>	Pterostilbena glucuronidada
<b>PTER-S</b>	Pterostilbena sulfatada
<b>QUER</b>	Quercetina
<b>RESV</b>	Resveratrol
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute medium
<b>SBF</b>	Suero bovino fetal
<b>SCSIE</b>	Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental de la Universidad de Valencia.
<b>siRNA</b>	ARN de interferencia; <i>small interfering RNA</i>
<b>STAT3</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
<b>SULT</b>	Sulfotransferasa
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>TRAIL</b>	Ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF
<b>UGT</b>	UDP-glucuronosiltransferasa
<b>UPLC</b>	Cromatografía líquida de ultra eficacia
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adhesión vascular 1
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular

# INTRODUCCIÓN

---



# 1. POLIFENOLES NATURALES

---

## 1.1. Origen, clasificación y estructura química

Los compuestos fenólicos, comúnmente denominados polifenoles, son metabolitos secundarios de las plantas que comparten la característica de poseer en su estructura química una o más unidades fenólicas (un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo) (Dai and Mumper, 2010). Se han descrito más de 8000 compuestos fenólicos diferentes. Bajo esta denominación se agrupan desde grandes polímeros polifenólicos como los taninos, hasta moléculas simples como los ácidos fenólicos, que al contener únicamente un grupo fenol no deberían considerarse polifenoles estrictamente hablando (Bravo, 1998; Harborne, 1989; Tome-Carneiro et al., 2013)

Estos compuestos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en su mayoría en forma glicosilada (Tsao, 2010). De hecho, son imprescindibles para la fisiología vegetal pues están implicados en la defensa frente a diferentes tipos de estrés como la exposición a luz ultravioleta, la agresión de patógenos, parásitos o depredadores, la baja fertilidad del suelo, las temperaturas extremas o la sequía (Bravo, 1998).

Prácticamente se hallan en la totalidad de los alimentos procedentes de las plantas (verduras, legumbres, frutas, frutos secos, cereales...), y en bebidas derivadas de ellas (té, vino, cerveza, cacao, café...), y son responsables de muchas de sus propiedades organolépticas y biológicas (Dai and Mumper, 2010).

Los compuestos fenólicos han sido clasificados en función de diferentes criterios como su fuente de origen, su función biológica o su estructura química (Tsao, 2010). Para simplificar su estudio, la clasificación de los mismos en este trabajo se ha realizado de acuerdo al número de anillos fenólicos y a los elementos estructurales que los unen (Dai and Mumper, 2010; Manach et al., 2004). De este modo los

compuestos fenólicos pueden clasificarse en cinco grupos: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, lignanos y estilbenos.

### 1.1.1. Ácidos fenólicos

Son compuestos orgánicos que contienen un anillo fenólico y un ácido carboxílico (**Ilustración 1**). En la naturaleza es habitual encontrar los ácidos fenólicos hidroxilados y unidos por enlaces éster a componentes estructurales de las plantas, a polifenoles más grandes (como los flavonoides), a moléculas orgánicas más pequeñas (glucosa, ácido quínico, ácido málico, ácido tartárico) o a otros productos naturales (como los terpenos), haciendo que sus niveles en forma libre sean muy bajos (Robbins, 2003). Los ácidos fenólicos pueden ser subdivididos en dos clases:

- **Ácidos hidroxibenzoicos:** Contienen siete átomos de carbono distribuidos en un esqueleto C6-C1. El principal ejemplo es el *ácido gálico* presente en el té. Estos compuestos forman parte de estructuras complejas como los taninos hidrolizables (**Ilustración 1**).
- **Ácidos hidroxicinámicos:** Contienen nueve átomos de carbono distribuidos en un esqueleto C6-C3. Básicamente se corresponden con el *ácido p-cumárico*, presente en el aceite de oliva virgen; el *ácido ferúlico*, presente en los granos de los cereales; y el *ácido cafeico*, que se encuentra en muchas frutas como la manzana, la ciruela, el tomate y la uva. Uno de los derivados más conocidos de los ácidos hidroxicinámicos es el *ácido clorogénico*, que proviene de la esterificación del ácido cafeico con ácido quínico. Este compuesto se encuentra en muchas frutas y especialmente, en concentraciones elevadas, en el café. Otro derivado de este tipo de ácidos fenólicos es la *curcumina* (CURC), que contiene dos moléculas de ácido ferúlico unidas por un grupo metileno dando lugar a una  $\beta$ -dicetona. La CURC es un pigmento amarillo que se encuentra

fundamentalmente en la cúrcuma, una especia que da lugar al curry y que se extrae del rizoma de la planta *Curcuma longa* (Goel and Aggarwal, 2010; Manach et al., 2004; Yang et al., 2001) (Ilustración 1).

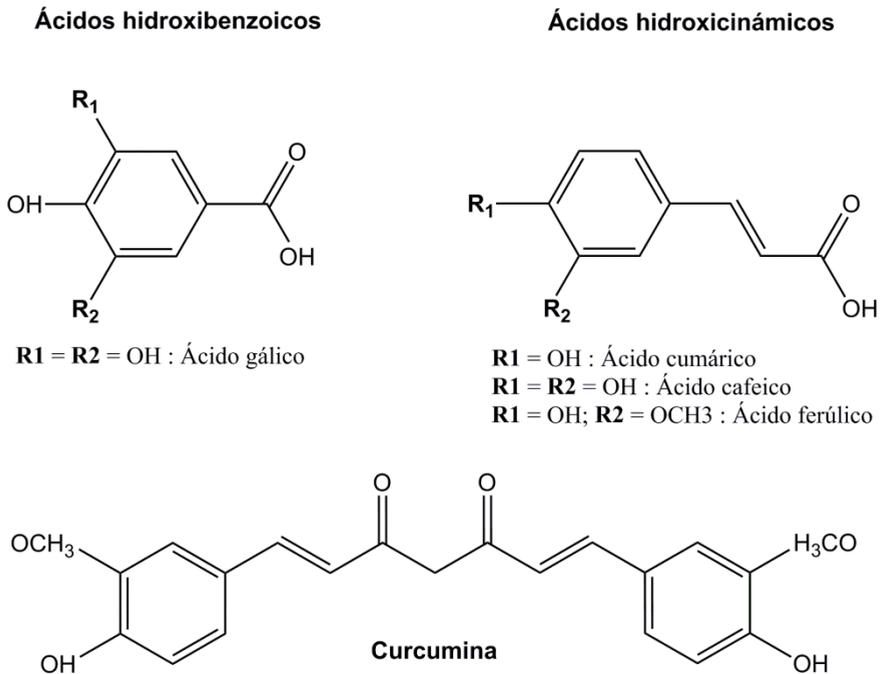


Ilustración 1: Estructura química de los ácidos fenólicos y sus derivados

### 1.1.2. Flavonoides

Los flavonoides representan el grupo de polifenoles más ampliamente distribuido en las plantas, y por lo tanto, más abundantes en nuestra dieta. En la actualidad, se han identificado más de 4000 compuestos diferentes.

Su estructura química común es un difenilpropano (C6-C3-C6), y consta de dos anillos aromáticos (A y B) unidos a través de tres átomos

de carbono que forman un heterociclo oxigenado (anillo C) (**Ilustración 2**).

En las plantas, la mayoría de los flavonoides se encuentran en forma glicosilada asociados a distintos carbohidratos como la glucosa, la ramnosa, la galactosa o la arabinosa. Ocasionalmente se pueden encontrar en forma de aglicona. La actividad biológica de estos compuestos, depende tanto de estos patrones de glicosilación como de sus diferencias estructurales (Tsao, 2010).

Según el estado de oxidación del anillo central, los flavonoides se dividen en 6 grupos:

- **Flavonas:** Sus principales representantes son glicósidos de la *apigenina*, cuyas fuentes en la dieta son el tomillo, las cerezas, el té, las aceitunas, el brócoli, el apio, los brotes de trigo, el perejil y las hojas secas de camomila (Lefort and Blay, 2013); y glicósidos de la *luteolina* que encontramos en el apio, el perejil, la cebolla, las zanahorias, los pimientos, las coles, la piel de la manzana y las flores de crisantemo (Lin et al., 2008) (**Ilustración 2**).
- **Flavonoles:** Son los flavonoides mayoritarios de la dieta. Sus principales representantes son la *quercetina* (QUER) y el *kaempferol*. Generalmente se encuentran en los alimentos en forma glicosilada, siendo la glucosa o la ramnosa los principales azúcares a los que se asocian. La cebolla es el alimento más rico en flavonoles, pero también pueden encontrarse de manera abundante en el brócoli, la manzana, los arándanos, la col rizada o los puerros. También se encuentran en cantidades importantes en el vino tinto. La biosíntesis de estos polifenoles es estimulada por la luz ultravioleta, por lo que su concentración puede variar incluso en dos partes distintas de una misma pieza de fruta o verdura dependiendo de su exposición a la luz solar (Manach et al., 2004) (**Ilustración 2**).
- **Flavanonas:** Aunque se encuentran presentes en los tomates y ciertas plantas aromáticas como la menta, solo se encuentran en

concentraciones elevadas en los cítricos. Las mayoritarias son la *naringenina* presente en el pomelo, la *hesperetina* en las naranjas y el *eriodictiol* en los limones. Como en otras clases de flavonoides, también se encuentran mayoritariamente en su forma glicosilada unidas, en este caso, a la neohesperidosa (como la naringina, glicósido de la naringenina) o a la rutinosa (como la hesperidina, glicósido de la hesperetina) (Chanet et al., 2012; Manach et al., 2004) (**Ilustración 2**).

- **Flavanoles:** Existen en forma monomérica (catequinas) y en forma polimerizada (proantocianidinas o taninos condensados). En contraste con otros flavonoides, los flavanoles no se encuentran glicosilados, sin embargo, sí que los podemos encontrar esterificados con ácido gálico. Las catequinas se encuentran en muchos tipos de frutas como el albaricoque o las cerezas y en el vino tinto, pero sus principales fuentes son el té verde y el chocolate. La catequina y la epicatequina son los principales flavanoles de la fruta, mientras que la galocatequina, epigalocatequina y epigalocatequina-3-galato (EGCG) se encuentran en las uvas y el té. (D'Archivio et al., 2007; Manach et al., 2004) (**Ilustración 2**).
- **Isoflavonas:** Son flavonoides con cierta similitud estructural a los estrógenos. Esto les confiere la habilidad de unirse a los receptores de estrógenos, por lo que consecuentemente son llamados fitoestrógenos. Se encuentran casi exclusivamente en plantas leguminosas, siendo la soja y sus derivados la principal fuente de isoflavonas de la dieta. La *daidceína*, la *genisteína* y la *gliciteína* son las isoflavonas mayoritarias de la soja donde las podemos encontrar, bien en su forma libre (en menor proporción) o bien en su forma glicosilada como glucósidos, malonil-glucósidos y acetyl-glucósidos (Manach et al., 2004; Vacek et al., 2008) (**Ilustración 2**).
- **Antocianinas.** Son pigmentos solubles en agua responsables de los colores rojos, azules y morados de la mayoría de flores, frutas

y vegetales. Generalmente se encuentran en la naturaleza como glicósidos de antocianidinas. La *cianidina*, la *delfinidina* y la *pelargonidina* así como sus derivados metilados, son las antocianinas mayoritarias. Aunque las podemos encontrar en el vino tinto, en ciertas variedades de cereales y en algunos vegetales (berenjena, col, cebolla, rábano...), su principal fuente en la dieta son las frutas, en especial los frutos rojos. Las antocianinas se encuentran fundamentalmente en la piel de las frutas, de hecho, su contenido en los alimentos es proporcional a la intensidad del color (D'Archivio et al., 2007; Manach et al., 2004; Tsao, 2010) (Ilustración 2).

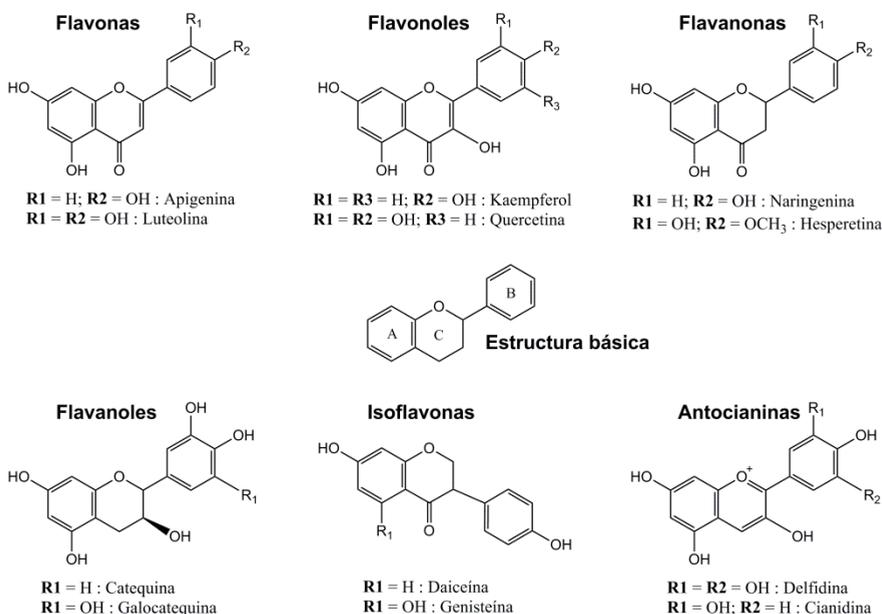


Ilustración 2: Estructura química de los flavonoides

### 1.1.3. Taninos

Los taninos son un grupo de polifenoles con un peso molecular muy alto. Están altamente hidroxilados, por lo que forman complejos

insolubles con carbohidratos y proteínas. Se subdividen en dos grandes grupos, *taninos hidrolizables* y *taninos condensados*. Existe un tercer grupo de taninos, los *florotaninos*, que se encuentran únicamente en algas del *Phyllum Phaeophyta* (algas pardas) (Bravo, 1998).

- **Taninos hidrolizables:** Son polímeros heterogéneos formados por el ácido gálico o el ácido hexahidroxidifénico, esterificados con azúcares simples, principalmente con la glucosa. Los derivados del ácido gálico son los **galotaninos**, mientras que los derivados del ácido elágico son los **elagitaninos** (Bravo, 1998). Los galotaninos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, y se consumen a través de la dieta con algunas legumbres como los garbanzos, así como nueces, granadas, almendras, en frutas como el mango y el caqui, en los ruibarbos y en las pacanas (Serrano et al., 2009). Los elagitaninos, sin embargo, están ampliamente distribuidos. Los encontramos en frutos rojos como fresas, frambuesas y moras así como en sus derivados (zumos, mermeladas...); en frutos secos como nueces, pistachos, anacardos o castañas; y en frutas como las granadas o las uvas moscatel. También los encontramos en bebidas como el vino y el whisky envejecidos en barriles de roble, ya que los elagitaninos también se encuentran en la madera de roble. Los principales elagitaninos son la *punicalagina* que encontramos en las granadas, la *sanguiina H-6* en las fresas, la *pedunculagina* en las nueces, y la *vescalagina* y *castalagina* en la madera de roble (Landete, 2011; Larrosa et al., 2010).
- **Taninos condensados o proantocianidinas:** Son dímeros, oligómeros o polímeros de las catequinas. Las proantocianidinas más abundantes en plantas son las **procianidinas** (oligómeros y polímeros de la catequina y la epicatequina), pero no son las únicas ya que también presentan **prodelfinidinas** (oligómeros y polímeros de la galocatequina, la epigalocatequina y la EGCG), y **propelargonidinas** (oligómeros y polímeros de la afzelequina y la epiafzelequina). En general, son responsables del carácter

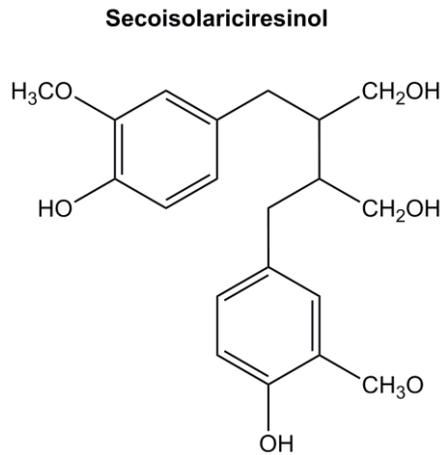
astringente de la fruta (uvas, manzanas, peras, melocotones...) y bebidas como el vino, el té, la sidra o la cerveza y también del sabor amargo del chocolate (D'Archivio et al., 2007; Serrano et al., 2009; Valls et al., 2009)

#### **1.1.4. Lignanos**

Los lignanos son un grupo de polifenoles ampliamente distribuidos en el reino vegetal, formados por la dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropano (dos residuos de ácido cinámico) (**Ilustración 3**). En la naturaleza los lignanos se encuentran mayoritariamente en su forma libre frente a sus derivados glicosilados (Saleem et al., 2005).

Los lignanos más abundantes en las plantas comestibles son: *secoisolariciresinol*, *matairesinol*, *lariciresinol* y *pinoresinol*. La principal fuente de lignanos son las semillas de lino, particularmente ricas en *secoisolariciresinol* aunque también contienen en menor cantidad *matairesinol*, *lariciresinol* y *pinoresinol*. También encontramos lignanos en otras semillas y cereales (sésamo, trigo, mijo, avena, centeno, cebada) y en menor cantidad en legumbres, en la soja, en vegetales (ajo, espárragos, zanahorias, brócoli), en frutas (ciruelas, limones, naranjas) e incluso en bebidas como el vino, el café y el té. Otros lignanos presentes en la dieta son: *medioresinol* (en semillas de sésamo, centeno y en los limones), *syringaresinol* (en granos de cereales), y *sesamina* y *sesamolina* (en las semillas de sésamo) (Manach et al., 2004; Peterson et al., 2010).

Los lignanos se clasifican como fitoestrógenos debido a que algunos de ellos son metabolizados por la microbiota colónica dando lugar a enterolactona y enterodiol, también conocidos como enterolignanos, con mayor actividad biológica que sus precursores (Sok et al., 2009).



**Ilustración 3: Estructura química de los lignanos**

### 1.1.5. Estilbenos

Los estilbenos se caracterizan químicamente por contener dos anillos fenólicos unidos por un enlace etileno, siendo la configuración *trans* la más común (Riviere et al., 2012) (**Ilustración 4**).

En las plantas, los estilbenos actúan como fitoalexinas antifúngicas, es decir, como compuestos antimicrobianos sintetizados en respuesta a infecciones bacterianas o a la luz ultravioleta (Pandey and Rizvi, 2009). En la dieta humana, los estilbenos se encuentran en baja cantidad. El compuesto fenólico más representativo de este grupo es el *resveratrol* (RESV), que existe en los alimentos tanto en su isómero *cis*, como en el *trans*, y mayoritariamente en forma glucosilada (*trans*-piceido). El RESV se encuentra en más de setenta especies vegetales y está presente de manera abundante en los cacahuetes, y en la piel de los frutos rojos y las uvas, lo que contribuye en gran medida a la existencia de RESV en el zumo de uva y el vino tinto. Sin embargo, su contenido es muy bajo. De hecho, la existencia de RESV en el zumo de uva es apenas detectable, y en la mayoría de vinos tintos su presencia es baja e impredecible. Esto último es debido a que como es una fitoalexina su síntesis se inducirá de

forma variable según el tipo de uva, el área geográfica de cultivo... (Tome-Carneiro et al., 2013)

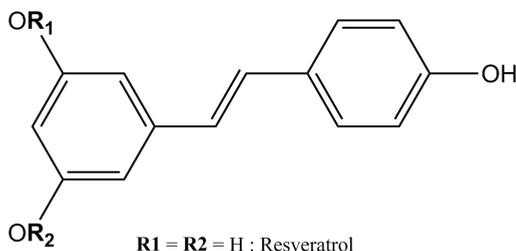


Ilustración 4: Estructura química de los estilbenos

## 1.2. Propiedades terapéuticas

Los polifenoles son los compuestos con capacidad antioxidante más abundantes en la dieta. A pesar de su amplia distribución, sus efectos beneficiosos sobre la salud no llamaron la atención hasta la década de los 90. El principal factor responsable de ello es la variedad y complejidad de sus estructuras químicas (D'Archivio et al., 2007; Dai and Mumper, 2010).

Debido a dichas propiedades antioxidantes, los polifenoles tienen efectos beneficiosos en la prevención y tratamiento de enfermedades relacionadas con el daño oxidativo tales como enfermedades crónicas neurodegenerativas y cardiovasculares, el síndrome metabólico, la diabetes, distintas patologías inflamatorias, el envejecimiento y en la prevención y el tratamiento del cáncer (D'Archivio et al., 2007; Scalbert et al., 2005).

Sin embargo, nuevos hallazgos sugieren que, además de su capacidad antioxidante, los polifenoles actúan a través de una gran variedad de mecanismos de acción independientes de ésta (D'Archivio et al., 2007). Entre ellos se encuentran: la inhibición de diversas enzimas como la telomerasa (Naasani et al., 2003), la ciclooxigenasa (Hussain et al., 2005; O'Leary et al., 2004) y la lipoxigenasa (Sadik et al., 2003;

Schewe et al., 2001); la modulación de vías de transducción de señales (Hou et al., 2004); la interacción con receptores celulares (Chalopin et al., 2010; Pastore et al., 2012); la alteración de la regulación del ciclo celular (Gokbulut et al., 2013) y de la función plaquetaria (Murphy et al., 2003). Debido a esta variedad de efectos biológicos los polifenoles han recibido una especial atención en la última década como potenciales agentes terapéuticos (D'Archivio et al., 2007). Por otro lado, debido a la amplia variedad de modelos experimentales y concentraciones utilizadas, se han descrito tanto efectos protectores como antioxidantes, como efectos pro-oxidantes con capacidad para dar lugar a procesos de muerte celular, lo cual es de gran interés potencial en patologías como el cáncer (Elbling et al., 2005; Lambert et al., 2005).

A pesar de que las propiedades terapéuticas de los polifenoles puedan resultar esperanzadoras en diferentes patologías, no hay que dejarse llevar por una ilusión temprana. En la actualidad, la mayoría de los estudios realizados para evaluar las propiedades terapéuticas de los polifenoles, provienen de estudios *in vitro* o de modelos animales en los que se utilizan concentraciones demasiado elevadas para el uso humano. Aunque dichos estudios sientan los cimientos del conocimiento básico, se está trabajando para que el uso humano de los polifenoles con una función terapéuticas sea una realidad (Asensi et al., 2011).

### **1.2.1. Polifenoles y enfermedades cardiovasculares**

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs), concretamente las enfermedades coronarias y el infarto de miocardio, son una de las principales causas de muerte en los países desarrollados. Aunque los factores de riesgo que favorecen el desarrollo de las ECVs incluyen factores genéticos, tienen un peso muy importante los derivados de la dieta y el estilo de vida (inactividad física, dietas ricas en grasa, fumar...) (Jones, 1999; OMS, 2013; Pereira et al., 2012).

En 1992, se acuñó el término de “paradoja francesa” para referirse al hecho de que en la población francesa la incidencia de enfermedades

cardiovasculares era un 40% más baja que en el resto de Europa a pesar de la dieta rica en grasas saturadas que se consumía en dicho país. Esto fue explicado por el consumo moderado (en comparación con otros países) de vino tinto, rico en polifenoles como RESV o QUER (Criqui and Ringel, 1994; Renaud and de Lorgeril, 1992). Efectivamente, la asociación entre el consumo de alimentos, bebidas ricas en polifenoles y la baja incidencia de ECVs ha sido demostrada posteriormente en diversos estudios epidemiológicos (Dohadwala and Vita, 2009; Iqbal et al., 2008; Joshipura et al., 2001; Lichtenstein et al., 2006; Mursu et al., 2008).

A partir de esos estudios y de otros realizados tanto en humanos como en animales de experimentación, se ha demostrado que los efectos biológicos que ejercen los polifenoles en la prevención las ECVs son: la inducción de las defensas antioxidantes (Rein et al., 2000a; Stein et al., 1999; Wan et al., 2001); la disminución de la presión arterial (Desch et al., 2010; Erlund et al., 2008; Grassi et al., 2005; Park et al., 2004; Taubert et al., 2007a; Taubert et al., 2007b); la mejora de la disfunción endotelial (Engler et al., 2004; Heiss et al., 2005; Papamichael et al., 2004; Wang-Polagruto et al., 2006; Widlansky et al., 2007); la inhibición de la agregación plaquetaria (Erlund et al., 2008; Keevil et al., 2000; Pearson et al., 2002; Rein et al., 2000b); la inhibición de la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL), así como, el aumento de la lipoproteína de alta densidad (HDL) (Mathur et al., 2002; Wan et al., 2001); y la reducción de la respuesta inflamatoria (Fraga et al., 2010; Mao et al., 2002; Pandey and Rizvi, 2009; Vauzour et al., 2010).

### **1.2.2. Polifenoles y enfermedades neurodegenerativas**

Las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la demencia o el Parkinson, son un grupo heterogéneo de desórdenes cognitivos que afectan al sistema nervioso central, incluyendo, el cerebro, la médula espinal, y los nervios periféricos (Ullah and Khan, 2008). La prevalencia de este tipo de afecciones relacionadas con la edad, ha aumentado en los últimos años debido al envejecimiento de la población (de Lau and Breteler, 2006; Sosa-Ortiz et al., 2012).

Las enfermedades neurodegenerativas tienen una etiología multifactorial, lo cual sugiere que la utilización de productos con múltiples dianas terapéuticas, como los polifenoles, podrían ser de gran utilidad en el tratamiento de estas alteraciones (Ullah and Khan, 2008). De hecho, los polifenoles tienen un gran potencial como agentes neuroprotectores por su habilidad para modular procesos de señalización celular, proliferación celular, apoptosis, diferenciación celular y balance redox (Singh et al., 2008).

El consumo regular de alimentos ricos en polifenoles, se asocia a una reducción del 50% en el riesgo de padecer demencia (Commenges et al., 2000), al mantenimiento de la función cognitiva (Letenneur et al., 2007; Morris et al., 2006), al retraso en la aparición de Alzheimer (Dai et al., 2006) y a la reducción del riesgo de padecer Parkinson (Aquilano et al., 2008). Además, el consumo moderado de vino tinto reduce la incidencia de ciertas enfermedades neurológicas como el Alzheimer (Basli et al., 2012).

### **1.2.3. Polifenoles y cáncer**

El cáncer es una enfermedad que se produce por una alteración en el control del crecimiento celular, y en cuya inducción y desarrollo juegan un papel directo y/o indirecto factores medioambientales, químicos, físicos, metabólicos y genéticos.

Hay evidencias epidemiológicas que demuestran que una dieta con un alto consumo de frutas y verduras ricas en polifenoles parece asociarse a una disminución de la incidencia de los cánceres humanos más frecuentes: pulmón, colón, melanoma y mama. Esto sugiere que pueden ser compuestos efectivos y prometedores en la prevención y tratamiento del cáncer debido a su seguridad, baja toxicidad y aceptación general (Neuhouser, 2004). El interés por el estudio de los polifenoles como compuestos anticancerosos radica tanto en su potente acción antioxidante, como en la acción que ejercen sobre gran variedad de funciones biológicas relacionadas con la modulación de la oncogénesis y

la progresión tumoral (Fresco et al., 2006). Por ello, en los últimos años, se han desarrollado una serie de estudios *in vitro* e *in vivo* para determinar la capacidad anticarcinogénica y anticancerígena de los polifenoles (Dai and Mumper, 2010).

En cuanto a los estudios *in vitro*, se han utilizado tanto extractos fenólicos como polifenoles aislados en distintas líneas celulares tumorales. Por ejemplo, se ha demostrado que el extracto de frutos rojos que contiene polifenoles como antocianinas, kaempferol, QUER y ésteres del ácido cumárico y del ácido elágico, produce la inhibición del crecimiento de líneas celulares tumorales como MCF7 (carcinoma de mama), HT-29 (carcinoma de colon) o DU-145 (carcinoma de próstata) entre otras. Este efecto antitumoral es dosis dependiente y la sensibilidad depende de la línea tumoral (Seeram et al., 2006; Zhang et al., 2008). Resultados similares se han obtenido en varias líneas celulares con los polifenoles aislados del vino (RESV, QUER, catequina y epicatequina) (Damianaki et al., 2000; Kampa et al., 2000; Matic et al., 2010), del té verde (Epicatequina, epigallocatequina y EGCG) (Darvesh and Bishayee, 2013; Weisburg et al., 2004) o con la genisteína presente en las isoflavonas de soja, la cual inhibe el crecimiento de varias líneas celulares tumorales incluyendo leucemia, linfoma, próstata, mama, pulmón, cabeza y cuello (Sarkar and Li, 2002).

Además de los estudios *in vitro*, se han llevado a cabo numerosos experimentos *in vivo* para corroborar la eficacia antitumoral de los polifenoles. El modelo murino es con diferencia el más utilizado. La aparición de los tumores en ratones se ha inducido mediante diferentes metodologías como la utilización de agentes químicos, luz ultravioleta o modificación genética, así como xenoinjertos de cáncer de colon, pulmón, mama, hígado, próstata, estómago, esófago, intestino delgado, páncreas y cáncer de piel (Kandaswami et al., 2005; Lambert et al., 2005; Sun et al., 2012; Yang et al., 2002).

Algunos de los mecanismos de acción identificados con todos estos estudios son: actividad estrogénica/antiestrogénica, actividad antiproliferativa, inducción de la parada del ciclo celular y de la

apoptosis, prevención del estrés oxidativo, inducción de enzimas detoxificantes, regulación del sistema inmune, acción antiinflamatoria y cambios en la señalización celular (Pandey and Rizvi, 2009).

Debido al gran número de polifenoles con potencial actividad anticancerígena, actualmente se están llevando a cabo múltiples ensayos clínicos (<http://www.cancer.gov/clinicaltrials>). Algunos de los polifenoles usados en estos ensayos son el RESV, la QUER, la CURC y los flavonoides del té verde como la EGCG.

### **1.3. Biodisponibilidad de los Polifenoles**

La capacidad de los polifenoles para ejercer sus efectos biológicos, depende de su biodisponibilidad (Scalbert and Williamson, 2000). Como biodisponibilidad entendemos:

*“Fracción de la dosis administrada de un fármaco que alcanza la circulación sistémica en su forma inalterada, y por lo tanto, está disponible para acceder a su diana terapéutica.”* (Flórez et al., 2008; Visioli et al., 2011)

La biodisponibilidad de los polifenoles depende de la vía de administración utilizada. En caso de su administración oral, la biodisponibilidad varía entre los diversos polifenoles, siendo, por lo general, bastante baja. De hecho, es muy raro que superen en tejidos una concentración  $\geq 10\mu\text{M}$ . La biodisponibilidad de un fármaco depende de los distintos factores que afectan a su absorción y metabolismo de primer paso, y por lo tanto, el principal factor que influye en ella es la estructura química del compuesto (grado de glicosilación, estructura básica, conjugación con otros polifenoles, peso molecular, grado de polimerización y solubilidad) (Bravo, 1998; Visioli et al., 2011).

En general, el metabolismo de los polifenoles se produce a través de una secuencia de reacciones común para todos ellos, que es similar a la detoxificación metabólica que sufren muchos xenobióticos para

incrementar su hidrofilia y facilitar su eliminación urinaria o biliar (Manach et al., 2004).

### **1.3.1. Absorción**

En la dieta, los polifenoles se encuentran mayoritariamente como polímeros (p. ej. proantocianidinas), como ésteres (ácidos fenólicos), o glicosilados (p. ej. flavonoides y estilbenos), aunque también pueden encontrarse en su forma libre (p. ej. lignanos).

Tras su ingestión por vía oral, determinados polifenoles como la QUER, daidzeína o genisteína, pero no sus glicósidos, pueden ser absorbidos directamente en el estómago (Crespy et al., 2002; Piskula et al., 1999), al igual que algunas antocianidinas (Talavera et al., 2003) o ácidos fenólicos como el ácido clorogénico (Lafay et al., 2006). Sin embargo, el resto de los polifenoles, que en su mayoría resisten la hidrólisis ácida del estómago, llegan intactos al intestino delgado donde son absorbidos de forma mayoritaria.

Los polifenoles que no han sido absorbidos en el intestino delgado, llegan al colon donde son degradados a ácidos fenólicos por la microbiota colónica, metabolizados a derivados del ácido benzoico y, posteriormente, son absorbidos. Este paso es muy importante para cierto tipo de polifenoles como los lignanos o las isoflavonas de soja, puesto que sus metabolitos activos se producen por esta vía (Kim et al., 1998; Rechner et al., 2002; Setchell et al., 2002; Setchell et al., 1981; Visioli et al., 2011).

Los polifenoles en forma glicosilada, donde la molécula de azúcar es denominada glicona y el polifenol unido aglicona, son muy hidrofílicos. Por ello, la eliminación de sus residuos de azúcar es necesaria para su absorción en el intestino delgado por difusión a través de la luz intestinal. Los polifenoles son hidrolizados por enzimas intestinales endógenas humanas como la lactasa-florizina hidrolasa (LPH) (hidrólisis extracelular) o la  $\beta$ -glucosidasa (CBG) (hidrólisis intracelular). Estas enzimas liberan al polifenol (aglicona) de los residuos glicona como, por ejemplo, glucosa,

arabinosa o xilosa. Los residuos de ramnosa no son sustratos para estas enzimas, por lo que los polifenoles unidos a este tipo de residuos han de ser hidrolizados por las  $\alpha$ -ramnosidasas presentes en la microbiota colónica. Las antocianinas representan una excepción porque el glicósido intacto puede ser absorbido en el intestino delgado (Nurmi et al., 2009; Scalbert and Williamson, 2000; Visioli et al., 2011).

En cuanto a los polifenoles esterificados, ni en la mucosa intestinal, ni en el hígado, ni en el plasma existen esterasas, con lo que sólo pueden ser metabolizados por la microbiota colónica, lo cual reduce la eficiencia de su absorción (D'Archivio et al., 2007; Gonthier et al., 2006).

Los polímeros y los oligómeros mayores que los trímeros, como las proantocianidinas, ven limitada su absorción en el intestino delgado debido a su tamaño y su alto peso molecular. Como su absorción es tan baja, ejercen su acción biológica a nivel local en el tracto gastrointestinal (Halliwell et al., 2000; Manach et al., 2004).

Aunque el procesado enzimático de los polifenoles posibilite una mejor absorción y, por tanto, una mayor biodisponibilidad, en algunos casos, el compuesto original (unido al glúcido, al éster o en forma de polímero) es el que posee la actividad biológica. Por tanto este tipo de procesos puede disminuir la bioactividad de algunos polifenoles (Gao and Hu, 2010).

Existen varios factores que pueden modular la absorción intestinal, entre ellos destacan la coexistencia de varios compuestos en el lumen intestinal, la inhibición de la actividad de las enzimas digestivas y/o la alteración de los sistemas de transporte (Asensi et al., 2011; Murota and Terao, 2003).

### **1.3.2. Metabolismo**

Durante el proceso de absorción, los polifenoles sufren reacciones de conjugación en las células intestinales y, posteriormente, en las células hepáticas. Por esta razón, los polifenoles que llegan a la sangre y

a los tejidos son mayoritariamente diferentes a los que se han ingerido por vía oral (Manach et al., 2004).

Aunque algunos polifenoles sufren metabolismo de fase I (p. ej. ejemplo compuestos que contienen dobles enlaces que han de ser reducidos), los polifenoles sufren mayoritariamente procesos de metabolización de fase II. Esto es debido a que al estar altamente hidroxilados, son demasiado hidrofílicos para ser sustratos de las enzimas del sistema citocromo P450 encargadas de los procesos de metabolización de fase I (Chung et al., 2005; Gao and Hu, 2010; Lambert and Yang, 2003; Yang et al., 2001).

De esta forma, los procesos de conjugación a los que son sometidos mayoritariamente los polifenoles son reacciones de fase II, principalmente, metilación, sulfatación y glucuronidación o una combinación de ellas. Estas reacciones facilitan la eliminación de los polifenoles por vía biliar y urinaria al aumentar su hidrofilia (Asensi et al., 2011; Manach et al., 2004). El control de estas reacciones es asumido por enzimas endógenas específicas de cada reacción.

Los procesos de metilación son catalizados por la enzima catecol-O-metil transferasa (COMT). Esta enzima transfiere grupos metilo desde la S-adenosil-L-metionina a polifenoles que contienen un grupo *o*-difenílico como la QUER, luteolina, ácido cafeico, catequina y cianidina. Aunque esta enzima está presente en un gran número de tejidos, su mayor actividad se produce en el hígado y en el riñón (Manach et al., 2004). Poco se sabe acerca de si este tipo de conjugación afecta de forma positiva o negativa a la biodisponibilidad de los polifenoles. Sin embargo, sí se han realizado estudios sobre polifenoles que existen en la naturaleza con grupos metilo en el lugar de los grupos hidroxilo del polifenol del que derivan (Landis-Piwowar and Dou, 2008). A este respecto, mientras algunos estudios indican que la metilación puede aumentar la biodisponibilidad de los polifenoles (p.ej. al comparar el RESV con su análogo estructural dimetoxilado, el Pterostilbeno (PTER) (Ferrer et al., 2005), otros indican una marcada disminución de la misma al verse disminuidos sus efectos biológicos (Asensi et al., 2011) (p.ej. la

metilación suprime el efecto inhibitorio del proteasoma inducido por los polifenoles del té verde (Landis-Piwowar et al., 2007)).

Las sulfotransferasas (SULTs) catalizan la transferencia de un grupo sulfato desde la 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato a los grupos hidroxilo de diversos sustratos, incluidos los polifenoles. Aún no está del todo claro cuáles son las isoformas de estas enzimas implicadas específicamente en la sulfatación de los polifenoles, ni las posiciones concretas en las que se produce este tipo de conjugación (Manach et al., 2004). Lo que sí se conoce es que principalmente se produce en el hígado y que la principal isoforma hepática es la SULT1A1. Se conoce también que la isoforma mayoritaria en el colon es la SULT1A3, y que esta también podría jugar un papel importante en la sulfatación de los polifenoles. Otro factor que puede afectar a la sulfatación, es que hay algunos polifenoles que son capaces de inhibir la actividad de las SULTs (Gao and Hu, 2010; Scalbert and Williamson, 2000).

Las UDP-glucuronosiltransferasas (UGTs) son enzimas de membrana situadas en el retículo endoplasmático de numerosos tejidos. Catalizan la conjugación de los polifenoles con el ácido glucurónico. La glucuronidación de los polifenoles se produce principalmente por la familia UGT1A a nivel intestinal, hepático y renal. Este tipo de conjugaciones tienen lugar en primer lugar en el intestino, contribuyendo al metabolismo de primer paso de los polifenoles, y posteriormente en el hígado (Manach et al., 2004; Scalbert and Williamson, 2000).

La glucuronidación y la sulfatación son las principales rutas de metabolización de los polifenoles. Como los conjugados resultantes son muy hidrofílicos para difundir a través de la membrana plasmática, necesitan ser excretados al espacio extracelular por transportadores de membrana como los MRPs (transportador asociado a las proteínas de multirresistencia a drogas), la Pgp (glicoproteína P), los BCRPs (transportadores asociados a la proteína de resistencia del cáncer de mama), o los OATs (transportadores de aniones orgánicos) (Gao and Hu, 2010).

Los polifenoles contienen múltiples sitios aceptores para estas reacciones. Por ejemplo, un polifenol puede ser metilado y posteriormente glucuronidado o sulfatado en otros grupos funcionales presentes. La secuencia y el grado de estas reacciones depende de varios factores: la **afinidad de la enzima por el sustrato**, esto determina la reactividad y la posición del conjugado; la **disponibilidad de las enzimas y sus cofactores** que a su vez se dependen de la especie, los polimorfismos genéticos, la inducción enzimática, la dieta y el estado metabólico; la **existencia de otros sustratos** que compitan por la misma enzima o deplecionen los niveles de cofactores; y la **concentración del polifenol** que determina el grado de conjugación (Yang et al., 2001). Con respecto a esto último, la sulfatación es generalmente una vía que aunque muestra una mayor afinidad por el sustrato, tiene menor capacidad que la vía de la glucuronidación, por lo tanto, en caso de que la concentración del polifenol sea elevada, se producirá mayoritariamente glucuronidación.

La dosis y la vía de administración utilizada determinan el lugar de metabolización principal. Así, polifenoles administrados a dosis elevadas y/o por vía intravenosa, son metabolizados principalmente en el hígado, mientras que polifenoles administrados a dosis bajas y por vía oral, pueden ser metabolizados por la mucosa intestinal con el hígado como órgano de metabolización secundario (Manach et al., 2004; Scalbert and Williamson, 2000).

El proceso de metabolización es altamente eficiente, de tal forma que en sangre solo encontramos derivados conjugados de los polifenoles y nada o muy baja concentración de los polifenoles en su forma nativa. Esto puede alterar la actividad biológica de los mismos (Manach et al., 2004). Esta extensa metabolización a la que son sometidos y la rápida excreción de los metabolitos producidos son los responsables de la baja biodisponibilidad de los polifenoles (Gao and Hu, 2010).

### 1.3.3. Transporte en plasma y captación por los tejidos

Los polifenoles conjugados o en su forma nativa, circulan por la sangre unidos a proteínas, principalmente a la albúmina. La afinidad de los polifenoles por la albúmina varía según sus estructuras químicas. Esta unión, puede tener consecuencias en su eliminación y en su captación por los tejidos. De hecho, se piensa que la captación es inversamente proporcional a la cantidad de polifenol unido. Lo que no está aún del todo claro es si esta unión puede afectar de forma negativa a los efectos biológicos de los polifenoles, o si por el contrario, los polifenoles unidos a la albúmina son capaces de ejercer dichos efectos, como ocurre en el caso de la QUER (D'Archivio et al., 2007).

Los polifenoles son capaces de penetrar en los tejidos, particularmente en aquellos en los cuales van a ser metabolizados (Intestino e hígado). La determinación de la biodisponibilidad real de los polifenoles en los tejidos es mucho más importante que su determinación en plasma puesto que en ellos es donde van a efectuar sus acciones biológicas. Sin embargo, esto es bastante complejo, de hecho, los datos son muy escasos tanto en humanos como en animales. Los estudios realizados hasta ahora destacan que las concentraciones en plasma de los polifenoles, no se correlacionan con las concentraciones en sus tejidos diana. De hecho, la naturaleza de los metabolitos tisulares puede ser diferente a la de los metabolitos en plasma debido a la captación específica de los mismos o al metabolismo intracelular (D'Archivio et al., 2007; Manach et al., 2004).

### 1.3.4. Eliminación

Los metabolitos de los polifenoles pueden seguir dos vías de excreción: **excreción biliar** y **excreción urinaria**. Los metabolitos extensamente conjugados, son más propensos a ser eliminados por vía biliar, mientras que los metabolitos poco conjugados, como los monosulfatos, son preferentemente eliminados por la orina (Manach et al., 2004).

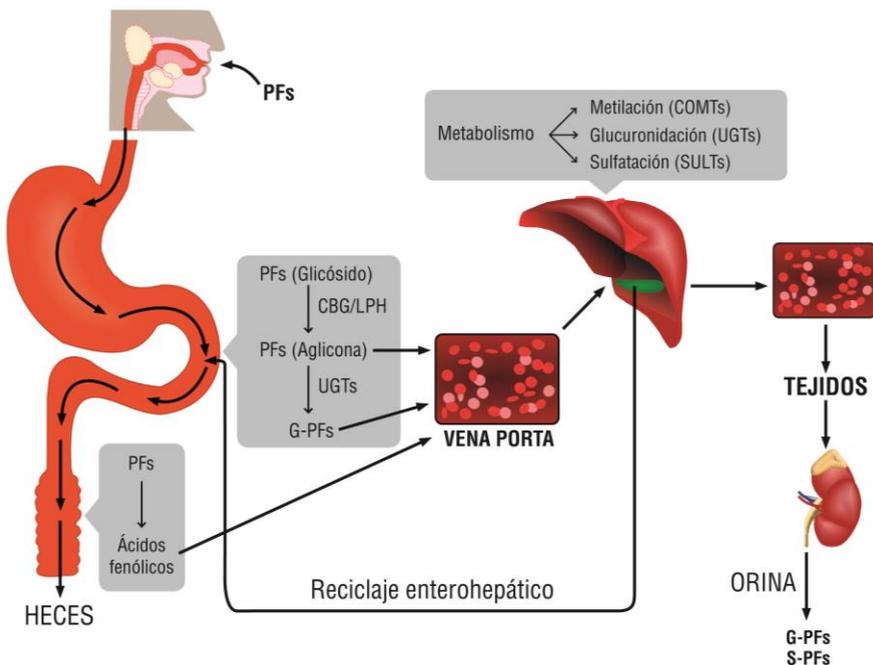
En el caso de la eliminación por vía biliar, los metabolitos, principalmente los glucurónidos, son vertidos en el duodeno desde donde llegan al colon. Allí, son sometidos a la acción de enzimas bacterianas como las  $\beta$ -glucuronidasas que hidrolizan los metabolitos liberándolos en forma de agliconas y los metabolizan a ácidos fenólicos que son reabsorbidos (recirculación enterohepática). Lo mismo ocurre si los polifenoles son metabolizados en el intestino delgado, y excretados directamente al lumen intestinal. Estos procesos dan lugar a que los polifenoles estén más tiempo en el cuerpo. Además de por estas dos vías, los polifenoles pueden ser metabolizados y absorbidos en el colon si no han sido absorbidos en el intestino delgado (Asensi et al., 2011; Manach et al., 2004).

En caso de la eliminación por vía urinaria, la cantidad total de metabolitos excretados se correlaciona con sus concentraciones máximas plasmáticas. Bajas concentraciones de polifenoles en orina son debidas a una pronunciada excreción por vía biliar o a una extensa metabolización (Manach et al., 2004).

La vida media de los polifenoles no se conoce con exactitud, sin embargo, suele ser corta si la absorción es a nivel intestinal (entre 1-4 horas según el polifenol en cuestión), mientras que tras su metabolización y posterior absorción en el colon es mayor. Con respecto a los polifenoles con rápida absorción y baja vida media, para obtener una concentración constante en el plasma, sería necesaria una administración frecuente en el tiempo (Manach et al., 2004).

En resumen, los datos experimentales indican que principalmente los polifenoles son absorbidos en el intestino, donde previamente son hidrolizados liberándose en forma de agliconas que pueden atravesar la barrera intestinal por difusión. Además, algunos polifenoles pueden sufrir metabolismo de fase II durante su absorción, concretamente son glucuronidados por las UGTs intestinales. Estos conjugados más hidrofílicos abandonan el enterocito gracias a transportadores específicos. Esta limitación en su biodisponibilidad puede ser salvada

mediante su administración intravenosa (Wu et al., 2011). Una vez en la circulación sanguínea, los polifenoles alcanzan el hígado donde son rápida y extensamente metabolizados a conjugados metilados, glucuronidados y/o sulfatados. Por ello, la cantidad en sangre en su forma nativa es muy baja. Estos conjugados son exportados a través de transportadores bien a la bilis, o bien a la circulación sistémica donde unidos a la albúmina serán transportados a los distintos tejidos. Los metabolitos localizados en la circulación sistémica y en los tejidos son excretados por vía urinaria. Los conjugados eliminados por vía biliar son vertidos en el duodeno, llegando al colon, donde son vueltos a metabolizar por la microflora bacteriana y reabsorbidos, llegando otra vez a la circulación sistémica. Por lo tanto, a corto plazo (durante la primera hora tras su administración), dependiendo de si su administración es por vía oral o por vía intravenosa, los niveles en sangre de los polifenoles en su forma natural/conjugados, van a ser diferentes (Asensi et al., 2011). Estos procesos se esquematizan en la **Ilustración 5**.



**Ilustración 5: Biodisponibilidad de los Polifenoles (PFs)**

### **1.3.5.Efectos biológicos de los metabolitos**

El conocimiento sobre las propiedades biológicas de los metabolitos de los polifenoles presentes en plasma o en los tejidos es muy limitado. Ello es debido a la poca precisión en su identificación debido, en parte, a la falta de estándares comerciales.

El hecho de que la glucuronidación y la sulfatación conviertan a los polifenoles en compuestos más hidrofílicos, puede afectar a su interacción con su sitio de acción. De hecho, aunque este tipo de conjugados puede conservar parte de sus efectos biológicos tal y como se ha observado en diversos estudios con conjugados de QUER (Yoshizumi et al., 2002) o de CURC (Osawa, 2007), la mayoría de los estudios disponibles indican que los polifenoles en forma de aglicona son más activos biológicamente que sus metabolitos (Asensi et al., 2011).

La metabolización de los polifenoles puede tener efectos indirectos sobre la salud debido a que son metabolizados por las mismas vías que muchos xenobióticos y hormonas endógenas. Por ello, pueden actuar como inhibidores competitivos de enzimas metabólicas como las metiltransferasas y las sulfotransferasas; pueden interaccionar con transportadores utilizados por otros fármacos; y pueden actuar como inhibidores del citocromo P450. Todos estos datos sugieren que los polifenoles pueden afectar a la biodisponibilidad de muchos tóxicos y fármacos al afectar a las actividades enzimáticas implicadas en su propio metabolismo (Manach et al., 2004).

### **1.3.6.Mejora de la biodisponibilidad de los polifenoles**

Además de ser rápidamente metabolizados *in vivo*, los polifenoles son inestables químicamente y poco solubles en agua. Esto, sumado a su baja biodisponibilidad, complica su uso en clínica (Asensi et al., 2011).

Por ello, para mejorar la farmacocinética de los polifenoles y así aumentar sus efectos biológicos, disminuyendo su toxicidad, se están utilizando en los últimos años varias estrategias. Entre ellas destacan

determinadas formulaciones farmacéuticas; modificaciones estructurales; el uso de sistemas de liberación/administración alternativos como liposomas, nanopartículas, microemulsiones y dispositivos poliméricos implantables; o la administración conjunta con inhibidores de transportadores o moduladores enzimáticos (Asensi et al., 2011; Gao and Hu, 2010).

En cuanto a las formulaciones farmacéuticas, uno de los ejemplos es Polyphenon E, un fármaco compuesto por una mezcla de al menos cinco catequinas diferentes, entre ellas, la más abundante, la EGCG. Este fármaco administrado como aerosol, se encuentra en fase clínica I para el tratamiento del cáncer de pulmón. En diversos ensayos se ha demostrado como la biodisponibilidad de la EGCG administrada en polyphenon E es mayor que la de la EGCG administrada a la misma dosis pero de forma individual. Esto es probablemente debido a que la interacción entre los distintos compuestos, tal y como sucede en su fuente natural, aumenta su eficacia y su biodisponibilidad (Asensi et al., 2011; Bode and Dong, 2009). Otro ejemplo de este tipo es la administración oral de la formulación micronizada (tamaño de partícula  $<5\mu\text{m}$ ) del RESV (SRT501) que está en fase clínica II. Esta reducción del tamaño de partícula, contribuye a aumentar su biodisponibilidad principalmente debido a que, al aumentar la superficie de la partícula, se mejoran sus propiedades de disolución y puede administrarse como suspensión (Asensi et al., 2011; Howells et al., 2011; Popat et al., 2013).

Con respecto a las modificaciones estructurales, pueden ser sintéticas o tratarse de compuestos análogos presentes en la naturaleza. Este último es el caso del RESV (trans-3, 5, 4'- trihidroxiestilbeno) y su análogo natural dimetoxilado pterostilbeno (3,5-dimetoxi-4'-hidroxiestilbeno). El pterostilbeno conserva el grupo OH en posición 4' y la configuración *trans* del RESV, que se ha demostrado que son necesarios para su actividad biológica (Stivala et al., 2001). Además de mantener al menos los mismos efectos biológicos que el RESV, el pterostilbeno, debido a la sustitución de los dos grupos hidroxilo en posición 3 y 5 por dos grupos metoxilo, tiene una mayor

biodisponibilidad y una mayor vida media (Ferrer et al., 2005; Lin et al., 2009; Rimando et al., 2002).

Con relación a otras formas de administración/liberación, los liposomas son bicapas lipídicas que permiten la encapsulación de compuestos diversos, entre ellos, los polifenoles. Según su solubilidad en agua, los polifenoles se incorporan bien a la bicapa lipídica (en caso de compuestos liposolubles) o bien quedan el interior del liposoma (en caso de compuestos hidrófilos). En ambos casos, los liposomas contribuyen a la solubilización de estos compuestos permitiendo su administración intravenosa sin necesidad de utilizar solventes orgánicos. Además, los liposomas mejoran la estabilidad de estos compuestos al reducir el contacto con el medio, protegiéndolos así de la luz y de cualquier otro factor que contribuya a su degradación, mejorando su biodisponibilidad (Coimbra et al., 2011). Otra opción son las nanopartículas, estructuras microscópicas de entre 1–100nm constituidas por polímeros o copolímeros biodegradables y biocompatibles. Al igual que los liposomas, las nanopartículas se utilizan para encapsular (en su interior en caso de compuestos hidrosolubles o en su superficie en caso de compuestos liposolubles) compuestos con baja biodisponibilidad como los polifenoles protegiéndolos de su degradación y mejorando su solubilidad. Además, el tiempo y la velocidad de degradación del polímero, y por tanto la liberación del polifenol, son parámetros sujetos a un relativo control (Khushnud and Mousa, 2013). Otras alternativas para mejorar la biodisponibilidad y estabilidad de los polifenoles son las microemulsiones y los dispositivos poliméricos implantables que se están empezando a utilizar en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Bansal et al., 2011).

Otro tipo de estrategias que se están probando para mejorar la biodisponibilidad de los polifenoles es la administración conjunta *in vitro* con inhibidores de transportadores como MK-571 (Vaidyanathan and Walle, 2003) o verapamil, así como con moduladores de enzimas metabólicas. En este último caso, existen ensayos *in vitro*, *in vivo* y en humanos que demuestran que la administración conjunta de polifenoles con piperina, un inhibidor de la glucuronidación tanto a nivel hepático

como intestinal, mejora la biodisponibilidad de los polifenoles aumentando sus efectos biológicos (Gao and Hu, 2010; Lambert et al., 2004; Shoba et al., 1998).

## 2. CÁNCER

---

### 2.1. Conceptos generales

El ser humano es un organismo multicelular donde sus unidades, las células, operan como una sociedad. Estas unidades, siguiendo la Teoría Celular propuesta por Schwann y Schleiden en el siglo XIX, conforman la estructura funcional básica del organismo, y cooperan entre ellas para conseguir la armonía fisiológica del mismo. Para este fin, las células se dividen y se organizan, según la función en la que se especialicen, en tejidos y órganos (Alberts et al., 2007).

El cuerpo humano está formado por unas  $10^{14}$  células, todas ellas con la misma información genética, tanto las células somáticas como las germinales. Por tanto el ser humano es un clon que proviene de una misma célula (Gil et al., 2008). Watson y Crick recibieron el premio Nobel por dilucidar la estructura molecular del material hereditario que las células contienen en el interior de su núcleo. El ácido desoxirribonucleico (ADN) está compuesto por la combinación de un esqueleto azúcar-fosfato y 4 bases nitrogenadas: Adenina (A), Guanosina (G), Citosina (C) y Timidina (T). Gracias a las múltiples combinaciones de los nucleótidos se forman los genes que codifican la información estructural y funcional de las células (Watson and Crick, 1953).

A lo largo de un mismo día ocurren miles de mutaciones en la secuencia del ADN. En la mayoría de los casos, estas alteraciones son irrelevantes o reparadas, y en caso de que se produzcan en genes críticos, suelen ser letales para la célula (Jakobisiak et al., 2003). Sin embargo, ocasionalmente, si las mutaciones que se producen en el ADN

proporcionan alguna ventaja para la supervivencia celular, ya sea incrementando su capacidad de proliferación o disminuyendo el porcentaje de mortalidad celular, sus células hijas incorporarán la misma característica y por tanto mayor capacidad proliferativa, dando lugar a un clon mutante. Éste es el principio fundamental del cáncer.

Con todo ello podemos definir el cáncer como un grupo de numerosas enfermedades, caracterizadas por la alteración de la proliferación celular y la inhibición de la diferenciación celular. El cáncer se manifiesta por la formación de un tumor que es producido por la multiplicación de un clon mutante que escapa a los mecanismos que controlan la multiplicación celular en el organismo, y los supera (Alberts et al., 2007; Bignold, 2007; Liebermann et al., 1995).

Esta división rápida y descontrolada puede dar lugar a **tumores malignos** que tienen la capacidad de invadir el tejido normal que los circunda y extenderse a través del cuerpo vía sistema circulatorio sanguíneo y/o linfático generando metástasis. Sin embargo no todos los tumores son cancerosos (malignos). Los **tumores benignos** permanecen confinados en su localización original, no invaden el tejido normal que los rodea ni se extienden a lugares distantes en el organismo y por lo general pueden ser eliminados quirúrgicamente. Algunos tipos de tumores benignos pueden convertirse en tumores malignos (Alberts et al., 2007).

## 2.2. Epidemiología

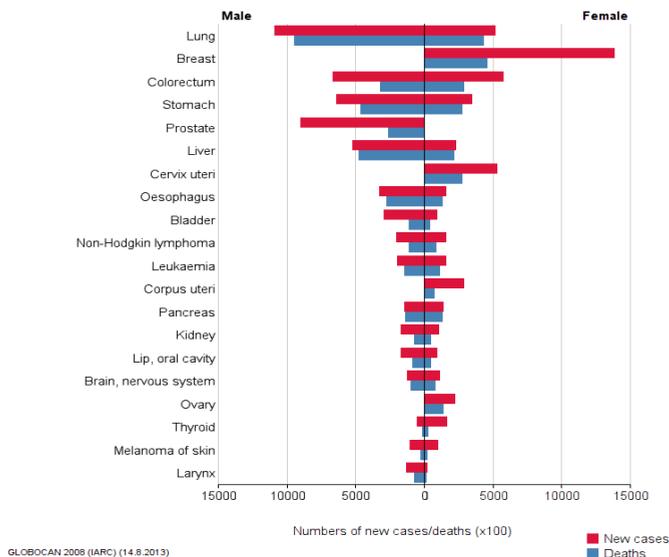
Según la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.), en la mayor parte de los países desarrollados el cáncer es la principal causa de mortalidad junto con las enfermedades cardiovasculares, y los datos epidemiológicos muestran el comienzo de esta tendencia en el mundo menos desarrollado, en particular en los países «en transición» y países de ingresos medianos, como por ejemplo en América del Sur y Asia (Boyle and Levin, 2008; Jones, 1999; Pereira et al., 2012).

Se prevé que, a nivel mundial, la mortalidad por cáncer aumentará entre 2008 y 2030 pasando de 7,9 millones a 17 millones de defunciones,

debido en parte al crecimiento demográfico y al envejecimiento de la población. En las estimaciones se han tenido en cuenta las ligeras reducciones previstas de la mortalidad para algunos tipos de cáncer en países con grandes recursos. Se estima que durante el mismo periodo el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 12 millones en 2008 a 27 millones en 2030 (Boyle and Levin, 2008).

Según los datos disponibles más recientes (2008), los cánceres con mayor incidencia a nivel mundial, son el de pulmón (1,5 millones de casos), el de mama (1,29 millones de casos) y el colorrectal (1,15 millones de casos). Por sexos, el cáncer de mama en mujeres y el cáncer de pulmón en hombres son los más frecuentemente diagnosticados.

Debido a su baja prognosis, los principales tipos de cáncer que contribuyen a la mortalidad anual por esta enfermedad son, el cáncer de pulmón (1.4 millones de muertes), el de estómago (740.000 muertes), el de hígado (700.000 muertes), el colorrectal (610.000 muertes) y el de mama (460.000 muertes) (Jemal et al., 2011). Estos datos se muestran en la **Ilustración 6**.

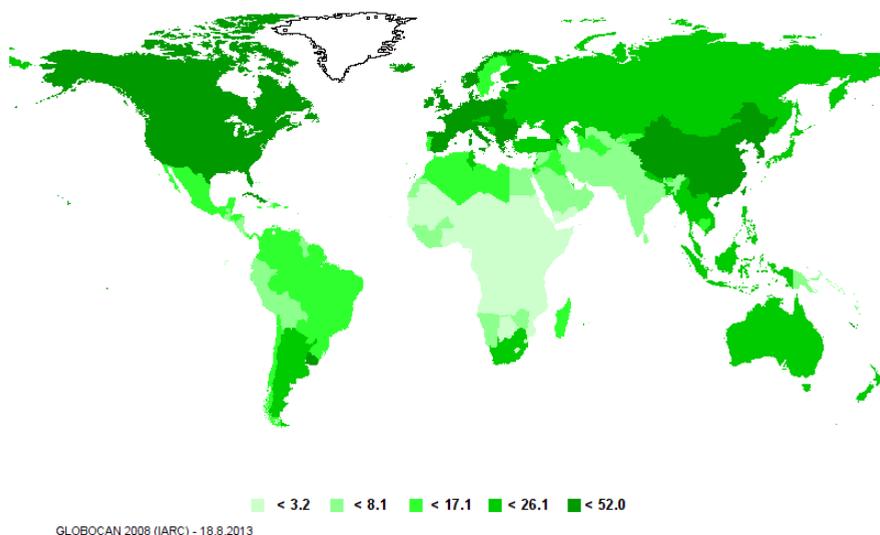


**Ilustración 6: Número de nuevos casos y de muertes por cáncer en el mundo. Fuente: GLOBOCAN 2008 (IARC) (<http://globocan.iarc.fr/>).**

### 2.3. Causas

La carcinogénesis es el proceso por el cual se forma un tumor, y se inicia con mutaciones del material genético de las células normales. Estas mutaciones pueden ser debidas a factores intrínsecos del organismo (como mutaciones heredadas, niveles hormonales, condiciones inmunológicas determinadas) (5-10%) y a factores medioambientales o derivados del estilo de vida (90-95%), es decir factores extrínsecos que se pueden evitar (Anand et al., 2008).

Esto se demuestra al examinar la incidencia de cáncer en varios países, al observar que el riesgo de sufrir un cáncer determinado varía drásticamente entre unos países y otros (**Ilustración 7**). De hecho, las poblaciones emigrantes tienden a adquirir el patrón de incidencia de un cáncer típico del país de adopción, lo cual implica que las diferencias en cuanto a incidencia son debidas principalmente a factores ambientales y no genéticos. A partir de estos datos se estima que el 80-90% de cánceres se podrían evitar o al menos posponer su aparición. Sin embargo, puesto que la mayoría de los factores que afectan al riesgo de cáncer son muy difíciles de identificar, todavía faltan muchos datos relevantes en relación a los factores extrínsecos que afectan a su incidencia. Es por todo ello difícil de demostrar cuál es su etiología. Probablemente la mayoría de estos factores son agentes a los que estamos expuestos habitualmente y que muchos de ellos contribuyan de forma conjunta a la incidencia de un cáncer determinado (Alberts et al., 2007).



**Ilustración 7: Incidencia de cáncer de pulmón en el mundo en ambos sexos. Fuente: GLOBOCAN 2008 (IARC) (<http://globocan.iarc.fr/>).**

Entre los diferentes factores de riesgo modificables conocidos que pueden desencadenar cáncer se incluyen: el tabaco, el alcohol, la dieta, la obesidad, la falta de ejercicio físico, los contaminantes ambientales, agentes químicos (como los hidrocarburos), infecciones crónicas causadas por virus o bacterias, tratamientos farmacológicos y/o las radiaciones (ultravioleta, electromagnéticas, ionizantes) (Boyle and Levin, 2008).

El tabaco, por ejemplo, aumenta el riesgo de padecer al menos trece tipos de cáncer entre ellos: pulmón, cavidad oral, faringe, laringe, esófago, estómago, páncreas, hígado o riñón. Contiene aproximadamente cincuenta agentes carcinógenos incluyendo nitrosaminas e hidrocarburos policíclicos aromáticos (p. ej. el benzopireno). En los países desarrollados, el tabaco es responsable del 30% de las muertes por cáncer y del 90% de las muertes por cáncer de

pulmón. Actualmente, el humo del tabaco es el agente ambiental causante de cáncer más importante del mundo (Boyle and Levin, 2008).

Entre un 15-20% de los cánceres en el mundo se atribuyen a enfermedades infecciosas. La mayoría de los cánceres causados por infecciones son debidos a virus, sin embargo, las bacterias y los parásitos también pueden contribuir a la aparición de la enfermedad. Los principales cánceres causados por virus son: el carcinoma hepatocelular asociados a los virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC); el carcinoma de cuello uterino causado por el papilomavirus; linfomas asociados al virus de Epstein-Barr; o sarcoma de Kaposi asociado al virus del herpes. En cuanto a las infecciones bacterianas, la más conocida es la producida por *Helicobacter pylori* que puede producir cáncer de estómago. Parásitos como el *Schistosoma haematobium*, pueden producir cánceres del tracto urinario (Anand et al., 2008; Boyle and Levin, 2008).

En cuanto al estilo de vida, una dieta con una baja ingesta de frutas, vegetales y cereales, y rica en carne roja, alimentos procesados, y alto consumo de sal se asocia con la aparición de diversos cánceres como el colorrectal (Kushi et al., 2012).

Al menos un 10% de casos de cáncer en el mundo, están causados por radiaciones, tanto ionizantes como no ionizantes (ultravioleta, electromagnéticas). La exposición a radiaciones ionizantes naturales (rayos X y rayos gama) así como artificiales (rayos-X para diagnóstico, radiofármacos, accidentes nucleares) pueden aumentar el riesgo de sufrir cánceres como leucemia, cáncer de mama o cáncer de tiroides. Por otro lado, la luz ultravioleta del sol causa distintos tipos de cáncer de piel (carcinomas de células basales, carcinomas de células escamosos y melanoma) especialmente en poblaciones altamente expuestas al sol, con piel, pelo y ojos claros, con baja capacidad para broncearse y que son propensas a sufrir quemaduras solares. En cuanto a las radiaciones electromagnéticas de baja frecuencia (teléfonos móviles, ordenadores, televisores, transformadores eléctricos y otros equipos electrónicos) han sido descritos como posibles carcinógenos por la O.M.S. Sin embargo, los estudios al respecto no son concluyentes (Boyle and Levin, 2008).

Todos estos agentes que producen cáncer son denominados carcinógenos, y pueden actuar directamente sobre el ADN produciendo mutaciones o pueden ser inertes y convertirse en dañinos tras ser transformados a una forma más reactiva por procesos metabólicos en el organismo. A este tipo de carcinógenos mutágenos se les denomina **iniciadores tumorales**. Sin embargo, no todos los carcinógenos son mutágenos. A este otro tipo de carcinógenos se les denomina **promotores tumorales** y contribuyen al desarrollo del cáncer estimulando la proliferación celular en lugar de inducir mutaciones (Alberts et al., 2007; Weinberg, 2007).

Además de todos estos factores, el envejecimiento es otro factor fundamental en el desarrollo del cáncer, de hecho, si un ser humano pudiera vivir lo suficiente, resultaría inevitable que al menos una de sus células acumulase las suficientes mutaciones para desarrollar un cáncer (Alberts et al., 2007).

## 2.4. Naturaleza biológica de cáncer

Una de las características fundamentales del cáncer es la clonalidad tumoral, es decir, el desarrollo de un tumor a partir de una única célula que comienza a proliferar de forma anormal (Gil et al., 2008; Greaves and Maley, 2012).

Sin embargo, el origen clonal de los tumores no implica que la célula progenitora original que da lugar al tumor haya adquirido inicialmente todas las características de una célula cancerosa (Gil et al., 2008). Por el contrario, el desarrollo del cáncer es un proceso multisequencial caracterizado por alteraciones genéticas y epigenéticas que dan lugar a una transformación progresiva de las células normales en malignas (Hanahan and Weinberg, 2000).

En este sentido, se considera que para alcanzar la malignidad, las células deben adquirir ciertas características moleculares, bioquímicas y celulares. Hanahan y Weinberg propusieron en el año 2000 seis características comunes para todas las células tumorales (Hanahan and

Weinberg, 2000) y las ampliaron a diez en el año 2011 basándose en nuevos datos (Hanahan and Weinberg, 2011). Estas características (**Ilustración 8**) que constituyen un marco lógico que permite entender la diversidad de las enfermedades neoplásicas son:

- I. La capacidad de las células que forman el tumor y de su microambiente de producir señales de proliferación celular de forma autónoma y mantenida (autosuficiencia proliferativa).
- II. La capacidad de evadir las señales antiproliferativas: Alteración del ciclo y la diferenciación celular.
- III. La resistencia a la muerte celular: Apoptosis, necrosis, autofagia.
- IV. La capacidad de las células para replicarse de forma ilimitada: Aumento de la actividad telomerasa y elusión de la senescencia celular.
- V. La inducción de la angiogénesis.
- VI. La capacidad de invadir los tejidos adyacentes y metastatizar.
- VII. La inducción de inflamación promovida por el tumor.
- VIII. La capacidad de modificar o reprogramar el metabolismo energético celular.
- IX. La capacidad de evadir la destrucción inmunológica.
- X. La inestabilidad del genoma y la mutabilidad: Es la característica más importante puesto que es la que causa la adquisición del resto de características.

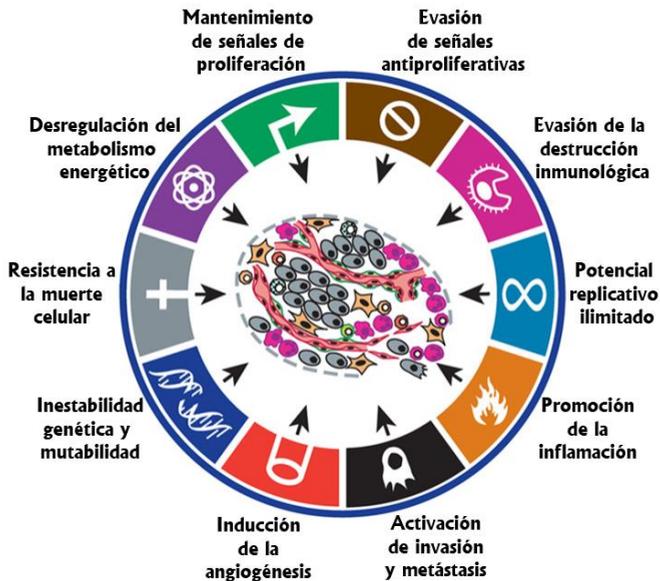


Ilustración 8: Características de las células tumorales. Adaptado de (Hanahan and Weinberg, 2011)

La adquisición en el tiempo y el orden en el cual estas características son adquiridas por las células tumorales varía ampliamente tanto entre tumores del mismo tipo como entre los de distinto tipo. Además, en ciertos tumores una mutación determinada puede conferir a las células tumorales varias de estas características de forma simultánea disminuyendo así el número de pasos requeridos para alcanzar la malignidad (Hanahan and Weinberg, 2000).

En todo caso, actualmente se acepta que las células cancerígenas reclutan y corrompen a otros tipos celulares normales que forman el estroma tumoral y que les ayudan a llevar a cabo los procesos anteriores. Además, ciertos tumores son capaces de inducir la transformación de sus propias células tumorales en células del estroma, pudiendo existir dentro de un tumor células en diferente estado de diferenciación. Es decir, en conjunto, los tumores son mucho más que una masa de células tumorales proliferativas, son tejidos complejos compuestos por múltiples

tipos celulares distintos que interactúan unos con otros dando lugar a un microambiente tumoral que contribuye a la tumorigénesis (Hanahan and Weinberg, 2011).

### **2.4.1. Aspectos genéticos y epigenéticos del cáncer**

El cáncer es una enfermedad que aparece como consecuencia de una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que dan lugar a cambios en la secuencia y en la estructura del ADN y que culminan en una proliferación celular desmedida. Estas alteraciones asociadas al cáncer pueden implicar cambios a pequeña escala, a nivel de uno o varios nucleótidos (sustitución, delección, inserción de nucleótidos); a gran escala, como las inversiones y las translocaciones (recombinaciones) cromosómicas, la ganancia o pérdida de cromosomas, el aumento del número de copias (*copy number*) de un segmento de ADN o incluso la integración de genomas virales en el cromosoma. Además se pueden producir alteraciones en la expresión de los genes donde la secuencia de ADN permanece inalterada, debido a metilaciones en el ADN o modificación en el patrón de histonas (Biankin and Hudson, 2011; Peltomaki, 2012; Stratton, 2011).

En este aspecto, hay muchas evidencias que indican que la carcinogénesis es un proceso de varios pasos de alteraciones sucesivas (acumulación de mutaciones y epimutaciones) que afectan a varios tipos de genes: oncogenes, genes supresores de tumores, y genes que codifican ARNs no codificantes (ncARNs), entre los que se encuentran los que codifican micro-ARNs (Blignaut, 2012; Croce, 2008).

#### **2.4.1.1. Proto-oncogenes y oncogenes**

Los **proto-oncogenes** son genes con funciones esenciales en las células normales que actúan como reguladores positivos del crecimiento. Las proteínas producto de la mayoría de estos genes son componentes de cascadas de transducción de señales incluyendo factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, proteínas G,

proteínas quinasas o factores de transcripción, que regulan procesos celulares fundamentales como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación, el metabolismo y la apoptosis (Croce, 2008; Hartl and Bister, 2013).

Cuando mutan, los proto-oncogenes se activan y se convierten en **oncogenes**. Estas mutaciones suponen una ganancia de función, es decir, un aumento de actividad de su producto génico, por sobreexpresión génica o por hiperactividad proteica. Por ello, los oncogenes estimulan a las células a proliferar cuando no deberían hacerlo, es decir, de forma descontrolada (Alberts et al., 2007; Polsky and Cordon-Cardo, 2003).

Los oncogenes tienen un efecto genético dominante, es decir, solo se necesita la mutación en uno de los dos alelos del gen para su activación (Alberts et al., 2007; Stratton, 2011).

Algunos ejemplos de oncogenes bien conocidos codifican para: el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y su receptor (EGF-R); el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y su receptor (VEGF-R); proteínas G de la familia RAS; proteínas quinasas como AKT o B-RAF; el factor de transcripción nuclear MYC; o la proteína antiapoptótica BCL-2 (Croce, 2008; Polsky and Cordon-Cardo, 2003).

#### **2.4.1.2. Genes supresores de tumores**

Los genes supresores de tumores codifican proteínas que en el organismo sano controlan la proliferación celular. Es decir, son reguladores negativos del crecimiento, por lo que cuando no están presentes en la célula o se encuentran inactivos a causa de mutaciones, las células adquieren propiedades proliferativas anormales características de las células tumorales. Por tanto, las mutaciones que inducen una pérdida de función de los genes supresores de tumores, liberan a la célula de los controles que normalmente les permiten mantener un número determinado de células. Estas mutaciones, por lo general, son recesivas, es decir, las células tienden a comportarse

normalmente hasta que las dos copias del gen son mutadas (Alberts et al., 2007; Caldas and Venkitaraman, 2001; Sherr, 2004).

Los genes supresores de tumores pueden clasificarse como: *gatekeepers* (genes guardianes), *caretakers* (genes cuidadores o de mantenimiento), y *landscapers* (genes reguladores del microambiente) (Srivastava and Grizzle, 2010).

Los genes *gatekeepers* actúan directamente en la prevención del crecimiento tumoral induciendo muerte celular (apoptosis), inhibiendo la proliferación celular (inducción de parada del ciclo celular), o promoviendo la diferenciación celular en células que han acumulado mutaciones (Srivastava and Grizzle, 2010; van Heemst et al., 2007). Este tipo de genes se diferencia del resto en que al restaurar su función se suprime la neoplasia (Macleod, 2000).

Los genes *caretakers*, actúan indirectamente en la supresión de la proliferación celular asegurando la fidelidad de la codificación del ADN y por tanto la estabilidad genómica (Macleod, 2000). Es decir, los productos que codifican están implicados en: la detección de daños en el ADN y la activación de mecanismos reparadores; la reparación de estos daños; y la inactivación o intercepción de moléculas mutagénicas que pueden dañar el ADN (Hanahan and Weinberg, 2011).

Los genes *landscapers* actúan modulando el microambiente donde crecen las células tumorales, mediante una regulación directa/indirecta de las proteínas de la matriz extracelular, de marcadores de superficie celular, proteínas de adhesión o factores de supervivencia/crecimiento secretados. La pérdida de su función podría promover la transformación neoplásica del epitelio adyacente (Macleod, 2000).

Como ejemplo claro de genes supresores de tumores, está *P53*, conocido como el “guardián del genoma”. Este gen se encuentra mutado en la gran mayoría de los tumores humanos y tiene la dualidad de actuar como *caretaker* (activando enzimas de reparación de ADN) y como *gatekeeper* (regulando el ciclo celular y la apoptosis) (Goh et al., 2011; Macleod, 2000). Otros ejemplos son el gen *RB*, el gen *APC*, el gen *PTEN*,

los genes *BRCA1* y *2* o el gen *LKB1* (Sanchez-Cespedes, 2011; Sherr, 2004; Srivastava and Grizzle, 2010).

### **2.4.1.3. Micro-ARNs**

Los micro-ARNs (miARNs) son los ncARNs más ampliamente estudiados. Se trata de pequeñas hebras simples de ARNs (21-23 nucleótidos) que no codifican proteínas. Su función es la regulación negativa de la expresión génica a nivel post-transcripcional. Para ello, se unen a regiones de ARNs mensajeros (ARNm) con una secuencia de nucleótidos complementaria a la suya. De esta forma bloquean la traducción de ARNm específicos e inducen su degradación (Kong et al., 2012).

Los miARNs juegan un papel importante en la regulación de procesos celulares como la diferenciación, la proliferación, la apoptosis y la respuesta al estrés celular. Además son reguladores clave en varias enfermedades, entre ellas el cáncer donde se ha observado que alteraciones en su expresión están relacionadas con la tumorigénesis (Zhang et al., 2007).

Los miARNs pueden estar sobre o sub-regulados en células tumorales (Volinia et al., 2006) actuando como oncogenes o como supresores tumorales dependiendo del tipo celular y diana (Croce, 2008). Los miARNs que están sobreexpresados, son los que en condiciones normales funcionan como oncogenes (oncomirs) inhibiendo la expresión de genes supresores de tumores. Por el contrario, los miARNs que están reprimidos en las células tumorales son los que en las células sanas actuarían frenando la expresión de sus genes diana, los oncogenes, siendo clasificados como genes supresores de tumores (Medina et al., 2010; Shenouda and Alahari, 2009).

Como ejemplo de oncomirs tendríamos *MIR21*, que está sobreexpresado en muchos cánceres como el de mama, colon o pulmón, inhibiendo la expresión de genes supresores de tumores como PTEN (Kong et al., 2012; Liu et al., 2013). Y como ejemplo de supresores de

tumores estarían los miARNs de la familia *LET7* que están deletados o sub-expresados en el cáncer de pulmón, causando la sobreexpresión del oncogen *RAS* (Boyerinas et al., 2010; Johnson et al., 2005).

#### **2.4.1.4. Mecanismos epigenéticos**

La epigenética consiste en el conjunto de los mecanismos hereditarios y reversibles que regulan la expresión génica sin producir cambios en la secuencia del ADN. Estos mecanismos incluyen cambios en la metilación del ADN, modificación de histonas y regulación post-transcripcional por miARNs. Todos estos procesos moduladores de la estructura de la cromatina dan lugar a la activación o el silenciamiento génico (Andreoli et al., 2013).

Por ello, la alteración de los mecanismos epigenéticos (epimutaciones) contribuye al desarrollo del cáncer al modificar la expresión de genes supresores de tumores y de oncogenes. Además, los genes que codifican la maquinaria epigenética pueden a su vez sufrir mutaciones somáticas comportándose como oncogenes o genes supresores de tumores (Peltomaki, 2012).

La **metilación del ADN** en las células normales tiene lugar en los residuos de citosina que forman parte de los dinucleótidos CpG (donde la "p" del par citosina guanina representa que están enlazados por un fosfato). Estos dinucleótidos no se encuentran distribuidos uniformemente en el genoma, sino que se encuentran concentrados en regiones repetitivas largas del genoma, y mayoritariamente en regiones más cortas llamadas islas CpG que normalmente se encuentran ubicadas en regiones promotoras de genes. La metilación del ADN da lugar al silenciamiento génico, de tal forma que en situaciones normales las islas CpG se encuentran desmetiladas permitiendo la expresión génica (Kanwal and Gupta, 2012).

El grado de metilación de CpG contribuye a la oncogénesis por varios mecanismos. Los mayoritarios son: La hipometilación de las regiones CpG intragenómicas, lo cual está relacionado con la

inestabilidad genómica y la sobreexpresión de oncogenes; y la hipermetilación de las islas CpG que se encuentran en regiones promotoras de genes supresores de tumores (Hatzia Apostolou and Iliopoulos, 2011).

Las **histonas** son proteínas con secuencia altamente conservada, que pueden modular su interacción con el ADN y por lo tanto modificar la estructura de la cromatina. Por ello, juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica y en la carcinogénesis (Cedar and Bergman, 2009). Las modificaciones post-traduccionales que pueden modular la expresión génica suceden en las colas amino-terminales de las histonas e incluyen procesos de acetilación, metilación, fosforilación, deaminación, isomerización de prolina y ubiquitinización (Bannister and Kouzarides, 2011).

Estas modificaciones dan lugar a la activación o represión de un gen dependiendo del tipo de modificación y el residuo al que afectan (mayoritariamente lisina y arginina). Distintos estudios han demostrado que la acetilación en los residuos de lisina se correlaciona con la activación transcripcional, mientras que la metilación de lisinas da lugar a la activación o represión génica dependiendo del lugar donde se encuentre el residuo (locus) y del grado de metilación. De hecho, combinaciones específicas en la modificación de las histonas sirven como una especie de código que determina si el gen ha de ser silenciado o expresado. En los tumores humanos, estos patrones de modificación de histonas están alterados (Dawson and Kouzarides, 2012; Hatzia Apostolou and Iliopoulos, 2011).

#### **2.4.2. Telómeros y cáncer**

En células sanas la longitud de los telómeros limita el número de veces que las células pueden dividirse. Ello es debido a que en cada división celular una pequeña parte de los telómeros se pierde. Gracias a la acción de la telomerasa, enzima capaz de regenerar los telómeros, las células embrionarias pueden dividirse las veces suficientes para formar

todo el organismo. A medida que avanza el desarrollo del individuo, el gen que codifica la enzima se reprime. Al estar reprimido las células se dividen hasta que sus telómeros se acortan hasta una longitud crítica, momento en el que las células paran de dividirse y entran en senescencia. De esta manera el organismo es capaz de regular el número de células durante el desarrollo (Alberts et al., 2007).

Sin embargo, si se producen daños en los genes que controlan la inactivación de la telomerasa, es posible que se vuelva activar la enzima. En este caso la enzima regenera los segmentos teloméricos que deberían perderse, permitiendo que las células se repliquen sin fin, convirtiéndose en tumorales (Mocellin et al., 2013).

### **2.4.3. Alteración del metabolismo celular**

Las células tumorales se caracterizan por presentar una proliferación descontrolada. Ello se debe no solo a la alteración de los mecanismos de control de la proliferación, sino también a cambios significativos en su metabolismo energético que favorecen la captación de nutrientes para el crecimiento y la división celular (Hanahan and Weinberg, 2011).

Los tumores muestran varias anormalidades metabólicas, pero la más conocida, y posiblemente la más relevante para la proliferación celular es la descrita por Otto Warburg en los años 20, hoy conocida como “el efecto Warburg” (Bayley and Devilee, 2012).

Otto Warburg propuso que, aún en presencia de oxígeno, las células tumorales pueden reprogramar el metabolismo de la glucosa disminuyendo el metabolismo energético mitocondrial y utilizando como vía mayoritaria para producir energía la glicólisis, ello conduce a un estado denominado “glicólisis aeróbica” (Warburg, 1956; Warburg et al., 1927).

Una de las razones por las cuales las células tumorales utilizan la vía glicolítica para la obtención de energía es que esta vía, además de generar energía en forma de ATP, proporciona a las células los

precursores de carbono necesarios para: la síntesis de ácidos nucleicos para la duplicación del ADN, de amino ácidos para la síntesis proteica, y de lípidos para la síntesis de la membranas plasmática, indispensables para el crecimiento y la proliferación celular. Además, la glicólisis favorece la generación de un ambiente tumoral ácido dañino para las células normales pero no para las células tumorales, constituyendo un mecanismo de defensa para tumoral. Otra ventaja que proporciona esta vía es que genera ATP de forma más rápida que la fosforilación oxidativa (Wu and Zhao, 2013).

Los mecanismos responsables del efecto Warburg no se conocen con exactitud debido a la heterogeneidad tumoral, pero los estudios realizados hasta ahora indican que las alteraciones moleculares que confieren la transformación metabólica son: mutaciones en oncogenes como *MYC* y *RAS*; mutaciones en genes supresores de tumores como *PTEN* y *P53*; mutaciones activadoras de la ruta fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3K); mutaciones o alteraciones en la expresión de transportadores de glucosa (GLUTs), de enzimas glicolíticas como la hexoquinasa II (HKII), la piruvato quinasa (PKM), o la lactato deshidrogenasa (LDH) y de enzimas que participan en la fosforilación oxidativa como la succinato deshidrogenasa (SDH), la fumarato hidratasa (FH) o la isocitrato deshidrogenasa (IDH); las condiciones hipóxicas del microambiente tumoral que dan lugar a la liberación del factor inducible de hipoxia (HIF-1); la disfunción mitocondrial; y la activación de la glutaminólisis (Upadhyay et al., 2013; Wu and Zhao, 2013).

#### **2.4.4. Alteraciones del ciclo celular**

La función primordial del ciclo celular es la de duplicar el ADN y segregar las copias de forma precisa para dar lugar a dos células hijas genéticamente idénticas (Díaz-Moralli et al., 2013). Estos procesos definen las dos grandes fases del ciclo: la fase S (de síntesis), durante la cual se produce la duplicación del ADN y la fase M (de mitosis) donde se produce la división celular (Alberts et al., 2007).

Existen dos fases más durante el ciclo: G1 y G2. En el periodo de tiempo G1 (Gap1), entre la fase M y la fase S, la célula es sensible a los estímulos de crecimiento positivo y negativo. En G2 (Gap2), tras la fase S, la célula se prepara para entrar en mitosis, para lo cual deberá duplicar su masa proteica y sus orgánulos. Existe una quinta fase conocida como fase de quiescencia o G0. Las células pueden salir del ciclo activo y entrar en G0 en determinadas condiciones permaneciendo en dicha fase horas, días, semanas, hasta que las condiciones externas favorezcan su reentrada en el ciclo (**Ilustración 9**) (Alberts et al., 2007).

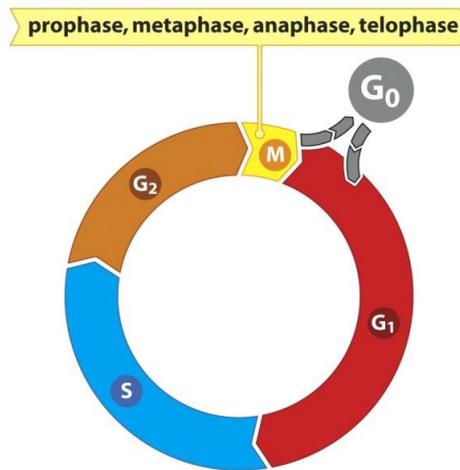


Figure 8-3b The Biology of Cancer (© Garland Science 2007)

**Ilustración 9: Fases del ciclo celular (Weinberg, 2007)**

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

Las ciclinas son proteínas que se expresan a lo largo del ciclo celular de forma transitoria, es decir, son sintetizadas y destruidas en el momento preciso, regulando de una manera cíclica el ciclo celular (Malumbres and Barbacid, 2009). Las ciclinas activan quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que son una familia de serina/treonina quinasas que controlan el ciclo celular. Algunas CDKs son activadas por una o más ciclinas, identificándose diferentes complejos ciclina/CDK y la

activación de estos complejos de manera secuencial controla la progresión ordenada del ciclo celular (Diaz-Moralli et al., 2013).

A la regulación de las CDKs por ciclinas, hay que sumar la regulación por fosforilación. Del mismo modo, existen quinasas inactivadoras de los complejos ciclina/CDK (Diaz-Moralli et al., 2013). La familia proteica de inhibidores de CDKs (CKIs) constituye un nivel adicional de regulación de la actividad de las CDKs. Se han descrito dos clases de CKIs: la familia INK4A (p16INK4A, p15INK4B, p18INK4C y p19INK4D), que se une a las CDK4 y 6, interfiriendo con la asociación de estas a sus ciclinas; y la familia CIP/KIP (p21WAF1 y p27) (Malumbres and Barbacid, 2009).

En respuesta a un estímulo mitótico a través de las vías de señalización RAS/RAF/MAPK, las células pueden entrar en la fase G1, abandonando su estado de quiescencia (G0), o, en caso de que se trate de células en proliferación, tras completar la citocinesis. Como resultado de la estimulación se produce un aumento en la expresión de ciclinas D y E, las cuales activarán diferentes quinasas: la ciclina D1 forma complejos con CDK4 y CDK6 y las ciclinas D2 y D3 con CDK4, CDK6 y CDK2 (Diaz-Moralli et al., 2013). Todo ello contribuye a la fosforilación del producto del gen del retinoblastoma (*pRB*). *pRB* posee 16 sitios potenciales de fosforilación por CDK. Al principio de la fase G1 la *pRB* se encuentra hipofosforilada, en este estado se encuentra unida y reprime la actividad de la familia de factores de transcripción E2F, los cuales regulan la expresión de genes necesarios en la fase S (Harbour and Dean, 2000). La activación de CDK2, CDK4 y CDK6 inicia la fosforilación de *pRB*. Las ciclinas D incrementan su concentración hasta alcanzar un pico justo antes de la fase S, posteriormente su concentración comienza a descender con lo que CDK4 y CDK6 dejarán su estado activo. Aproximadamente en la mitad de la fase G1 comienzan a aumentar los niveles de ciclina E; ésta activa a CDK2 la cual completará el proceso de fosforilación de *pRB*. Esto permite que se rompa la interacción *pRB*-E2F, de forma que E2F pasará a ser transcripcionalmente activo y el ciclo

celular continuará en la fase S (Harbour and Dean, 2000; Ortega et al., 2002; Vermeulen et al., 2003).

En la transición G1/S, existe un punto de no retorno o de restricción (Malumbres and Barbacid, 2009), punto de control en el que cualquier daño en el ADN induce la expresión de *P53* (Levine, 1997). p53 estimula la transcripción de diferentes genes incluyendo *P21*, que inhibe CDKs deteniendo el ciclo celular; *BAX*, que promueve la muerte celular en el caso de un daño irreversible en el ADN; y *HDM2*, que contribuye a la degradación proteolítica de p53. Esta detención del ciclo celular reprime la iniciación y la elongación de la replicación del ADN (Vermeulen et al., 2003).

Sin embargo, en el caso que el ciclo celular progrese, una vez la célula entra en fase S, la ciclina E es degradada y la ciclina A es expresada uniéndose a CDK2 (Malumbres and Barbacid, 2009). El complejo resultante es muy importante en la iniciación y mantenimiento de la síntesis de ADN. Hacia el final de la fase S la ciclina A comienza a activar a la CDK1. Esta señal indica que la fase S se ha completado y comienza la fase G2. En este punto existe otro punto de control (*checkpoint*) para asegurar que la fase S se ha completado (Alberts et al., 2007).

Posteriormente en G2 existe otro punto de control que, como en G1, es un sensor de daño en el ADN, de forma que se asegura la fidelidad de la replicación. Si no hay errores y progresa el ciclo en M, tras la desaparición de la membrana nuclear, la ciclina A es degradada, y CDK1 libre puede unirse a Ciclina B, que ha ido acumulándose a lo largo de G2, permitiendo el avance del ciclo a lo largo de la mitosis. El complejo CDK1-ciclina B es el responsable de la inducción de la mitosis y también se conoce como “factor promotor de la fase M” (MPF) (Pérez de Castro et al., 2008) (**Ilustración 10**).

En caso contrario, si hay daño en el ADN, se activan las proteínas quinasas Chk1 y Chk2, que fosforilan cdc25, inhibiéndola y promoviendo el secuestro de ciclina B, impidiendo la activación del complejo CDK1-ciclina B (Vermeulen et al., 2003).

Una vez el material genético es duplicado, la segregación cromosómica es regulada por SAC (Spindle Assembly Checkpoint), que modula la CDK1 (Diaz-Moralli et al., 2013).

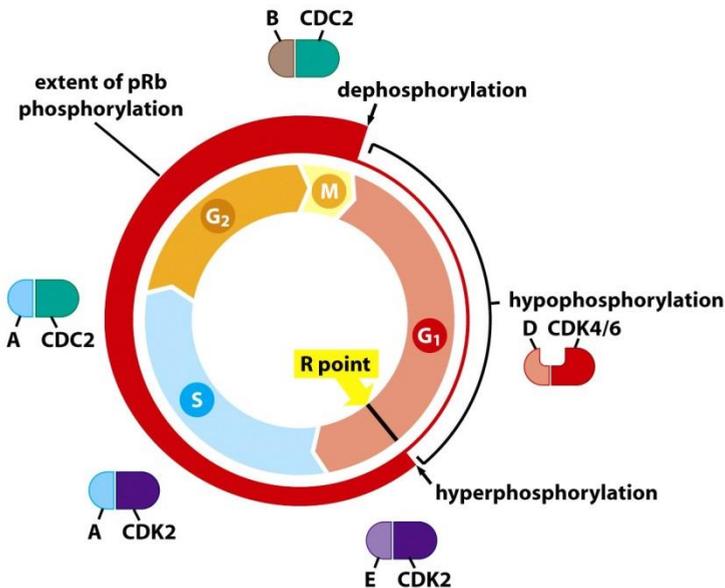


Figure 8-19 The Biology of Cancer (© Garland Science 2007)

#### Ilustración 10: Control del ciclo celular (Weinberg, 2007)

La mayoría de las células normales dejan de dividirse de forma permanente cuando se diferencian en células especializadas. Sin embargo, la diferenciación no es la única razón por la que una célula proliferante deja de dividirse; también puede hacerlo respondiendo al estrés o a daños en su ADN. Como se ha descrito anteriormente, las células normales disponen de un conjunto de puntos de control que paran el ciclo celular temporalmente cuando algo va mal, dejando un tiempo para que el problema sea corregido. Cualquier tipo de daño en el ADN genera señales intracelulares que activan esos puntos de control, por lo que una célula normal se parará permitiendo la reparación del daño antes de que avance a lo largo del ciclo y se divida. Si el daño es irreparable, la célula se retirará de forma permanente del ciclo celular

(senescencia) y morirá antes de originar células hijas con el genoma dañado (Alberts et al., 2007; Kastan and Bartek, 2004).

Las células tumorales acumulan diversas mutaciones que afectan a proteínas que regulan la progresión a través del ciclo celular (como las ciclinas o las CDKs) y/o los mecanismos de control que vigilan una correcta duplicación y segregación del material genético. Estos defectos aumentan la proliferación celular y favorecen que las células cancerosas acumulen inestabilidad genómica y cromosómica (Diaz-Moralli et al., 2013; Malumbres and Barbacid, 2009).

#### **2.4.4.1. Senescencia**

En la célula se puede activar un proceso denominado senescencia. Este proceso al que han llegado las células tras un número finito de divisiones, se caracteriza por la parada permanente del ciclo celular y por cambios específicos en la morfología y expresión génica que distinguen a la senescencia del proceso de quiescencia (parada reversible del ciclo celular). El proceso de senescencia fue descrito por primera vez por Hayflick y Moorhead y, debido a que se produce durante la replicación del ADN, se denominó senescencia “replicativa” (Hayflick and Moorhead, 1961; Shay and Roninson, 2004).

La senescencia replicativa se dispara por el acortamiento de telómeros a lo largo de las divisiones celulares. Sin embargo, un fenotipo similar puede ocurrir en células jóvenes como respuesta a estímulos oncogénicos como el daño en el ADN. A este tipo de senescencia se la denomina “no replicativa” y es un mecanismo que *in vivo* contribuye a la protección contra el cáncer (Acosta and Gil, 2012; Campisi, 2013).

#### **2.4.5. Alteración de los procesos de muerte celular**

La muerte celular programada, es un proceso fisiológico, conservado durante la evolución, con una gran importancia en el desarrollo y la homeostasis tisular (Favaloro et al., 2012).

En todo organismo multicelular adulto, con el fin de mantener un equilibrio, debe existir un balance entre la proliferación celular y la muerte celular programada. La alteración de este equilibrio puede conducir a distintas patologías como las enfermedades neurodegenerativas o el cáncer. En el primer caso, hay un aumento de los procesos de muerte celular. Mientras que en el caso del cáncer, junto con el aumento de la proliferación celular se produce una disminución o evasión de los procesos de muerte celular (Galluzzi et al., 2007; Jain et al., 2013).

Esta resistencia a la inducción de los procesos de muerte celular se ha descrito como una de las “*Hallmarks*” o características del cáncer, y es en parte responsable de la resistencia a las terapias oncológicas. Por ello, el conocimiento de los mecanismos que dan lugar a la muerte celular puede ser útil para el desarrollo de nuevas estrategias antitumorales (de Bruin and Medema, 2008; Ocker and Hopfner, 2012).

La muerte celular programada fue descrita por primera vez en 1972 por el patólogo John Kerr, quien describió sus principales características morfológicas y las acuñó con el término de apoptosis (Kerr et al., 1972). Por ello, el término “muerte celular programada” se ha utilizado regularmente como sinónimo de apoptosis.

Sin embargo, aunque la apoptosis es la muerte celular programada más conocida y mejor entendida, desde su descripción inicial, se han descrito otros tipos o mecanismos de muerte celular programada alternativos a la apoptosis y con características morfológicas y bioquímicas distintas a esta (Kreuzaler and Watson, 2012). No obstante, su clasificación es difícil, ya que se ha observado que pueden compartir algunas vías moleculares e incluso ocurrir en paralelo, lo que demuestra que pueden ser activados por una misma señal (Jain et al., 2013).

#### **2.4.5.1. Apoptosis**

La apoptosis se considera como la forma clásica de muerte celular programada, debido a que es la más frecuente. Se produce cuando existe

un daño irreparable en el ADN celular. Una célula apoptótica se caracteriza por cambios morfológicos y bioquímicos específicos que incluyen la disminución del volumen celular, la condensación cromática, escisión del ADN y fragmentación del núcleo, la externalización de la fosfatidilserina, y la formación de vesículas en la membrana plasmática que, finalmente, darán lugar a la rotura de la célula en fragmentos rodeados de membrana denominados cuerpos apoptóticos que contienen los orgánulos citoplasmáticos intactos y fragmentos del núcleo. Los cuerpos apoptóticos serán fagocitados por células vecinas (macrófagos, fibroblastos o células epiteliales). De esta manera, la célula muere y es eliminada sin provocar una respuesta inflamatoria en el tejido (Alberts et al., 2007; Ouyang et al., 2012).

Las células pueden activar la apoptosis por dos vías diferentes pero interrelacionadas: La **vía extrínseca**, que es iniciada por ligandos extracelulares que se unen de forma específica a los llamados receptores de muerte celular que se encuentran en la membrana plasmática; y la **vía intrínseca**, que requiere la participación de la mitocondria y es iniciada por señales de estrés intracelular como la disminución de factores de crecimiento, el daño en el ADN, la hipoxia o el estrés oxidativo. En ambos casos, el resultado final es la activación de un conjunto de proteasas denominadas caspasas, cuya cascada induce los cambios morfológicos y bioquímicos característicos mencionados arriba (Favaloro et al., 2012).

Los receptores de muerte celular implicados en la vía extrínseca pertenecen a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) y son, entre otros el receptor del propio TNF- $\alpha$  (TNFR) y el receptor de muerte Fas (FasR o CD95). Estos receptores son proteínas transmembrana que contienen un dominio de unión al ligando, un único dominio transmembrana y un dominio de muerte intracelular necesario para que los receptores activen el programa apoptótico (Alberts et al., 2007).

Una vez el ligando se une a su receptor, los dominios de muerte intracelular reclutan proteínas adaptadoras intracelulares como TRADD (Que se asocia al TNFR) o FADD (que se asocia a FasR). Estas proteínas

adaptadoras, contienen a su vez un dominio efector de muerte a través del cual se unen a procaspasas iniciadoras como la procaspasa-8 y la procaspasa-10. Este complejo formado por el ligando, el receptor, la proteína adaptadora y la procaspasa, se denomina **complejo de señalización inductor de muerte (DISC: *Death-Inducing Signaling Complex*)**. Las procaspasas son activadas en el DISC activando a las siguientes procaspasas ejecutoras como la caspasa-3 y la caspasa-7, que inducirán la apoptosis (Favaloro et al., 2012; Lavrik and Krammer, 2012).

La vía intrínseca comienza con la permeabilización de la membrana mitocondrial externa que tiene lugar debido a dos mecanismos esenciales. Uno supone la formación de un poro en la membrana mitocondrial externa por proteínas de la familia Bcl-2. El otro supone la apertura de un poro en la membrana mitocondrial denominado poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM), cuyos principales componentes son VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje) y ANT (translocador del nucleótido adenina) (Favaloro et al., 2012).

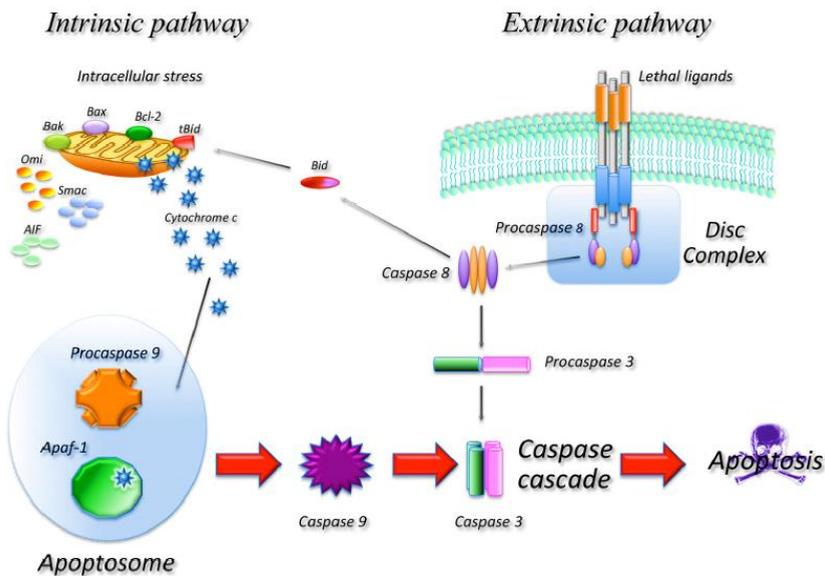
Este proceso está regulado por las proteínas de la familia Bcl-2 que se clasifican en dos grupos: proteínas pro-apoptóticas y proteínas anti-apoptóticas. Los miembros que contribuyen en mayor medida a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa son las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak, las cuales se unen formando oligómeros que, bien se insertarán directamente en la membrana formando poros, o bien contribuyen a la apertura del PPTM al unirse a alguno de sus componentes (p. ej. VDAC) (Favaloro et al., 2012). La unión de Bax y Bak es controlada por otros miembros de la familia Bcl-2. Por un lado es activada por sus miembros pro-apoptóticos (Bim, Bad, Noxa, Puma y Bid); y por otro lado es inhibida por los miembros antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w y Mcl-1) (Roset et al., 2007).

Esto tiene como consecuencia la liberación de proteínas pro-apoptóticas como el citocromo c, Smac/DIABLO o AIF (factor inductor de la apoptosis) del espacio intermembrana mitocondrial al citosol. La proteína más importante es el citocromo c que interactúa en el citosol con la proteína monomérica APAF-1 (factor activador de apoptosis),

provocando un cambio conformacional en ésta, su oligomerización y la unión con la procaspasa-9. Dichas proteínas, forman el apoptosoma e inducen la activación autocatalítica de la caspasa-9, que una vez es funcional activa otras caspasas como las caspasas-3 y -7 que degradarán la célula. En cuanto al papel que desempeña la proteína Smac/DIABLO, actúa como inhibidor de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) (Favaloro et al., 2012).

Las vías extrínseca e intrínseca no son totalmente independientes. En algunas células la activación de la caspasa-8 en la vía extrínseca, da lugar a la activación de la vía intrínseca. La caspasa-8, entre otras cosas, rompe la proteína pro-apoptótica Bid, dando lugar a una forma truncada de Bid (tBid), que se transloca a la mitocondria dando lugar a la permeabilización de la membrana externa (Kaufmann et al., 2012).

Todos estos procesos se resumen en la **Ilustración 11**.



**Ilustración 11: Regulación de la apoptosis (Favaloro et al., 2012)**

Debido a su papel importante en el mantenimiento de la homeostasis, la alteración de las proteínas implicadas tanto en la vía extrínseca como en la vía intrínseca de la apoptosis, pueden dar lugar al desarrollo del cáncer. Algunas de estas alteraciones descritas son: la sobreexpresión del gen que codifica la proteína antiapoptótica Bcl2; mutaciones en los genes que codifican las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak; defectos en los componentes del apoptosoma como la inactivación de Apaf-1; disminución de la expresión de receptores de muerte celular; mutaciones en FADD; o la alteración de la actividad caspasa debido a mutaciones o cambios epigenéticos de las mismas (Favaloro et al., 2012).

#### **2.4.5.2. Autofagia**

La autofagia es un proceso catabólico conservado evolutivamente en células eucariotas que se caracteriza por la degradación lisosomal de proteínas, orgánulos y material citoplasmático. En general, la autofagia constituye un mecanismo protector y de supervivencia para la célula. Sin embargo, un exceso de actividad autofágica es capaz de destruir la mayor parte del citosol y de los orgánulos, dirigiendo finalmente a la célula hacia el colapso total de sus funciones y desencadenando la muerte celular programada por autofagia, convirtiéndose en un tipo de muerte celular programada alternativa a la apoptosis (Levine and Kroemer, 2008). De hecho, la autofagia se ha denominado muerte celular programada tipo II para diferenciarla de la apoptosis o muerte celular programada tipo I (Bursch et al., 2000).

La autofagia es un proceso que se da en respuesta a situaciones de estrés intra- y extra-celular como la escasez de nutrientes, la hipoxia, el daño en el ADN o el estrés oxidativo. En el caso de la escasez de nutrientes, la autofagia es un proceso crítico para la supervivencia celular, ya que la degradación de proteínas y orgánulos citoplasmáticos proporciona las materias primas requeridas para el mantenimiento celular. Además, la autofagia es un proceso fisiológico importante en el reciclado y eliminación de orgánulos dañados, proteínas endógenas mal

plegadas y partículas extrañas como microorganismos ejerciendo, de este modo, un papel citoprotector (Jain et al., 2013).

Por tanto, la autofagia es un proceso que juega un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis así como en el desarrollo y la diferenciación celular, por lo que su mal funcionamiento puede contribuir al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer (Jain et al., 2013).

Se han definido tres tipos de autofagia según el mecanismo por el cual el lisosoma degrada el material intracelular: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (AMC). En la microautofagia, los componentes citosólicos son directamente llevados al lisosoma a través de la invaginación de la membrana lisosomal. En el caso de la ACM, chaperonas como Hsc-70 se unen a las proteínas a degradar translocándolas al lisosoma a través de su interacción en la membrana lisosomal con la proteína 2 asociada a la membrana lisosomal (LAMP-2) (Zhou et al., 2012).

Con respecto a la macroautofagia, a la que nos referiremos partir de ahora como autofagia, implica el secuestro del material citoplasmático en vesículas citosólicas de doble membrana llamadas autofagosomas. Estos, se fusionan con los lisosomas formando los autofagolisosomas donde el contenido intravesicular es liberado y degradado por medio de las proteasas lisosomales (Kimmelman, 2011).

En mamíferos el proceso de autofagia se divide en diferentes etapas: iniciación o inducción, nucleación, elongación y cierre, maduración y degradación (Codogno et al., 2012). Hasta ahora se han identificado al menos 30 proteínas implicadas en este proceso la mayoría llamadas **ATG** (*AuTophagy-related protein*). Estas proteínas son necesarias para la ejecución de todas las etapas de la autofagia (Nakatogawa et al., 2009) (**Ilustración 12**).

En mamíferos la inducción de la autofagia requiere del complejo formado por ULK1/2, mATG13, FIP200 y ATG101 y que es regulado por mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), quien inhibe su activación, y

por AMPK (*AMP-activated protein kinase*), que por el contrario lo activa. En condiciones de escasez de nutrientes mTOR es inhibida, por lo que el complejo se activa y da lugar a la iniciación de la formación del autofagosoma (Jain et al., 2013) (**Ilustración 12**).

El siguiente paso, la nucleación, está regulado por el complejo formado por Beclina-1, Vps34 que es una fosfatidil-inositol 3-quinasa de clase III (PI3K III), p150, y ATG14. Este complejo es esencial para la producción de fosfatidil-inositol 3 fosfato (PI3P) durante el estado inicial de nucleación del fagóforo. La producción de PI3P, subsecuentemente, recluta otras proteínas efectoras de las siguientes etapas como WIPI1/2 (Codogno et al., 2012) (**Ilustración 12**).

La elongación y el cierre de la membrana del autofagosoma, requiere de dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina interrelacionados. El primero constituye la formación del complejo ATG5-ATG12-ATG16, que se localiza en la superficie exterior de la membrana del fagóforo y es imprescindible para la ejecución del segundo sistema (Kroemer et al., 2010) (**Ilustración 12**).

El segundo sistema implica la conjugación de la proteína **LC3** (*Microtubule Associated Protein Light Chain 3*) con el lípido fosfatidiletanolamina (PE). La proteína LC3 es sintetizada como un precursor (pro-LC3) e inmediatamente tras su síntesis es procesada por ATG4 en LC3-I que es la forma soluble citoplasmática de LC3. La lipidación de LC3 ocurre sólo cuando se induce la autofagia y convierte LC3-I en la forma asociada a los autofagosomas unida a la doble membrana, LC3-II. La formación de LC3-II media el cierre de la membrana y la fusión con el lisosoma. LC3-II está presente en la membrana interna y externa del autofagosoma, por lo que una vez fusionados estos con los lisosomas, la proteína LC3-II de la cara interna es degradada en el interior de los autolisosomas y la de la cara externa es liberada por ATG4 convirtiéndose en LC3-I y por tanto volviendo al citosol (Kroemer et al., 2010; Mizushima and Yoshimori, 2007) (**Ilustración 12**).

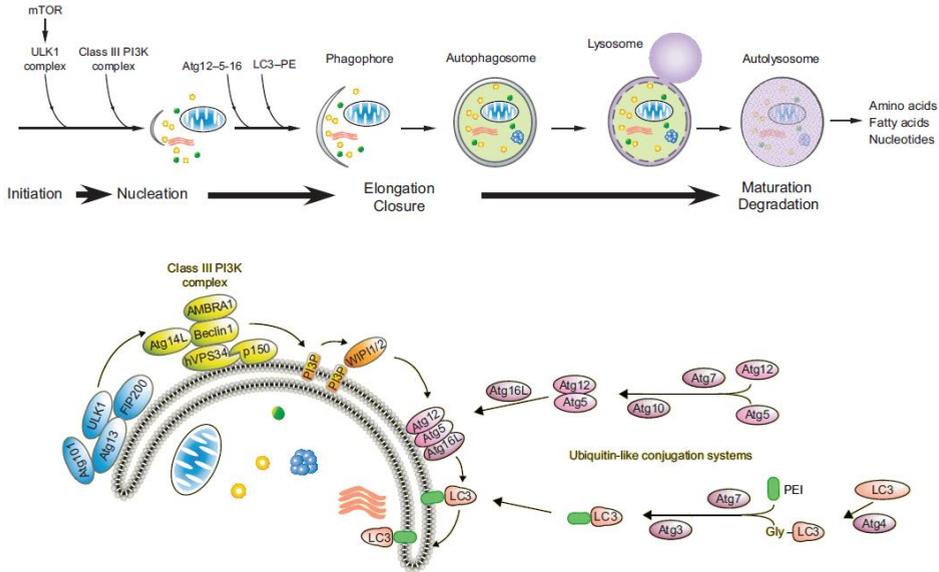


Ilustración 12: Proceso autofágico (Mackeh et al., 2013)

El material englobado por los autofagosomas es seleccionado a través de proteínas adaptadoras de autofagia. Estas proteínas presentan dominios de interacción con las proteínas LC3-II llamados **LIR** (**LC3-Interacting Región**), un dominio de reconocimiento de ubiquitina llamado **UBA** (**UB-Associated**) y un dominio PB1 de oligomerización. El mejor ejemplo de estas proteínas lo constituye p62 o secuestrósoma-1 (p62/SQSTM1). Esta proteína es capaz de reconocer proteínas ubiquitinadas, ya sean proteínas mal plegadas o agregados proteicos. Estos agregados son reconocidos por la LC3-II que se encuentra en la cara interna del autofagosoma, reclutados en su interior y degradados junto con el resto del contenido al fusionarse el autofagosoma con el lisosoma. Por tanto, cuando la autofagia está inhibida, p62 se acumula (Johansen and Lamark, 2011).

La relación entre la autofagia y el cáncer ha sido extensamente estudiada y existe una gran controversia entre si actúa como pro-tumoral

o como antitumoral. Múltiples evidencias muestran que la supresión de proteínas implicadas en este proceso, como beclina-1 y ATG5, podría acelerar la tumorigénesis. De hecho, en ciertos tipos de cáncer se observa una disminución de los niveles de proteínas autofágicas (Iqbal et al., 2009; Qu et al., 2003). Esto tendría sentido puesto que la autofagia prevendría la transformación maligna de una célula normal al degradar los orgánulos dañados reduciendo el estrés celular, o al degradar proteínas específicas que podrían inducir la tumorigénesis. Además, la autofagia podría dar lugar a la muerte de las células premalignas (de Bruin and Medema, 2008). Por tanto, sería razonable pensar que la inducción de la autofagia, como mecanismo antitumoral, podría ser útil en el tratamiento contra el cáncer.

Sin embargo, otros estudios indican que la autofagia podría ser protumoral en estadios avanzados de los tumores. En este caso, la autofagia protegería a las células tumorales de las condiciones de estrés a las que están sometidas debido a la falta de nutrientes y de oxígeno, e incluso del generado por los fármacos citotóxico, siendo en este caso la autofagia un mecanismo de defensa que daría lugar a resistencia al tratamiento (de Bruin and Medema, 2008; Zhou et al., 2012).

Por tanto, la inducción farmacológica de la autofagia podría ser útil en la prevención del cáncer y en sus estadios iniciales. Mientras que la supresión de la autofagia junto con la administración de fármacos antitumorales, en estadios avanzados, podría ser una estrategia de quimio-sensibilización (Choi, 2012).

#### **2.4.5.3. Necrosis y necroptosis**

Tradicionalmente, la necrosis se ha diferenciado de la muerte celular programada por no presentar regulación, definiéndose como un tipo de muerte “accidental”, un proceso patológico que tiene lugar cuando las células son sometidas a agresiones severas como la hipertermia, la isquemia, o la lesión celular directa (Alberts et al., 2007; de Bruin and Medema, 2008). Una célula que muere por necrosis

manifiesta características bien diferenciadas de la apoptosis. Estas incluyen la pérdida de la permeabilidad selectiva de las membranas y la hinchazón de citoplasma y orgánulos que da lugar a la lisis celular provocando la liberación de su contenido al espacio extracelular. Por ello, la necrosis afecta a las células vecinas, desencadenando una respuesta inflamatoria (Jain et al., 2013).

Sin embargo, se ha observado que la necrosis puede ser regulada, denominándose en este caso necroptosis. La necroptosis, o necrosis programada es inducida por el TNF- $\alpha$  o el ligando Fas, vía sus respectivos receptores de muerte, cuando la célula es incapaz de morir por apoptosis. Este proceso, que es independiente de la activación de caspasas, está regulado por las quinasas RIP1 y RIP3 (Kreuzaler and Watson, 2012).

#### **2.4.5.4. Muerte celular lisosomal**

Aunque la resistencia a la muerte observada en las células tumorales se atribuye principalmente a la inhibición de la apoptosis, es posible que la alteración de otros tipos de muerte celular programada no apoptótica sea también relevante para la carcinogénesis (Kroemer and Jaattela, 2005).

Tradicionalmente, y tal y como se ha descrito hasta ahora, existen tres tipos de muerte celular programada que se diferencian según sus características morfológicas: Apoptosis, autofagia y necroptosis. Sin embargo, se ha observado que cambios en el tráfico y el contenido lisosomal también pueden dar lugar a un tipo de muerte celular programada por mecanismos dependientes e independientes de caspasas. A este tipo de muerte se la denomina muerte celular lisosomal (Kirkegaard and Jaattela, 2009).

Los lisosomas son orgánulos citoplasmáticos ácidos que contienen numerosas hidrolasas (proteasas, lipasas, nucleasas, glicosidasas, fosfatasas y sulfatasas) responsables de su función principal, la degradación y reciclaje de macromoléculas (Cesen et al., 2012;

Kroemer and Jaattela, 2005). Los lisosomas controlan la muerte celular a varios niveles. Por un lado, en condiciones fisiológicas, participan en la autofagia, proceso que puede desencadenar la muerte celular dependiendo del contexto y la intensidad. Por otro lado, en respuesta a estímulos endógenos o exógenos de estrés, se puede producir la permeabilización de la membrana lisosomal dando lugar a la liberación de las enzimas hidrolíticas que provocarán la llamada muerte celular lisosomal (Kroemer and Jaattela, 2005).

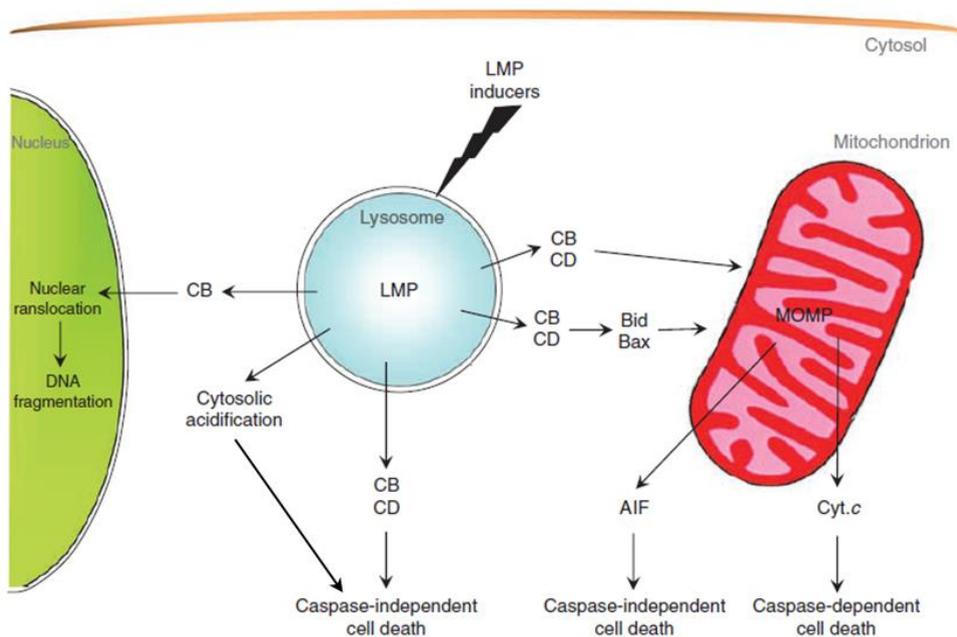
De todas las hidrolasas lisosomales las más conocidas y las que se cree que son las principales responsables de la muerte celular lisosomal, son las catepsinas (Kreuzaler and Watson, 2012). Estas enzimas se clasifican según los aminoácidos que poseen en su centro activo en: cisteín catepsinas (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W y X), serin catepsinas (A y G) y aspartil catepsinas (D y E) (Johansson et al., 2010). Entre ellas, las mayoritarias son las cisteín catepsinas B, L, C y H, y la aspartil catepsina D. Al contrario que las caspasas, las catepsinas no necesitan activación. Además, permanecen activas incluso a pH neutro el tiempo necesario para poder romper y degradar varios sustratos celulares (Cesen et al., 2012; Kreuzaler and Watson, 2012). Hay que tener en cuenta que aunque estas catepsinas son las ejecutoras principales de la muerte celular lisosomal, su inhibición solo produce una protección parcial frente a este tipo de muerte, por lo que otro tipo de hidrolasas lisosomales (como lipasas o fosfatasas), mensajeros secundarios derivados de los lisosomas (como el ión calcio o los protones), y la propia disfunción celular, debido a la permeabilización de la membrana lisosomal, pueden jugar un papel importante en este tipo de muerte (Aits and Jaattela, 2013).

Según este modelo de muerte, en caso de una permeabilización lisosomal parcial (limitada) y selectiva, la liberación del contenido lisosomal puede desencadenar la muerte celular por apoptosis al activar la vía intrínseca de la misma, o una muerte celular similar a la apoptosis pero independiente de caspasas. Mientras que, en el caso de una intensa permeabilidad lisosomal o incluso de una ruptura generalizada de los lisosomas, se produce una degradación indiscriminada de los

componentes celulares y una acidificación citosólica que inducirá la muerte celular por necrosis (**Ilustración 13**). Además, todos los tipos de muerte celular dan lugar, en algún momento a la permeabilización de la membrana lisosomal, por lo que es importante diferenciar la permeabilización de la membrana lisosomal que induce la muerte celular, de la que es consecuencia de ella (Aits and Jaattela, 2013; Boya and Kroemer, 2008).

En cuanto a la activación de la vía intrínseca de la apoptosis, una vez liberadas al citosol, las catepsinas actúan a diferentes niveles. Uno de los sustratos más conocidos de las catepsinas es la proteína proapoptótica Bid, que puede ser activada por varias de ellas. Además, las catepsinas pueden degradar proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-XL y Mcl-1, así como activar las proteínas proapoptóticas Bax y Bad de una forma Bid-independiente. Otra vía, es la activación directa de las caspasas como la caspasa-8, o la degradación de IAPs como XIAP (Repnik et al., 2012) (**Ilustración 13**).

La permeabilización de la membrana lisosomal también puede dar lugar a la muerte celular similar a la apoptosis independiente de caspasas, ya que se ha visto que la inhibición de estas no siempre reduce la muerte celular. En este caso, las propias catepsinas ejercen el papel de caspasas ejecutoras de la muerte celular al degradar los sustratos de estas, entre ellos PARP. Otros de los mecanismos independientes de caspasas implicados, son la inducción de AIF y la inducción directa del daño nuclear (Aits and Jaattela, 2013) (**Ilustración 13**).



**Ilustración 13: Muerte celular lisosomal. Adaptado de (Boya and Kroemer, 2008). LMP: Permeabilización de la membrana lisosomal**

Un gran número de estímulos y moléculas endógenas o de origen sintético pueden inducir la muerte celular lisosomal al provocar la permeabilización de la membrana lisosomal. Entre ellos las especies reactivas del oxígeno (ROS), agentes lisosomotrópicos, proteínas virales, toxinas, proteasas (incluyendo las propias catepsinas), lípidos y sus metabolitos o fármacos que afectan la función de los microtúbulos (Aits and Jaattela, 2013; Cesen et al., 2012).

Por el contrario, existen varias moléculas conocidas por su papel protector de la membrana lisosomal, actuando como reguladores endógenos al impedir su permeabilización. Entre ellas se incluyen LAMP-1, LAMP-2, colesterol, glicosaminoglicanos, la proteína de choque térmico hsp70, así como inhibidores endógenos de catepsinas (Cesen et al., 2012).

La alteración del tráfico lisosomal contribuye a la generación y desarrollo de varias patologías neurodegenerativas, aterosclerosis, artritis reumatoide y cáncer (Cesen et al., 2012). El papel de las catepsinas en la progresión del cáncer está especialmente bien documentado. Se ha observado que la alteración del tráfico lisosomal y el aumento de la expresión de las catepsinas, contribuyen a distintos procesos tumorigénicos como la angiogénesis, la invasión tumoral y la metástasis. Ello es debido a que las catepsinas pueden ser secretadas al espacio extracelular donde ejercen su función proteolítica, participando en la degradación de la matriz extracelular junto con metaloproteinasas y contribuyendo a la progresión tumoral (Boya and Kroemer, 2008; Kirkegaard and Jaattela, 2009).

Sin embargo, la liberación de catepsinas al espacio intracelular ejerce un papel antitumoral al inducir muerte celular lisosomal. De hecho, debido a su papel proapoptótico, dan lugar entre otras cosas a la degradación de proteínas antiapoptóticas que suelen estar sobreexpresadas en la mayoría de los cánceres. Además, y debido a que promueven la muerte celular independiente de caspasas, este tipo de muerte puede ser una alternativa en los tumores resistentes a la apoptosis. Por otro lado, los lisosomas son indispensables para la autofagia, que es uno de los mecanismos de supervivencia más importantes de las células tumorales en condiciones de estrés. Por ello, la inducción de la muerte lisosomal podría ser una buena estrategia antitumoral (Cesen et al., 2012).

#### **2.4.6. Papel de Hsp70 en el cáncer**

Las proteínas de choque térmico (Hsp), son un grupo amplio de proteínas de estrés que juegan un papel crítico en la homeostasis celular, por lo que su expresión y su localización adecuadas son fundamentales para la supervivencia celular (Petersen et al., 2010). Actualmente son conocidas por su función como chaperonas moleculares, evitando el mal plegamiento y la agregación proteica durante la síntesis *de novo* o bajo condiciones de estrés. Se ha establecido que además, participan en el

transporte de proteínas entre orgánulos y compartimentos subcelulares para su empaquetamiento, degradación o reparación (Goloudina et al., 2012; Murphy, 2013; Rohde et al., 2005).

Según su peso molecular se subdividen en varias familias, de las cuales, la familia Hsp70 (70 KDa) es la más conservada en la evolución. Esta familia de adenosin trifosfatasas está formada por al menos ocho miembros que se diferencian entre ellos por su localización intracelular, su expresión tejido-específica y su expresión inducida por estrés. Dos de los miembros se encuentran en orgánulos específicos: Hsp70-5 (Bip o Grp78) que se encuentra en el retículo endoplasmático, y Hsp70-9 (mtHsp70 o Grp75) que se encuentra en la mitocondria. El resto de los miembros se encuentran predominantemente en el citosol, aunque también pueden localizarse en el núcleo. De ellos, las más conocidas son: Hsc70 (Hsp70-8 o Hsp73) que se expresa de forma constitutiva y se encuentra prácticamente en todos los órganos y tejidos; y las proteínas Hsp70-1A y Hsp70-1B (o Hsp70A1A y Hsp70A1B) que se agrupan con el nombre común de Hsp70-1 (o Hsp72) debido a que solo se diferencian por dos amino ácidos. La síntesis de esta última, Hsp70-1 (a la que nos referiremos a partir de ahora como Hsp70), es inducida por señales de estrés como el aumento de la temperatura, la hipoxia, el estrés oxidativo o la alteración del pH, contribuyendo sus altos niveles a la supervivencia celular (Murphy, 2013; Rohde et al., 2005).

Las células tumorales experimentan múltiples señales de estrés intra y extracelular. Por tanto, no es de extrañar que Hsp70 juegue un papel importante en el cáncer. De hecho, múltiples evidencias sugieren que en la mayoría de tumores existe una sobreexpresión de esta proteína que se correlaciona con un aumento de la proliferación celular, una mala prognosis y resistencia al tratamiento oncológico (Murphy, 2013).

Debido a su papel como chaperona, Hsp70 promueve la supervivencia de las células tumorales por varias vías. Por un lado, se ha visto que ejerce un papel anti-apoptótico, inhibiendo la apoptosis a diferentes niveles, tanto en la vía extrínseca (p. ej. uniéndose a los receptores de muerte inhibe el ensamblaje del complejo DISC) como

intrínseca (p. ej. uniéndose a Bax impide su translocación a la mitocondria). Por otro lado, Hsp70 es capaz de suprimir la senescencia celular, un mecanismo anti-tumoral muy importante en los primeros estadios de la tumorigénesis (Goloudina et al., 2012).

Así mismo, se ha observado que en las células tumorales, Hsp70 además de encontrarse en el citosol y en la membrana plasmática, se transloca en la membrana lisosomal donde se ha visto que actúa como guardián de la integridad lisosomal inhibiendo su permeabilización y por tanto evitando la muerte celular lisosomal desencadenada por las hidrolasas contenidas en estos orgánulos (Kirkegaard and Jaattela, 2009; Petersen et al., 2010). Debido a que estabiliza la membrana lisosomal, Hsp70 promueve la autofagia como mecanismo de supervivencia celular. Por todo ello, la depleción de Hsp70 podría ser una buena estrategia en el tratamiento del cáncer (Kirkegaard and Jaattela, 2009; Murphy, 2013).

## 2.5. Adaptación tumoral al tratamiento oncológico

Una de las características de las células tumorales (ver apartado 2.4) es su inestabilidad genética. Esta es una característica que en sí misma, paradójicamente, puede ser positiva o negativa para la terapia antitumoral (Alberts et al., 2007). Aunque parece proporcionar el talón de Aquiles que las terapias antitumorales pueden utilizar, también puede hacer más difícil la erradicación de un cáncer. Una tasa demasiado elevada de mutaciones tiende a convertir la población de células cancerosas en heterogénea; este hecho puede dificultar la eliminación de toda la población con un solo tipo de tratamiento. Además, permite a muchos cánceres desarrollar resistencias muy rápidamente (Alberts et al., 2007). Entre los mecanismos de adaptación tumoral al tratamiento oncológico encontramos:

- **Disminución de la acumulación de fármacos:** la disminución de los niveles intracelulares de los agentes citotóxicos es uno de los mecanismos de resistencia más común. Los fármacos de naturaleza polar solubles en agua no pueden atravesar la bicapa

lipídica de la membrana celular y requieren de mecanismos específicos para poder entrar. La resistencia a estos fármacos puede ser mediada por una disminución de la entrada, o por un aumento de la extrusión del fármaco a través de canales denominados MDR (multirresistencia a fármacos). Estos transportadores de la superfamilia ABC son ATPasas transportadoras unidas a la membrana plasmática que bombean los fármacos lipofílicos. Uno de los sistemas mejor caracterizados es la glicoproteína-P (Pgp, MDR1), cuya sobreproducción impide la acumulación intracelular de la mayoría de los fármacos citotóxicos e insensibiliza a la célula a estos fármacos. Una de las características del sistema MDR es que las células que han sido expuestas a un fármaco antitumoral, desarrollan resistencia no solo a este fármaco sino a otros fármacos (Alberts et al., 2007; Gillet and Gottesman, 2010).

- **Inactivación de fármacos o intermediarios tóxicos** por un aumento de factores de detoxificación como el sistema glutatión/glutatión-S-transferasa (Weinberg, 2007).
- **Alteración del metabolismo de los fármacos:** la modificación de la activación o inactivación del fármaco, o de cofactores necesarios para su actividad, pueden conferir resistencia a agentes antineoplásicos selectivos. Por ejemplo por disminución de la expresión del citocromo P-450 disminuiría la activación de profármacos (Weinberg, 2007).
- **Aumento en los mecanismos de reparación:** a consecuencia de la acción del fármaco se pueden producir daños directos o indirectos en las células tumorales. Sin embargo, estas células poseen complejos sistemas de reparación de los daños tanto en las membranas como en el ADN que si están aumentados pueden influir sobre la sensibilidad celular a los fármacos (Weinberg, 2007).

- **Alteración de las dianas:** en muchos casos, los mecanismos de muerte celular implican interacciones entre fármaco y enzimas intracelulares que inhiben sus funciones antitumorales comprometiendo, de este modo, la eficacia del fármaco. Por ejemplo, en células quimiorresistentes se han encontrado alteraciones en la dihidrofolato reductasa (DHFR) (Alberts et al., 2007).
- **Alteración de la vía EGFR:** EGFR es un receptor con actividad tirosina quinasa involucrado en una gran variedad de procesos celulares como la diferenciación, proliferación, supervivencia y transformación. Su sobreexpresión en células tumorales se asocia con un aumento de resistencia a la quimioterapia. Se ha propuesto que la activación constitutiva de las vías *downstream* EGFR como PI3K/Akt y MAPK también confieren resistencia a los fármacos cuya diana es EGFR (Gupta et al., 2011).
- **La resistencia a la muerte celular** juega un papel muy importante en el desarrollo de resistencias a los agentes antitumorales (Gupta et al., 2011).
- **Activación de NF- $\kappa$ B (Factor nuclear  $\kappa$ B):** NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que regula sobre 500 genes implicados en la inmunoregulación, la regulación del crecimiento, la inflamación, la carcinogénesis y la apoptosis. Varios estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que su activación constitutiva inhibe la apoptosis inducida por la quimioterapia en varios tumores (Gupta et al., 2011).
- **Activación constitutiva del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3)** confiere resistencia tumoral a los agentes quimioterápicos (Gupta et al., 2011).

### 3. LOS POLIFENOLES NATURALES EN LA TERAPIA CONTRA EL CÁNCER

---

El interés por el estudio de los polifenoles como compuestos anticancerosos, no radica solo en su efecto preventivo, si no también, porque se ha comprobado que actúan a distintos niveles de la oncogénesis y progresión tumoral. Por ello en este punto nos vamos a centrar únicamente en la utilidad de los polifenoles en el tratamiento del cáncer. Además, debido al gran número de polifenoles con efectos antitumorales, en este apartado nos centraremos en los cuatro más conocidos y estudiados y que actualmente están siendo utilizados en ensayos clínicos: RESV, QUER, CURC y EGCG.

Actualmente, la combinación de agentes con distintos mecanismos de acción y dianas terapéuticas específicas, se consideran más prometedores y eficaces en el tratamiento del cáncer que el uso de un solo agente quimioterápico (Mitsiades et al., 2011). De hecho, el éxito de muchas terapias dirigidas es debido a su eficacia cuando se utiliza en combinación con quimioterapia o radioterapia convencional, ya que de esta forma se pueden combatir los mecanismos de resistencia tumoral al tratamiento (Sawyers, 2007).

Sin embargo, aunque estas combinaciones son eficaces en modelos preclínicos, los resultados en ensayos clínicos no han sido alentadores. Esto sugiere que las células tumorales tratadas con fármacos específicos, se adaptan al bloqueo de estas dianas concretas por mecanismos de supervivencia alternativos. En este escenario es donde los polifenoles naturales pueden contribuir significativamente a mejorar la eficacia del tratamiento contra el cáncer (Asensi et al., 2011).

#### 3.1. Quimioterapia y radioterapia

El tratamiento del cáncer con agentes quimioterápicos y radioterapia tiene dos problemas principales. Por un lado el desarrollo de

resistencia con el tiempo y, por otro, la toxicidad inespecífica que se produce en las células normales. Estudios recientes sugieren que los polifenoles naturales pueden utilizarse como agentes sensibilizantes a la quimioterapia y a la radioterapia al inhibir las vías que dan lugar a la resistencia al tratamiento (Garg et al., 2005).

Se ha observado que en varios tipos de tumores, un gran número de polifenoles son capaces de disminuir la resistencia desarrollada a fármacos antitumorales mediada por proteínas MDR, proteínas asociadas a MDR (también denominadas MRPs) y/o por la disminución de los sistemas de supervivencia celulares. Entre ellos se encuentran RESV (Gupta et al., 2011; Wesolowska et al., 2010), QUER (Borska et al., 2010; Chen et al., 2010a), CURC (Shehzad et al., 2010; Wortelboer et al., 2003) y EGCG (Qian et al., 2005). Algunos de los ejemplos al respecto se citan a continuación.

En células humanas de mieloma múltiple el RESV inhibe la proliferación, induce la apoptosis y salva la quimiorresistencia al disminuir la activación de los factores de transcripción STAT3 y NF- $\kappa$ B (Bhardwaj et al., 2007). En otro estudio se ha observado que en la leucemia mieloide aguda, el RESV es capaz de revertir la resistencia a la doxorrubicina al disminuir la expresión de MRP1 (Kweon et al., 2010). Además, el uso concomitante de RESV con doxorrubicina desencadena senescencia independiente de p53 al inducir daño en el ADN mediado por el estrés oxidativo (Back et al., 2011).

La QUER es capaz de modular la actividad ATPasa de MRP1, MRP4 y MRP5, de hecho, se ha observado que entre otras acciones, es capaz de inhibirlas revirtiendo la resistencia a fármacos (Wu et al., 2005). Además, la QUER es capaz de inhibir el factor de supervivencia celular  $\beta$ -catenina, NF- $\kappa$ B, y la expresión de moléculas de señalización proliferativas como p-EGFR, NRas, Raf1, c-Fos, c-Jun y p-c-Jun en el cáncer de próstata (Senthilkumar et al., 2011).

En cáncer biliar, la CURC inhibe la expresión de proteínas de supervivencia como Bcl-2, Bcl-xl, XIAP, cFLIP, cIAP-1, cIAP-2 y survivina, y

de proteínas asociadas a la proliferación como la ciclina D1 y c-Myc (Prakobwong et al., 2011).

En cuanto a los polifenoles del té como la EGCG, son capaces de inhibir metaloproteinasas, varias proteínas quinasas y proteínas que regulan la replicación del ADN y la transformación celular. Además, como muchos otros polifenoles, inhiben la actividad del proteasoma en las células tumorales (Dou, 2009). El sistema de degradación ubiquitino-proteosómico juega un papel esencial en múltiples procesos celulares como la progresión del ciclo celular, la proliferación, la apoptosis y la angiogénesis (Goldberg, 2003). De hecho, se ha observado que el uso de inhibidores de este sistema sensibiliza a las células tumorales a la quimioterapia convencional. Por ello, el uso de polifenoles con este mecanismo de acción puede ser prometedor en la terapia contra el cáncer (Yang et al., 2008).

En conjunto, todos estos resultados indican que los polifenoles pueden influir en la biodisponibilidad de los fármacos antitumorales. Además, al interactuar con múltiples procesos de supervivencia celular como la senescencia, la apoptosis, o la autofagia, los polifenoles pueden influir en la respuesta de las células tumorales a múltiples terapias (Asensi et al., 2011; Delmas et al., 2011).

En cuanto a la radioterapia, se han publicado efectos radiosensibilizantes inducidos por los polifenoles. Por ejemplo, el tratamiento secuencial en células de melanoma con irradiación gamma para sobreexpresar el receptor TRAIL-R (Receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF), seguido del tratamiento con RESV, que disminuye la expresión de proteínas antiapoptóticas como cFLIP y Bcl-xl e induce la expresión del ligando TRAIL, da lugar a un aumento de la apoptosis en varias líneas de melanoma (Johnson et al., 2008). Además, en células iniciadoras de glioblastoma primario, el RESV disminuye la tumorigenicidad y aumenta la radiosensibilidad por un mecanismo dependiente de la inhibición de STAT3 (Yang et al., 2012).

En el caso de la CURC, se ha observado que induce la radiosensibilización en células de carcinoma escamoso por un

mecanismo dependiente de la enzima antioxidante tioredoxina reductasa-1 (Javvadi et al., 2010).

Además, se ha demostrado que algunos polifenoles, entre los que se incluyen genisteína, RESV, CURC, polifenoles del té verde o ácido cafeico, muestran protección frente a los efectos tóxicos de la quimio/radioterapia (Garg et al., 2005).

Todas estas evidencias muestran que los polifenoles que en un principio se consideraban agentes quimiopreventivos, pueden ser utilizados en el tratamiento del cáncer en combinación con quimioterapia y/o radioterapia aumentando su efectividad (Asensi et al., 2011). Más adelante se describirán posibles estrategias de tratamiento de este tipo en cánceres específicos.

### **3.2. Bioterapia**

Los polifenoles pueden mejorar la eficacia de la bioterapia o también llamada terapia biológica. En este caso, se ha sugerido que los polifenoles pueden restaurar o inducir la sensibilidad tumoral a la muerte inducida por TRAIL con mínimos efectos tóxicos para las células normales (Jacquemin et al., 2010).

Como ejemplo de ello, el tratamiento concomitante de TRAIL con CURC aumenta la apoptosis inducida por TRAIL en células de cáncer de próstata LNCaP (Deeb et al., 2003). Además, en ratones con xenoinjertos de esta misma línea, la CURC da lugar al aumento de la expresión de TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5, Bax, Bak, p21/WAF1 y p27/KIP1 y a la inhibición de la activación NF- $\kappa$ B con la consecuente disminución de sus productos génicos como la ciclina D1, Bcl-2 o Bcl-xl. Esto da lugar a la sensibilización de los tumores al tratamiento con TRAIL (Shankar et al., 2008). Se ha descrito también la sensibilización a la terapia con TRAIL en esta misma línea al administrarlo conjuntamente con EGCG (Siddiqui et al., 2008).

Con respecto al cáncer de próstata resistente al tratamiento con andrógenos, se ha observado que el RESV sensibiliza a las células PC-3 y DU-145 al tratamiento con TRAIL. El mecanismo molecular por el cual logra inducir la apoptosis incluye la disminución de la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-xl y survivina, y el aumento de la expresión de las proteínas proapoptóticas Bax, Bak, PUMA, Noxa y Bim, así como de receptores de muerte celular como TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5. Además induce la producción de radicales libres que promoverán la apoptosis (Shankar et al., 2007b).

Por otro lado, en células de carcinoma de colon, la administración conjunta de RESV, TNF, anticuerpos anti-CD95 y TRAIL activan la muerte celular por apoptosis evitando la inhibición de ésta por la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Delmas et al., 2004). Sin embargo, se ha observado que la combinación de RESV con TRAIL puede ser ineficaz en el tratamiento de los tumores que presentan sobreexpresión de Bcl-2 y defectos en la activación de los receptores de muerte (Fulda and Debatin, 2005). También se ha observado un aumento de la sensibilización de las células de cáncer colón a la apoptosis inducida por TRAIL al ser éste administrado con QUER (Psahoulia et al., 2007).

En vista de todas estas evidencias experimentales, podemos concluir que los polifenoles pueden sensibilizar a las células TRAIL resistentes, y aumentar la apoptosis inducida por éste ligando. Sin embargo, estos efectos dependen del tipo celular, el polifenol concreto utilizado, las condiciones del tratamiento y/o el microambiente tumoral (Asensi et al., 2011).

### **3.3. Melanoma**

El melanoma es el menos común de los cánceres de piel, sin embargo, causa la mayoría de las muertes (75%) debidas a este tipo de cáncer ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)). Su tratamiento, dependiendo del estadio clínico, incluye la extirpación quirúrgica, quimio- e inmunoterapia, o radioterapia. Sin embargo, en pacientes con metástasis, el melanoma se

considera generalmente incurable y menos del 5% de casos sobrevive a los 5 años tras su diagnóstico (Cummins et al., 2006).

Aunque el uso de polifenoles naturales como agentes quimiopreventivos en el cáncer de piel tiene un gran soporte experimental preclínico (Jensen et al., 2010; Nichols and Katiyar, 2010), sus posibles aplicaciones para su uso sistémico en el tratamiento del melanoma permanecen en un estadio preliminar. Algunos ejemplos se muestran a continuación.

Se ha observado que la administración de genisteína previene la generación de metástasis de la línea celular de melanoma murino B16-BL6, *in vitro* e *in vivo*, al inhibir la proteína tirosina quinasa (PTK) implicada en la inducción de la adhesión y la diseminación celular (Yan and Han, 1997). En esta misma línea, la administración intraperitoneal de QUER y apigenina inhibe el crecimiento celular, la invasión y las metástasis pulmonares (Caltagirone et al., 2000).

Además, la administración intraperitoneal de EGCG en combinación con dacarbazina en ratones con la línea de melanoma B16-F3m reduce el crecimiento del tumor primario y las metástasis pulmonares aumentando la supervivencia de los ratones. En este caso, el mecanismo de acción de la EGCG está asociado a la inhibición de la diseminación celular, de las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, de la quinasa de adhesión focal (FAK) y de la metaloproteinasa-9 (MMP-9) (Liu et al., 2001).

Por otro lado, la administración oral de CURC y catequina (Menon et al., 1995) así como la de los flavonoides tangeretina, rutina y diosmina (Martinez Conesa et al., 2005), inhibe las metástasis pulmonares de la línea celular de melanoma murino B16-F10. Así mismo, la administración intravenosa del polifenol pterostilbeno junto con QUER en ratones portadores de tumores de la misma línea, disminuye en un 75% la aparición de metástasis hepáticas. La acción antimetastásica es debida a: la inhibición por el pterostilbeno de la expresión de la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en el endotelio sinusoidal hepático, lo cual implica la disminución de la adhesión celular al endotelio mediante la

activación tardía del antígeno 4 (VLA-4); y la inhibición por ambos de la expresión de la proteína Bcl-2 en las células metastásicas, lo cual las sensibiliza a la citotoxicidad inducida por el epitelio vascular (Ferrer et al., 2005). La disminución de esta proteína está mediada por la liberación de óxido nítrico generado en el endotelio vascular que inducen ambos polifenoles (Ferrer et al., 2007).

Estudios más recientes muestran también como la EGCG sensibiliza a las células de melanoma al tratamiento con interferón en ratones atímicos implantados con tumores de melanoma humano. Esto da lugar a la inhibición del crecimiento celular (debido a la inducción de la parada del ciclo celular) y la inducción de la apoptosis (Nihal et al., 2009).

Considerando estas y otras publicaciones, las terapias dirigidas a dianas concretas para el tratamiento del melanoma en fase avanzada, introducidas recientemente, como el ipilimumab (anticuerpo que aumenta la activación de linfocitos T) (Sondak et al., 2011) o el vemurafenib (inhibidor selectivo de B-raf) (Bollag et al., 2010), podrían ser opciones ideales para combinar con los polifenoles naturales en el tratamiento del melanoma (Asensi et al., 2011).

### **3.4. Cáncer colorrectal**

El cáncer colorrectal es el tercer cáncer con mayor incidencia en el mundo ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)). En estadios iniciales (Fase I y II) es frecuentemente curable por extirpación quirúrgica. Sin embargo, si no se trata se disemina a los ganglios linfáticos (Fase III) y puede dar lugar a metástasis (Fase IV), siendo en este caso la curación muy infrecuente. De hecho, en un periodo de 5 años tras el diagnóstico, solo sobreviven entre 5-10% de los pacientes (Puppa et al., 2010).

Varias investigaciones sugieren que la administración oral en ratas de catequinas del té verde, incluso a bajas dosis, es muy efectiva en la prevención del cáncer de colon inducido químicamente (Narisawa and Fukaura, 1993; Yamane et al., 1991). Algunos de los mecanismos implicados en este efecto preventivo son la inhibición de la angiogénesis

y la metástasis, la detención del crecimiento celular y la inducción de la apoptosis, mediante la regulación de múltiples vías de señalización. En concreto, la EGCG regula la expresión de VEGF, implicado en la angiogénesis, metaloproteinasas (implicadas en la diseminación tumoral), EGFR, y proteínas reguladoras del ciclo celular. Además, inhibe rutas de proliferación y supervivencia como NF- $\kappa$ B, PI3K/Akt, MAPK y AP-1 (Proteína activadora 1) (Shankar et al., 2007a). En otro estudio en el que se utiliza un modelo ortotópico de cáncer de colon, la administración oral de EGCG a altas dosis tiene también un efecto preventivo, en este caso en la aparición de metástasis hepáticas y pulmonares, y este efecto puede ser parcialmente debido a la activación de la vía de señalización Nrf2 (factor relacionado con el factor nuclear eritroide-2), ruta que regula la expresión de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes (Yuan et al., 2007).

En algunos estudios, pequeñas dosis de RESV, administradas profilácticamente, también reducen o previenen el desarrollo de tumores en el colon y en el intestino de ratas a las que se las ha tratado previamente con varios carcinógenos (Athar et al., 2007).

Estos resultados junto con los de otros estudios en los que se utilizan varios polifenoles, demuestran que estos compuestos pueden ser útiles en la prevención del cáncer colorrectal (Pan et al., 2011a; Rudolf et al., 2007). Sin embargo, al igual que en el caso del melanoma, hay muy pocos estudios sobre la posible eficacia de los polifenoles en el tratamiento del cáncer colorrectal invasivo/metastásico. Algunos ejemplos se citan a continuación.

Estudios *in vitro* e *in vivo* con diferentes estilbenos, han demostrado que su acción antitumoral en el tratamiento del cáncer de colon puede ser debida a sus efectos sobre proteínas implicadas en la proliferación celular, ya que se ha observado que disminuyen la expresión de PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), y aumentan la expresión del inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas p27 (Paul et al., 2010). Además, la administración intraperitoneal de EGCG, galocatequina galato y genisteína, produce una reducción

significativa de las metástasis pulmonares de la línea de cáncer de colon murino 26-L5, en un 77, 46 y 44%, respectivamente (Ogasawara et al., 2007).

Por otra parte, la CURC, sensibiliza a las células de cáncer de colon a los efectos antitumorales y antimetastásicos de la capecitabina (precursor del citotóxico 5-fluorouracilo), al inhibir la vía de señalización de NF- $\kappa$ B (Kunnumakkara et al., 2009). Además, la combinación en estudios preclínicos de este polifenol con dasatinib (un inhibidor de la familia de quinasas Src que participan en rutas de supervivencia celular), aumenta la efectividad del tratamiento produciendo un 95% de regresión tumoral que se debe a la disminución de la proliferación y un aumento de la apoptosis (Nautiyal et al., 2011).

Recientemente, otros estudios preclínicos utilizando xenoinjertos en ratón de la línea de cáncer colorrectal humano HT29, demuestran que la administración combinada de pterostilbeno, QUER, FOLFOX6 (oxaliplatino, leucovorina y 5-fluorouracilo) y radioterapia, elimina el crecimiento tumoral aumentando la supervivencia de los ratones. Este mecanismo está mediado por la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) y por la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Priego et al., 2008).

Además, actualmente están activos varios ensayos clínicos en fase I y II, y alguno que se acaba de completar recientemente, en los que se está utilizando la administración oral de diferentes polifenoles como el RESV y la CURC en pacientes con cáncer de colon/colorrectal/rectal. También se están realizando ensayos clínicos combinando la CURC con otros agentes quimioterápicos como la gemcitabina (Fase III) o FOLFOX (Fase I, II) ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

Todos estos datos sugieren que la administración de los polifenoles puede mejorar la eficacia de la quimio/radioterapia convencional dando lugar a la regresión del cáncer colorrectal.

### 3.5. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer que causa la mayor tasa de mortalidad en el mundo, tanto en hombres como en mujeres ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)). El cáncer de pulmón se clasifica en dos tipos principales: cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico (NSCLC). De los dos, el que mejor responde al tratamiento con quimioterapia y radiación es el SCLC, siendo por tanto su pronóstico mejor que para el NSCLC ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)).

En cuanto a la relación del cáncer de pulmón con los polifenoles, hay varios estudios que demuestran sus efectos protectores. Por ejemplo, la administración oral en ratas de polifenoles del té verde antes de exponerlas a un carcinógeno, protege en un 40% de la aparición de cáncer de pulmón (Katiyar et al., 1993). La administración de una infusión de té verde también reduce el número de tumores pulmonares de células de carcinoma murino de Lewis en un modelo de metástasis espontánea (Sazuka et al., 1995). En cuanto a los polifenoles del té negro, su administración tras una dosis de un carcinógeno del tabaco, inhibe la progresión del adenoma de pulmón a adenocarcinoma, demostrando la actividad antiproliferativa y preventiva de estos compuestos (Yang et al., 1997). Estos resultados se corroboraron en otro estudio en el que además de polifenoles del té negro se utilizaron polifenoles del té verde, tanto antes de la exposición al carcinógeno como después, demostrando, como el estudio anterior, su acción preventiva y antitumoral. Sin embargo, las concentraciones necesarias para producir este efecto, son muy altas y por tanto inalcanzables en humanos (Yang et al., 1998).

No obstante, al combinar los polifenoles del té verde, a dosis más bajas, con atorvastatina, se inhibe la tumorigénesis pulmonar inducida químicamente en ratones. Además, esta combinación disminuye el crecimiento de las líneas celulares de carcinoma de pulmón humano H1299 y H460. Ambos efectos son debido a un aumento de la apoptosis y a una disminución de la proteína antiapoptótica Mcl-1 (Lu et al., 2008). En este sentido, también el tratamiento combinado del polifenol

genisteína con ciclofosfamida es efectivo en el tratamiento de ratones con carcinoma pulmonar de Lewis, aunque en este caso no con efecto citostático o citotóxico, sino con efecto antiangiogénico (Wietrzyk et al., 2001). En un modelo murino con esta misma línea de cáncer de pulmón, la administración intravenosa de QUER liposomada (para mejorar su biodisponibilidad *in vivo*) mostró una inhibición significativa del crecimiento tumoral y un aumento de la supervivencia al inhibir la angiogénesis e inducir la apoptosis (Yuan et al., 2006).

Curiosamente, también se han visto efectos antitumorales al combinar varios polifenoles entre ellos. Por ejemplo, la combinación de epicatequina y CURC *in vitro*, en células humanas de cáncer de pulmón (A549 y PC9), aumenta la inhibición del crecimiento celular en comparación con la que producen ambos polifenoles por separado (Saha et al., 2010). Efectos similares se han visto al combinar luteolina con EGCG (Amin et al., 2010).

En cuanto a ensayos clínicos con polifenoles en el cáncer de pulmón, actualmente hay un estudio abierto para pacientes sanos y fumadores en el que se pretende determinar si los polifenoles del té verde disminuyen el riesgo de sufrir cáncer de pulmón. Otro estudio con extracto de té verde, que está actualmente en fase I, se está llevando a cabo para comprobar los efectos de estos polifenoles en pacientes con SCLC ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

### **3.6. Otros cánceres**

Los efectos antitumorales de los polifenoles y sus posibles aplicaciones clínicas, han sido también estudiados a diferentes niveles en otros cánceres entre los que se incluyen el cáncer de mama, el de próstata, el de páncreas, el de estómago, el hepático, el de cérvix, de ovario, de testículos, de cara y cuello, de cerebro y en linfoma (Korkina et al., 2009; Ramos, 2008; Sliva, 2008).

En resumen, los polifenoles son compuestos prometedores en la prevención y el tratamiento del cáncer debido a que interfieren en la

iniciación, desarrollo y progresión del cáncer, al modular: factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, AP-1, Nrf2 o STAT3; proteínas pro- y antiapoptóticas; proteínas implicadas en el ciclo celular; moléculas de adhesión; factores de crecimiento y vías de señalización de proteínas quinasas como EGFR, MAPK o PI3K/Akt; y moléculas implicadas en la angiogénesis y la metástasis tumoral (Aggarwal and Shishodia, 2006; Ramos, 2008).

## 4. EL PTEROSTILBENO, UN ANÁLOGO NATURAL DEL RESVERATROL, EN LA TERAPIA CONTRA EL CÁNCER

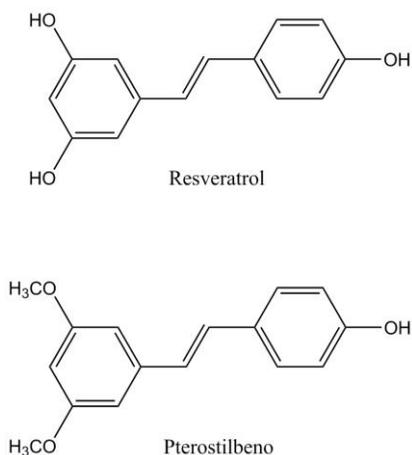
---

### 4.1. Origen, clasificación y estructura química

El pterostilbeno (PTER) (3,5-dimetoxi-4'-hidroxiestilbeno), es un polifenol natural perteneciente a la familia de los estilbenos. Aunque inicialmente se aisló del duramen (corazón del tronco) del sándalo rojo (*Pterocarpus sandalinus*) (Spath and Schlager, 1940), también se produce en otras plantas del mismo género como el *Pterocarpus marsupium* (kino de la india), un árbol originario de la India, Nepal y Sri Lanka, cuyo duramen ha sido utilizado en la medicina tradicional por sus propiedades medicinales (Maurya et al., 2004). El PTER también se encuentra en las hojas de *Vitis vinifera* (Langcake et al., 1979), y en frutos como los arándanos (Rimando et al., 2004), y algunos tipos de uvas entre las que se encuentran las variedades *Chardonnay* y *Gamay* (Adrian et al., 2000b) cuando se encuentran infectadas por hongos, y las variedades sanas e inmaduras de *Pinot noir* y *Gamay* (Pezet and Pont, 1988). Sin embargo, el PTER no se ha encontrado en ningún vino tinto (Adrian et al., 2000a). Otra planta en la que se ha descubierto este polifenol es *Guibourtia tessmanii*, una planta con flores que se encuentra en África central y se utiliza en la medicina popular (Fuendjiep et al., 2002). Además,

curiosamente, se ha identificado al PTER como el compuesto fenólico mayoritario de la “darakchasava”, una bebida medicinal hindú utilizada como cardiotónico y para el tratamiento de otras enfermedades, cuyo principal ingrediente son las hojas de *Vitis vinífera* (Paul et al., 1999).

El PTER comparte muchas similitudes químicas, fisiológicas y farmacológicas con otro estilbeno, el RESV. Químicamente, el PTER es un análogo estructural del RESV (contiene dos grupos metoxilo, en vez de hidroxilo en las posiciones 3 y 5 del segundo anillo), sin embargo, el PTER conserva las propiedades estructurales del RESV responsables de su capacidad antioxidante y antitumoral (grupo hidroxilo en posición 4 y su configuración *trans*) (Stivala et al., 2001) (**Ilustración 14**). Fisiológicamente, ambos son fitoalexinas. Farmacológicamente, ambos tienen efectos antioxidante, antienvjecimiento, antiinflamatorio, antitumoral, antidiabético, cardioprotector y neuroprotector (Kapetanovic et al., 2011; Lin et al., 2009). El PTER y el RESV existen como isómeros geométricos: *cis* y *trans*, pero normalmente, en la naturaleza los encontramos mayoritariamente en la forma *trans* que, como se ha indicado, es la responsable de su capacidad antioxidante y antitumoral. Ambos isómeros de ambos compuestos pueden existir en forma libre o unidos a glucosa (Estrela et al., 2013).



**Ilustración 14: Estructura química del RESV vs. PTER**

## 4.2. Biodisponibilidad del pterostilbeno vs. resveratrol

Tal y como se ha visto en el punto 1.3, la baja disponibilidad y la rápida metabolización es un factor limitante para la bioactividad de los polifenoles. De hecho, a pesar de algunas excepciones, los polifenoles en su forma nativa son biológicamente más activos que sus metabolitos (Asensi et al., 2011).

En el caso del RESV, además de presentar una baja absorción intestinal tras su administración oral, es extensa y rápidamente metabolizado *in vivo* (Kapetanovic et al., 2011). El RESV sufre en el intestino reacciones de glucuronidación (Kuhnle et al., 2000), sulfatación e hidrogenación por la microbiota intestinal (Walle, 2004). Tras ser absorbido, sufre este tipo de reacciones metabólicas a nivel hepático (de Santi et al., 2000), por tanto, sus metabolitos mayoritarios encontrados en plasma son el glucurónido y el sulfato. Esta conjugación, afecta mayoritariamente a los oxígenos de las posiciones 3 y 4' de los anillos aromáticos (Wang et al., 2004). Siendo más favorable en la posición 3 y más desfavorable cuando la molécula presenta una configuración *trans* (Aumont et al., 2001).

De forma similar, los metabolitos mayoritarios del PTER son también el glucurónido y el sulfato que han sido detectados en plasma y orina. De hecho, tras su administración oral, se han identificado en orina de ratón nueve metabolitos del PTER: PTER glucurónido, PTER sulfato, PTER glucurónido mono-desmetilado, PTER sulfato mono-desmetilado, PTER mono-hidroxilado, PTER glucurónido mono-hidroxilado y PTER sulfato-monohidroxilado (Remsberg et al., 2008; Shao et al., 2010).

El PTER muestra un perfil farmacocinético mejor que el RESV. La principal diferencia entre el PTER y el RESV es su estructura química. Mientras que el PTER contiene dos grupos metoxilo en las posiciones 3 y 5 y solo un hidroxilo en posición 4', el RESV contiene tres grupos hidroxilo (**Ilustración 14**). Los dos grupos metoxilo del PTER lo hacen más lipófilo aumentando su **biodisponibilidad** por vía oral (Estrela et al., 2013). Además, debido a la presencia del grupo metoxilo en la posición 3, el

PTER no puede ser glucuronidado o sulfatado en esta posición por lo que presenta una mayor **vida media** que el RESV con mayor número de posiciones disponibles para ser conjugado (Dellinger et al., 2013). Estas diferencias farmacocinéticas, están avaladas por varios estudios que se mostrarán a continuación.

Se ha observado que tras su administración intravenosa, tanto el PTER como el RESV alcanzan sus concentraciones máximas a los 5 min. Sin embargo, mientras que el PTER tarda 480 min en desaparecer completamente, el RESV solo tarda 60 min. Al calcular con estos datos la vida media de ambos polifenoles en plasma, observamos que para el PTER es de 77.9 min, mientras que para el RESV es de 14.4 min, es decir, el PTER tiene una vida media 7 veces mayor que el RESV (Ferrer et al., 2005). Datos similares se obtuvieron en estudios posteriores confirmando que el PTER muestra mejores características farmacocinéticas que el RESV (Lin et al., 2009; Remsberg et al., 2008).

En cuanto a la biodisponibilidad oral de ambos polifenoles, también es mayor para el PTER (80%) que para el RESV (20%) (Kapetanovic et al., 2011). En este estudio también se ha observado que tras la administración oral del PTER encontramos mayores niveles plasmáticos de PTER y PTER sulfato y menores niveles de PTER glucuronido, en comparación con los niveles plasmáticos del RESV y sus metabolitos. Sin embargo, en ambos casos se observa una concentración plasmática mayor de los metabolitos que de los compuestos en su forma nativa. Además, tras la administración de PTER, no se detectó RESV, descartando la posibilidad de que el PTER sea un profármaco del RESV.

Por lo tanto, el PTER, debido a su mejor farmacocinética, es una buena alternativa al RESV en la prevención y tratamiento de varias enfermedades, ya que, a dosis equimolares, la actividad biológica *in vivo* del PTER debería ser mayor (Kapetanovic et al., 2011). De hecho, en estudios *in vitro*, El PTER muestra una actividad farmacológica más potente que el RESV (Billack et al., 2008; Chakraborty et al., 2010; Ferrer et al., 2005).

### 4.3. Toxicidad

En junio del 2011, la compañía ChromaDex® (Industria farmacéutica especializada en investigación, desarrollo y venta de productos naturales), obtuvo el estatus de GRAS (*Generally Recognized as Safe*), “generalmente reconocido como seguro”, por la FDA (U.S. Food and Drug Administration) para su compuesto pTeroPure®, forma comercial del PTER ([www.fda.gov](http://www.fda.gov)). Para que un compuesto alcance dicho estatus ha de ser sometido a un extenso estudio de sus características toxicológicas, sus usos propuestos y su seguridad por un grupo independiente de expertos y concluir que el compuesto es seguro para su uso en bebidas y en productos alimenticios. La dosis diaria permitida para el pTeroPure es de hasta 30mg/kg peso (<https://chromadex.com/NewsEventDetail.aspx?Aid=510>).

Uno de los ensayos en los que se basó la FDA para la aprobación de este compuesto fue el publicado por Ruiz y cols., en el año 2009 (Ruiz et al., 2009). En este estudio se evaluaba la toxicidad de dosis altas de PTER durante 28 días de administración oral, mezclado con la comida, en ratones. Las dosis administradas fueron de 30, 300 y 3000mg/kg de ratón y por día. Al extrapolar estas dosis de ratones a humanos, equivalen a 5, 50 y 500 veces más, respectivamente, que el consumo medio estimado para este polifenol (25mg/día) en humanos. Con ninguna de estas dosis se observó mortalidad durante el tiempo que duró el experimento. Además, no hubo una alteración importante del peso de los animales, ni modificaciones importantes en los parámetros bioquímicos. Por tanto este estudio demuestra que la administración oral diaria de PTER a altas dosis no es tóxica.

Recientemente (Septiembre 2012) ha concluido un ensayo clínico llevado a cabo en el centro médico de la Universidad de Mississippi (EEUU) cuyo objetivo era evaluar el efecto de PTER en los niveles de colesterol, la presión sanguínea y el estrés oxidativo (*Effect of Pterostilbene on Cholesterol, Blood Pressure and Oxidative Stress*; [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Los resultados de este estudio demuestran que el

PTER reduce la presión sanguínea a una dosis oral de 125mg dos veces al día, es decir 250mg/día (equivale a 30mg/kg ratón/día), durante 6-8 semanas. Además, a partir de este ensayo se concluye que la administración oral de hasta 250mg/día de PTER a largo plazo es segura en humanos (Riche et al., 2013).

En cuanto a la toxicidad del PTER tras su administración intravenosa, tan solo ha sido evaluada en ratones. En un estudio, llevado a cabo por Priego y cols. (Priego et al., 2008), en el que se administraba el PTER conjuntamente con QUER y quimioterapia estándar para el tratamiento del cáncer colorectal en ratones con xenoinjertos, se administraron dosis IV de 20 y 30mg/Kg ratón y día. Estas dosis se administraron durante 23 días y ninguna mostró toxicidad sistémica u órgano específica, por lo que son farmacológicamente seguras.

#### **4.4. Aplicaciones biomédicas del pterostilbeno**

El PTER, al ser un análogo estructural del RESV, muestra muchas de las propiedades farmacológicas de éste, pero además, tiene las suyas propias (2010).

Entre los efectos farmacológicos del PTER se encuentran la prevención y el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades como el cáncer (Billack et al., 2008; Ferrer et al., 2005; Pan et al., 2007; Pan et al., 2009; Priego et al., 2008; Remsberg et al., 2008; Rimando and Suh, 2008; Suh et al., 2007), las dislipemias (Rimando et al., 2005), la diabetes (Amarnath Satheesh and Pari, 2006; Manickam et al., 1997), las enfermedades cardiovasculares (Paul et al., 1999), las enfermedades neurodegenerativas (Meng et al., 2008) y el dolor (Remsberg et al., 2008). Además, tiene propiedades antibacterianas (Pastorkova et al., 2013), antifúngicas (Jeandet et al., 2002; Kingsbury et al., 2012) y antivíricas (Gastaminza et al., 2010). Debido a que el PTER es un potente agente antioxidante (Amorati et al., 2004; Remsberg et al., 2008; Rimando et al., 2002) y antiinflamatorio (Hougee et al., 2005; Pan et al.,

2008; Remsberg et al., 2008), tiene también la capacidad de mitigar los efectos de la edad en individuos sanos (Joseph et al., 2008).

#### **4.4.1. Actividad antioxidante y antiinflamatoria**

Se ha demostrado que el PTER presenta una actividad antioxidante significativamente comparable *in vitro* con la del RESV. El primer estudio que se realizó al respecto fue llevado a cabo por Rimando y cols. (Rimando et al., 2002), y mostraba que la capacidad del PTER para eliminar los radicales libres del peróxido, era muy similar a la del RESV. Además, se observó que ambos compuestos eran más efectivos que el Trolox como agentes antioxidantes. Sin embargo, el PTER mostró una actividad antiinflamatoria moderada con respecto al RESV, ya que este último es capaz de inhibir fuertemente la actividad de las dos isoformas de la ciclooxigenasa (COX), la COX-1 y la COX-2, mientras que el PTER lo hace de una forma más débil. Estudios más recientes confirman la capacidad antioxidante del PTER que parece ser concentración dependiente (Remsberg et al., 2008).

Otro estudio en el que se midió la actividad antioxidante de derivados *cis* y *trans* del hidroxiestilbeno, incluyendo el PTER y el RESV, demostró que estos compuestos se comportan como antioxidantes suaves, siendo mayor la actividad de los isómeros *trans* que la de los *cis* (Amorati et al., 2004).

En cuanto a estudios *in vivo*, el PTER aumenta la actividad superóxido dismutasa, catalasa, glutatión (GSH) peroxidasa, GSH S-transferasa y GSH reducido en ratas con diabetes mellitus tipo II inducida por estreptozocina y nicotinamida. Además, normaliza los niveles de peroxidación lipídica que se encuentran aumentados en las ratas con esta enfermedad (Amarnath Satheesh and Pari, 2006). Este estudio por tanto indica que el PTER también tiene actividad antioxidante *in vivo*.

Otros estudios sugieren que puede existir una relación entre la estructura química y el efecto antioxidante. De hecho, los estilbenos con un grupo hidroxilo en la posición 4' muestran mayor actividad

antioxidante (Hasiah et al., 2011). Por otro lado se ha visto que el RESV (con tres grupos hidroxilo) neutraliza las ROS en la sangre y en linfoblastos aislados, mientras la pinosilvina (con dos grupos hidroxilo) actúa principalmente frente a los ROS intracelulares, y el PTER (con dos grupos metoxi y un grupo hidroxilo) neutraliza los ROS extracelulares. Estos últimos son los responsables, entre otras cosas, del daño tisular durante la inflamación crónica, ello contribuye a la acción antiinflamatoria del PTER (Perecko et al., 2008).

Además, hay un creciente número de estudios que aseguran que los polifenoles, entre ellos el PTER, además de tener acción antioxidante directa, muestran una acción indirecta que sería biológicamente más importante. De hecho se ha observado que regulan factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, AP-1, o Nrf2 así como cambios en la acetilación de las histonas. Esto, entre otras cosas, activa de forma indirecta la defensa antioxidante celular (Sies, 2010; Stevenson and Hurst, 2007).

En cuanto a la acción antiinflamatoria del PTER, en el estudio de Rimando y cols. mencionado anteriormente (Rimando et al., 2002), se observó que el PTER inhibía la síntesis de prostaglandinas, lo cual está relacionado con la actividad quimiopreventiva del cáncer que posee este polifenol. Esto fue corroborado por un estudio en un modelo de colitis *in vitro*, en el que se demostró que el PTER inhibía la producción del prostaglandina E2 (Remsberg et al., 2008). Además en este mismo estudio se muestra que el PTER es capaz de disminuir los niveles de TNF- $\alpha$ , citoquina implicada en la inflamación sistémica y cuyo incremento está relacionado con enfermedades cardiovasculares y con el cáncer. El PTER también está implicado en la disminución la expresión de los genes iNOS (óxido nitroso sintasa inducible) y COX-2 implicados en la inflamación (Pan et al., 2008).

#### 4.4.2. Actividad antitumoral

Actualmente existe mucha información sobre los mecanismos celulares por los cuales los polifenoles naturales interfieren en la carcinogénesis, el crecimiento tumoral y la metástasis. Los polifenoles, entre ellos el PTER, pueden ser efectivos, tal y como se ha nombrado en puntos anteriores, en la prevención y el tratamiento del cáncer debido a sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios, así como por sus efectos sobre dianas concretas en vías de muerte y proliferación celular, en la angiogénesis y sobre los mecanismos de quimio y radioresistencia (Asensi et al., 2011; Estrela et al., 2013).

En el caso del PTER, existen numerosas evidencias que demuestran su potencial en el tratamiento y la prevención del cáncer de colon, mama, hígado, pulmón, piel (incluyendo el melanoma), páncreas, próstata, estómago, vejiga y en la leucemia *in vitro* y/o *in vivo* (McCormack and McFadden, 2012).

En este contexto, Wang y cols. (Wang et al., 2012) publicaron que el PTER inhibe el crecimiento celular de dos líneas de cáncer de mama (una positiva y otra negativa para receptores de estrógenos) al inducir simultáneamente apoptosis, parada de ciclo celular, y autofagia (como mecanismo citoprotector). La inducción de apoptosis por el PTER en este tipo de cáncer *in vitro* ha sido corroborada por otros estudios (Alosi et al., 2010; Moon et al., 2013). El PTER también inhibe el crecimiento celular induciendo apoptosis en cáncer de pulmón (Schneider et al., 2010) y de próstata *in vitro* (Chakraborty et al., 2010), y en el de páncreas (McCormack et al., 2012), melanoma (Ferrer et al., 2005) y colon *in vivo* e *in vitro* (Priego et al., 2008). Según estos estudios, la apoptosis inducida por el PTER se produce fundamentalmente por activación de la vía intrínseca. En concreto el PTER disminuye la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xl, y aumenta la expresión de proteínas proapoptóticas como Bax, Bad, Bid, y de la enzima MnSOD. Todo ello da como resultado la despolarización mitocondrial y el aumento de la actividad caspasa y PARP. Además, el PTER puede inducir muerte celular por apoptosis mediante la activación simultánea de la vía extrínseca. El

PTER activa la vía extrínseca al aumentar la expresión del ligando Fas. Esta superposición se ha observado que ocurre, por ejemplo, en líneas celulares *in vitro* de cáncer de estómago (Pan et al., 2007) y en líneas tumorales de leucemia multidrogosresistentes (Tolomeo et al., 2005). En este último estudio, se demuestra, además, que el PTER puede ser útil en el tratamiento de neoplasias hematológicas resistentes al tratamiento.

En un estudio células humanas de carcinoma de vejiga sensibles y resistentes a la terapia antitumoral, el PTER inhibe el crecimiento celular al inducir inicialmente autofagia, mediada por la inhibición de mTOR y la activación de la vía MAPK/ERK, y posteriormente apoptosis (Chen et al., 2010b). Esto demuestra que el PTER puede dar lugar a la muerte celular por diferentes vías. Sin embargo, aunque algunos estudios han sugerido, al igual que Chen y cols., que el PTER induce autofagia en varios tipos de líneas tumorales, estas observaciones se basan en la acumulación de LC3-II y autofagosomas (Chakraborty et al., 2010; Chen et al., 2010b; Wang et al., 2012), lo cual no es suficiente para demostrar la muerte celular por autofagia. Para ello, además, hay que evaluar que el flujo autofágico no se encuentra alterado mediante el análisis de los niveles de p62/SQSTM1 (Klionsky et al., 2008; Mizushima and Yoshimori, 2007).

En algunos de los estudios citados anteriormente, se demuestra la acción reguladora del PTER sobre el ciclo celular. El polifenol tiene la capacidad de inducir parada de ciclo e inhibir proteínas del ciclo celular como las ciclinas A, B y D, quinasas dependientes de ciclinas (CDK2, CDK4 y CDK6) y proteínas reguladoras como pRb. Por el contrario, aumenta la expresión de inhibidores de CDKs como p16, p21, p27 y p53 (Chen et al., 2010b; Pan et al., 2007; Tolomeo et al., 2005).

Además, el PTER *in vitro*, inhibe los efectos proliferativos de la leptina (hormona implicada en la obesidad) en células tumorales de mama tanto positivas como negativas para receptores de estrógenos. Esta reducción de la proliferación es debida a la inhibición de la vía de señalización JAK/STAT3 cuya activación constitutiva está implicada en la carcinogénesis y, en este caso, en el desarrollo del cáncer de mama

relacionado con la obesidad sugiriendo, por tanto, una posible aplicación terapéutica del PTER en este tipo de cáncer (McCormack et al., 2011).

En cuanto a los sistemas de metabolización, se ha observado que el PTER inhibe la isoforma CYP1A1, de la superfamilia del citocromo P450 que está implicada en la activación de procarcinógenos químicos (Mikstacka et al., 2007). Ello implica que el PTER reduce el riesgo de mutagénesis y por tanto, de padecer cáncer.

El PTER regula también múltiples vías relacionadas con la capacidad metastásica de las células tumorales de mama (Chakraborty et al., 2010; Pan et al., 2011b), hígado (Pan et al., 2009), y melanoma (Ferrer et al., 2005). De hecho, estos estudios demuestran que el PTER inhibe la migración y adhesión celular *in vitro* y reduce la aparición de metástasis *in vivo*, así como, la neoangiogénesis. Algunos de los mecanismos implicados son, la inhibición de MMP-9, la inhibición de la vía de señalización p38, la disminución de los niveles de VEGFR, la disminución de la expresión de VCAM-1, y la inhibición de NF- $\kappa$ B, AP-1, la proteína quinasa C, o las vías PI3K/Akt, y MAPK.

Estos datos demuestran significativamente los efectos beneficiosos del PTER en el tratamiento y prevención del cáncer, por lo que es necesario seguir investigando los mecanismos de acción que subyacen a sus efectos antineoplásicos.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---



El desarrollo de moléculas y estrategias terapéuticas llevado a cabo en los últimos años no ha conseguido avances importantes en el tratamiento de cánceres agresivos en estadios avanzados, particularmente en aquellos asociados a altas tasas de mortalidad. Por esta razón, es necesario desarrollar nuevas moléculas, buscar nuevas dianas, y nuevas aproximaciones terapéuticas.

Los polifenoles son un grupo de compuestos químicos de origen vegetal con efectos beneficiosos para la salud. Se ha observado que tienen, entre otros, efectos favorables en la prevención y tratamiento del cáncer (Lambert et al., 2005). Los mecanismos que subyacen a sus efectos antitumorales han sido estudiados extensamente e incluyen efectos antioxidantes, proapoptóticos, proautofágicos, antiangiogénicos, inmunoestimulantes y daño en el ADN (Asensi et al., 2011).

Un problema fundamental en el tratamiento del cáncer es lograr eliminar las células capaces de desarrollar quimio/radioreistencia. La evasión de la apoptosis representa uno de los mayores obstáculos debido a que es el principal mecanismo de acción de la mayoría de los fármacos antitumorales clásicos (Hanahan and Weinberg, 2011). Por esta razón, en los últimos años, el estudio sobre otros tipos de muerte celular como la autofagia, la muerte celular lisosomal y la necrosis está cobrando mayor importancia (Kroemer and Jaattela, 2005; Yang et al., 2011a).

El interés de la permeabilización lisosomal como mecanismo antitumoral reside en las alteraciones que sufren las células tumorales a nivel de tráfico y volumen lisosomal, así como, en la expresión de hidrolasas lisosomales (Fehrenbacher and Jaattela, 2005). Estas alteraciones se correlacionan con el desarrollo de un crecimiento invasivo y la angiogénesis (Joyce et al., 2004) y con el desarrollo de resistencia a la terapia oncológica (Larsen et al., 2000). Además, la permeabilización de la membrana lisosomal y la liberación masiva de las hidrolasas que contiene al citosol, es un potente inductor de mecanismos de muerte celular dependientes e independientes de caspasas (Boya and Kroemer, 2008). Por todo ello, la utilización de agentes inductores de la

permeabilización de la membrana lisosomal sería una buena opción en las terapias antitumorales.

El RESV, uno de los polifenoles más investigados, posee funciones protectoras frente a la carcinogénesis y una clara capacidad antitumoral (Delmas et al., 2011), por lo que este polifenol se ha mostrado como un agente muy atractivo en la lucha contra el cáncer. Sin embargo, la baja disponibilidad que presenta *in vivo*, hace difícil su uso terapéutico (Asensi et al., 2002). Diferentes grupos han desarrollado análogos de la molécula para mejorar la biodisponibilidad. En este aspecto el PTER, un análogo estructural dimetoxilado del RESV (Stivala et al., 2001), además de presentar una mayor biodisponibilidad temporal (Lin et al., 2009; Rimando et al., 2002) muestra unas actividades antioxidantes y anticarcinogénicas similares e incluso más potentes que las del RESV (Cichocki et al., 2008; Ferrer et al., 2005).

Mientras que los principales mecanismos de acción antitumorales del RESV son la apoptosis y la autofagia (Delmas et al., 2011), los mecanismos que subyacen la acción antitumoral del PTER no se conocen con exactitud. Por ello, el **objetivo general** de la presente tesis es estudiar cuales son dichos mecanismos en un modelo *in vitro* con 4 líneas tumorales de distinto origen: A375 (melanoma), A549 (pulmón), HT29 (colon) y MCF7 (mama).

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

1. **Comparar la acción antitumoral del PTER con respecto a su análogo estructural, el RESV. Para ello determinaremos:**
  - 1.1. Sus efectos citotóxicos
  - 1.2. Sus efectos citostáticos
2. **Determinar el tipo de muerte inducida por el PTER:** apoptosis, autofagia y necrosis.

- 3. Estudiar la implicación de la permeabilización de la membrana lisosomal en la citotoxicidad inducida por el PTER, y la posible implicación de Hsp70.**
- 4. Evaluar el efecto del metabolismo celular del PTER en su acción antitumoral.**



# MATERIAL Y MÉTODOS

---



## 1. Sustrato biológico

En este trabajo se han utilizado cuatro líneas celulares humanas aisladas de tumores de distintos orígenes. Todas ellas proceden del banco de células de la “*American type culture collection*” (ATCC):

- A375: Melanoma
- A549: Carcinoma de pulmón
- HT29: Adenocarcinoma colorectal
- MCF7: Adenocarcinoma de mama

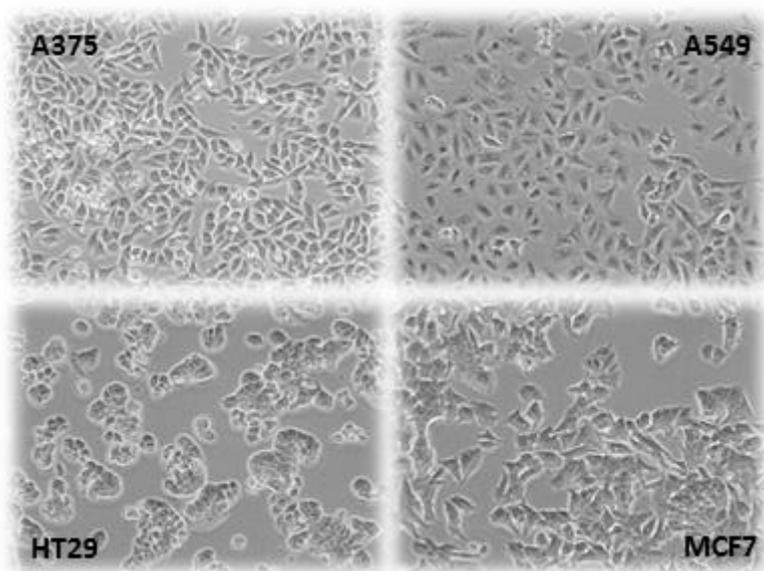


Ilustración 15: Líneas celulares utilizadas cultivadas *in vitro* durante 48h

## 2. Polifenoles naturales

Los principales reactivos de este trabajo son dos polifenoles naturales:

- El **resveratrol** de peso molecular 228.6 g/mol, se obtuvo de la casa comercial Sigma-Aldrich. Se preparó una solución stock en DMSO (dimetilsulfóxido) a una concentración de 0.0666M a partir de la cual se obtuvieron las disoluciones con las concentraciones objeto de estudio (0-200µM).
- El **pterostilbeno**, tiene un peso molecular de 256.3 g/mol, y se obtuvo de la casa comercial Enzo Life Sciences. Se preparó una solución stock en DMSO a una concentración de 0.0666M a partir de la cual se obtuvieron las disoluciones con las concentraciones objeto de estudio (0-200µM).

### 3. Inhibidores

A lo largo de este trabajo se han utilizado varios inhibidores de los distintos tipos de muerte celular estudiados:

- El **Z-VAD-FMK** o Z-VAD(OMe)-FMK (carbобензохи-валил-аланил-аспартил-[O-метил]-флуорометил аетона) (Abcam), es un inhibidor pancaspasa irreversible que se une a la subunidad catalítica de estas proteasas bloqueando la apoptosis dependiente de caspasas. Este péptido sintético está diseñado como un metil éster con el objetivo de aumentar su estabilidad y su permeabilidad celular. En todos los casos en los que se utilizó a lo largo de este trabajo, se añadió una hora antes que el PTER o los inductores de apoptosis utilizados. Se disolvió en DMSO y se utilizó a una concentración final en el medio celular de 20µM.
- La **necrostatina-1** (Nec-1) (Sigma-Aldrich) es un inhibidor de RIP1 que es una de las quinasas fundamentales en la regulación de la necroptosis o necrosis celular programada (Degterev et al., 2008). Este inhibidor se disolvió en DMSO y se utilizó a una concentración final en el medio celular de 25µM y se añadió 1h antes que el PTER o los inductores de necrosis utilizados.

- Para inhibir la actividad catepsina se utilizó una mezcla de **pepstatina A**, un inhibidor de aspartil peptidasas entre las que se encuentran las catepsinas D y E además de pepsina, renina y quimosina; junto con **leupeptina**, un inhibidor reversible de serin y cisteín proteasa entre las que se encuentran las catepsinas B, H y L así como otras como la calpaína o la tripsina. Ambos inhibidores, de la casa comercial Sigma-Aldrich, se añadieron una hora antes que el PTER. La pepstatina A se resuspendió en etanol y se calentó a 60°C hasta su completa disolución. La leupeptina se resuspendió en agua bidestilada estéril. Se utilizaron a una concentración final de 1µg/ml y 50µg/ml respectivamente.

#### 4. Controles positivos

Como controles positivos utilizamos varios inductores de los distintos tipos de muerte celular estudiados:

- La **camptotecina** (Sigma-Aldrich) es un inductor de apoptosis. Actúa inhibiendo de forma reversible la Topoisomerasa I al unirse a los complejos ADN-Topoisomerasa I durante la fase de síntesis del ADN. Esto da lugar a la ruptura del ADN con la consecuente muerte celular por apoptosis (Hertzberg et al., 1989; Thomas et al., 2004). Siguiendo las instrucciones de la casa comercial, se disolvió en DMSO. Según la línea celular utilizamos distintas concentraciones basándonos en su IC50: 50nM en el caso de la línea A375 y 500nM en el resto de líneas.
- La combinación de **TNF- $\alpha$** , **cicloheximida (CHX)** se utilizó, junto con el **Z-VAD-FMK** para inducir necrosis. Concretamente, este último se añadió 1h antes que la combinación de TNF- $\alpha$  + CHX con el objeto de inhibir la posible muerte por apoptosis que ésta pueda producir (Sawai and Domae, 2011). La solución de TNF- $\alpha$  recombinante humano fue obtenida de la casa comercial Abcam. Su concentración de uso fue de 50ng/ml. La CHX (Sigma-Aldrich)

se disolvió en DMSO y se usó a una concentración final de 2µg/ml.

- La **rapamicina** (Sigma-Aldrich) se utilizó para inducir autofagia ya que es un inhibidor de mTOR, que es un regulador negativo de la autofagia (Rubinsztein et al., 2007). Este compuesto se disolvió en DMSO y se usó a una concentración final de 100nM durante 1h de tratamiento.

## 5. Cultivos celulares

Las líneas celulares A375, A549 y HT29, se cultivaron en medio completo compuesto por:

- 90% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con GlutaMAX™ y 4.5g/l de glucosa (Gibco®, Life Technologies).
- 10% de suero bovino fetal inactivado (SBF) (Gibco®, Life Technologies)
- 100U/ml de penicilina (Gibco®, Life Technologies)
- 100µg/ml de estreptomycin (Gibco®, Life Technologies)
- 0.25µg/ml de fungizona (Gibco®, Life Technologies)

La línea celular MCF7 se cultivó en medio completo compuesto por:

- 90% RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) (Gibco®, Life Technologies)
- 10% de suero bovino fetal inactivado (Gibco®, Life Technologies)
- 100U/ml de penicilina (Gibco®, Life Technologies)
- 100µg/ml de estreptomycin (Gibco®, Life Technologies)
- 0.25µg/ml de fungizona (Gibco®, Life Technologies)

Tanto la preparación de los medios como la manipulación de las células, se realizaron en condiciones de asepsia utilizando cabinas de flujo laminar vertical de seguridad biológica tipo II (Telstar®).

Tras su siembra en frascos o placas de cultivo (BD Biosciences), las células se mantuvieron en incubadores de CO<sub>2</sub> (Thermo®) donde crecieron en las condiciones de cultivo estándar: a 37°C y en una atmósfera húmeda con una concentración del 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células se resemebraban cuando habían alcanzado un 80-90% de confluencia. Como las cuatro líneas celulares crecen en monocapa, para su subcultivo se despegaban del frasco por tripsinización (0.25% tripsina-EDTA 1mM pH 8.0; Gibco®, Life Technologies) 5 minutos a 37°C. Después se recogían en PBS (tampón fosfato salino, pH 7.4; Gibco®, Life Technologies) centrifugaban a 500g 5min y se resuspendían en el medio de cultivo.

Todos los experimentos se realizaron en las instalaciones del Servicio de Cultivos Celulares del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia.

## **6. Estudio de proliferación y viabilidad celular**

El número de células y la viabilidad de los cultivos celulares se analizaron utilizando el contador automático *Countess® Automatic Cell Counter* (Invitrogen). La técnica de contaje que utiliza este aparato se basa en el método de exclusión del colorante vital azul tripán.

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 (Freshney, 1987).

Para realizar el contaje celular, previa tripsinización de las células en cultivo, se mezcló una alícuota de la suspensión celular obtenida con

el mismo volumen de una solución de azul tripán al 0.4% (Invitrogen) y se cargó en unas cámaras de contaje especiales y específicas para este aparato (*Countess® cell counting chamber slides*; Invitrogen).

## **7. Estudio de la citotoxicidad celular: Método de la sulforodamina B**

El método de la sulforodamina B se utiliza para la determinación indirecta del número de células. Se trata de un método colorimétrico basado en la cuantificación de la tinción de las proteínas celulares con la sulforodamina B. Esta medida de la masa proteica celular total es directamente proporcional al número de células (Skehan et al., 1990; Voigt, 2005).

Este método tiene la ventaja de que permite realizar ensayos de citotoxicidad a gran escala en placas de 96 pocillos (Vichai and Kirtikara, 2006). Además, comparado con otros ensayos de citotoxicidad como el MTT, es más sensible y da lugar a una mejor linealidad con el número de células (Keepers et al., 1991; Voigt, 2005).

El protocolo a seguir fue el utilizado por el Instituto Nacional del Cáncer Americano (NCI) ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)). Para ello, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de  $5 \times 10^3$  células por pocillo en 100 $\mu$ l de medio completo en el caso de A375, A549 y HT29, y  $7.5 \times 10^3$  células por pocillo en 100 $\mu$ l de medio completo en el caso de la línea celular MCF7. Este número de células se calculó en función del tamaño y la tasa de crecimiento de cada línea celular, para lograr una buena señal sin llegar a la confluencia en los controles.

A las 24 horas post-siembra, se añadieron los polifenoles naturales PTER o RESV disueltos en 100 $\mu$ l de medio sin suplementar (DMEM o RPMI) a concentraciones crecientes desde 0 $\mu$ M hasta 100 $\mu$ M. Se realizaron 6 réplicas por condición.

A las 48 horas de tratamiento se fijaron las células mediante la adición de ácido tricloroacético (TCA; Sigma-Aldrich) al 50% de manera

que la concentración final en el pocillo fuera del 10% (p/v), y se incubaron durante 1h a 4°C. A continuación las placas fueron lavadas con agua y se dejaron secar.

Las placas fijadas fueron teñidas con 100µl de una solución de sulforodamina B (Sigma-Aldrich) al 0.4% (p/v) en ácido acético al 1 %, durante 20 minutos. Tras este tiempo se eliminó el exceso de tinción con lavados de ácido acético al 1% y se dejaron secar las placas. El colorante fijado se solubilizó con 200µl de tampón Trizma® Base (Sigma-Aldrich) 10mM.

A continuación se midió espectrofotométricamente la absorbancia a 570nm en un lector de placas (Multiskan spectrum; Thermo Scientific) y se le restó el ruido de fondo medido a 620nm para cada pocillo. Los datos se expresan como porcentaje de viabilidad celular que se calculó de acuerdo con la expresión:

$$\% \text{Viabilidad celular} = 100 \times \frac{\text{Absorbancia condición}}{\text{Absorbancia control}}$$

### 7.1. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC50)

La IC50 de un compuesto es aquella que produce el 50% de inhibición del crecimiento celular. Para su obtención se utilizó el programa GraphPad Prism®.

Este programa representa, mediante regresión no lineal, una curva logarítmica donde el eje de las X representa el logaritmo de las concentraciones del compuesto utilizado y el eje de las Y representa el % de viabilidad celular:

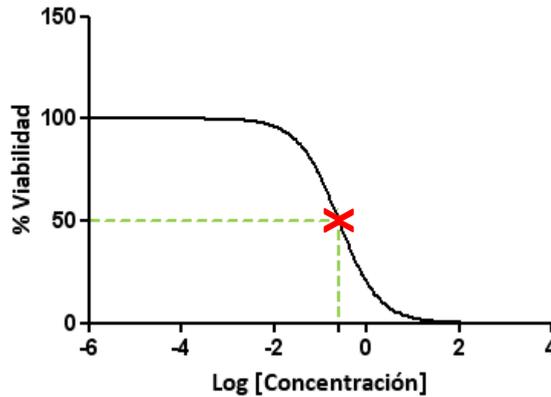


Ilustración 16: Ejemplo de curva para determinar la IC50

A partir de estos datos el programa calcula la IC50 del compuesto basándose en la siguiente ecuación de la curva:

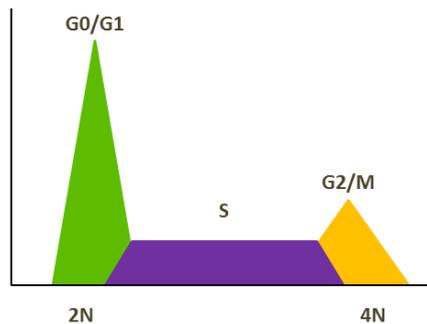
$$Y = \frac{100}{1 + 10^{(X - \text{LogIC50})}}$$

## 8. Análisis de distribución del ciclo celular

En cada una de las fases del ciclo celular las células tienen una cantidad de ADN conocida. En la fase G0/G1, las células tienen un contenido diploide (2N) de ADN, mientras que en la fase G2/M la célula ha duplicado su contenido en ADN convirtiéndose en tetraploide (4N) (Alberts et al., 2007).

Para analizar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular, se marcan las células con un fluorocromo que se une estequiométricamente al ADN. De esta forma, podemos medir por citometría de flujo la intensidad de la fluorescencia emitida que es proporcional a la cantidad de fluorocromo y por tanto a la cantidad de ADN de la célula. Así, obtenemos un histograma en el que se representa la intensidad de la fluorescencia (eje de las X) versus el número de células

analizadas (eje de las Y). En él, encontramos al menos tres fases bien definidas: Primeramente el pico G0/G1 correspondiente a células con contenido diploide de ADN. A continuación una meseta que representa la fase S y que corresponde a una cantidad de ADN variable entre 2N y 4N. Al final de ésta región se encuentra el pico G2/M, que presenta el doble de fluorescencia de la obtenida para G0/G1, ya que se debe a células tetraploides (**Ilustración 17**) (Rabitnovich, 1993).



**Ilustración 17: Histograma del ciclo celular obtenido por citometría de flujo**

El fluorocromo utilizado en este ensayo fue el yoduro de propidio (IP) (Krishan, 1975). El IP se intercala en la cavidad mayor de la doble cadena del ADN y produce un aducto altamente fluorescente que se excita a 535nm y emite a 617nm (fluorescencia roja). Dado que el IP puede también unirse al ARN, es necesario tratar las células con RNAasa para una determinación lo más exacta posible de la cantidad de ADN.

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (BD Biosciences) a una densidad de  $0.2 \times 10^6$  cels/pocillo y tras 24h fueron tratadas con distintas concentraciones (0, 10, 20, 75 $\mu$ M) de PTER o RESV. 24h tras el tratamiento, las células fueron tripsinizadas, lavadas 2 veces con PBS y fijadas en etanol frío al 70% (-20°C) a una relación  $1 \times 10^6$  células/ml durante 2h a 4°C. Transcurrido este tiempo las células fueron centrifugadas 4min a 3000rpm, lavadas 2 veces con PBS frío y resuspendidas en 0.5ml de tampón de ciclo por cada millón de células. A

continuación se incubaron durante 30min a temperatura ambiente, en oscuridad y se realizó el análisis de la fluorescencia utilizando un citómetro de flujo FACSCanto I (Becton Dickinson ®). El software utilizado para el análisis del ciclo celular fue el DIVA 6 (Becton Dickinson ®).

El tampón de ciclo utilizado está compuesto por: 50µg/ml de IP (Sigma-Aldrich), 0.1% de citrato sódico (Sigma-Aldrich), 50µg/ml de ribonucleasa A (Invitrogen, Life Technologies). Todo ello disuelto en PBS (Gibco®, Life Technologies).

## **9. Determinación de la incorporación de 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU).**

La BrdU es un análogo de la timidina, que se incorpora en el lugar de ésta durante la fase de síntesis del ADN de las células en proliferación. Por ello, este ensayo se utiliza tanto para analizar de forma indirecta la proliferación celular, como para estudiar la propia síntesis de ADN.

Este ensayo se llevó a cabo utilizando el kit de Roche "*Cell proliferation ELISA BrdU (colorimetric)*", en el que la BrdU incorporada al ADN se detecta por inmunoensayo colorimétrico (Porstmann et al., 1985).

Las determinaciones se realizaron siguiendo el protocolo de la casa comercial. Para ello, las células se sembraron en placas de 96 pocillos. Tras 24h, fueron tratadas con distintas concentraciones (0, 10, 20, 50, 75µM) de PTER o RESV durante 4h, y tras este tiempo se añadió BrdU a una concentración final de 10µM/pocillo. Tras 2h de incubación a 37°C, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 200µl/pocillo de la solución FixDenat para fijar las células y desnaturalizar el ADN. Tras 30min de incubación a temperatura ambiente, se eliminó el fijador y se incubaron las células durante 90min a temperatura ambiente con 100µl/pocillo de una solución que contiene un anticuerpo monoclonal contra BrdU marcado con peroxidasa (Anti-BrdU-POD). A continuación se realizaron 3 lavados con PBS y se añadieron 100µl/pocillo de un sustrato de la

peroxidasa, la TMB (tetrametil-benzidina). Tras 15 minutos a temperatura ambiente se procedió a la determinación de las absorbancias a 370nm (background a 492nm) con un espectrofotómetro de placas Multiskan (Thermo Scientific).

## **10. Estudio de la muerte celular por microscopía automatizada de fluorescencia.**

El estudio de la muerte celular por apoptosis y necrosis se determinó, mediante microscopía automatizada de fluorescencia con el microscopio automático IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare Life Sciences) del servicio de microscopía del SCSIE de la Universidad de Valencia. Para ello se sometió a las células a una triple tinción con anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (anexina V-FITC 5X; Abcam), IP (Sigma-Aldrich) y con Hoechst 33342 (Molecular Probes®, Life Technologies).

La anexina V es una proteína que se une específicamente en presencia de calcio al fosfolípido fosfatidilserina. Este fosfolípido se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesto en la cara externa de dicha membrana cuando comienza la apoptosis (apoptosis temprana). Por ello, la anexina puede unirse a los restos de fosfatidilserina de las células apoptóticas al ser estos accesibles por estar en el exterior. Sin embargo, cuando las células en cultivo sufren apoptosis, al no poder ser fagocitadas, sufren una necrosis secundaria al proceso apoptótico denominada apoptosis tardía. En este caso, la anexina V es capaz de unirse a la fosfatidilserina del interior de las células necróticas ya que estas no tienen intacta su membrana plasmática. Por ello, junto con la anexina V se utiliza el IP, un fluorocromo que se intercala en el ADN pero que es impermeable a las membranas plasmáticas por lo que sólo tiñe las células en las que esta está dañada, es decir, las células necróticas o en caso de estar también teñidas con anexina, células apoptóticas tardías. Además, para poder determinar el número total de células, añadimos otro fluorocromo, Hoechst 33342

Este colorante fluorescente es permeable a las membranas plasmáticas y se une específicamente a los ácidos nucleicos siendo, por tanto, un buen marcador de los núcleos celulares. (Koopman et al., 1994; van Engeland et al., 1998).

### **10.1. Preparación de la muestra**

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos negras con el fondo transparente (Falcon™, BD), en 100µl de medio completo sin rojo fenol a razón de  $5 \times 10^3$  células por pocillo en el caso de A375 y A549, y  $7.5 \times 10^3$  células por pocillo en el caso de HT29 y MCF7.

Tras 24h se añadieron 100µl de las distintas concentraciones de PTER (0, 20 y 50µM) en medio sin rojo fenol, sin suero ni antibióticos. Se realizaron tres réplicas por condición. A las 24 y 48 horas post-adición se procedió a su tinción con los fluorocromos. Para ello, tras eliminar cuidadosamente 100µl del medio, se añadieron, por pocillo, 50µl de una solución en PBS de los tres fluorocromos, de tal forma que en el pocillo sus concentraciones finales fueron de 4µM de Hoechst 33342, 2µM de IP y Anexina-FITC diluida 1:1400. Tras la adición, se incubó con la mezcla durante 15min a 37°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo se procedió a la captura de imagen con el microscopio automático IN Cell Analyzer 2000 (Healthcare, 2006).

En el caso de los ensayos de muerte celular en células tras el silenciamiento de hsp70, la preparación de la muestra previa a la tinción se llevó a cabo tal y como se describirá posteriormente en el punto 20 de este apartado).

### **10.2. Captura y análisis de imagen**

Para el protocolo de captura se configuraron tres canales diferentes preparados para excitar y capturar las señales emitidas por los fluorocromos Hoechst, anexina V-FICT y IP. Para el análisis de la anexina V-FITC se utilizó un láser que emitía una luz de excitación a 488nm y se

detectó la emisión a 535/45nm (fluorescencia verde). En el caso del IP se excitó con un láser a 545nm y se midió la emisión a 635/55nm (fluorescencia roja). El Hoechst se excitó con un láser de 364nm y la emisión se monitorizó con un filtro de 450/65nm (fluorescencia azul). Se utilizó el autoenfoco recomendado para el modelo concreto de placa de 96 pocillos y la captura en “zig-zag”, para reducir el sesgo del tiempo transcurrido entre captura de pocillos. Se analizaron 16 campos por pocillo o 5000 células como muestra representativa. Para estas capturas se utilizó un objetivo Nikon 20X y se mantuvieron las placas a 37°C durante todo el análisis.

Seguidamente, para el análisis de las imágenes obtenidas se utilizó el programa IN Cell Investigator Image Analysis Software 1000 Workstation. Cada línea celular recibió un análisis personalizado ajustándose a su tamaño y características morfológicas. El canal que registra la señal del Hoechst fue utilizado para segmentar la muestra (identificación automatizada de núcleos). A partir de esta señal el programa superpone las marcas obtenidas por tinción de anexina V y yoduro de propidio, obteniendo un árbol de decisiones el cual clasificamos de la siguiente manera:

- Células vivas: Hoechst +/Anexina V -/IP - (azules)
- Células en apoptosis temprana: Hoechst +/Anexina V +/IP - (azules y verdes)
- Células en apoptosis tardía: Hoechst +/Anexina V +/IP + (azules, verdes y rojas)
- Células necróticas: : Hoechst +/Anexina V -/IP + (azules y rojas)

A fin de eliminar posibles interferencias y aumentar la sensibilidad de la técnica, se incluyó un filtro excluyente en el protocolo de análisis. Se utilizó el balance Intensidad/área, para discriminar la población mayoritaria de células y excluir las señales erráticas que no fuesen núcleos. Este filtro resultó útil en líneas con tendencia a generar debris y en las condiciones donde las células han sido sometidas a un elevado

estrés y la mayoría de núcleos aparecen condensados. El software de análisis se configuró para que considerase marca una señal de 50 puntos de intensidad de píxel más elevada que el ruido de fondo, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

## **11. Detección de apoptosis por microscopía óptica de fluorescencia.**

El fundamento de este método es el mismo que el del método anterior pero se utilizó un microscopio invertido de fluorescencia Nikon Diaphot 300 acoplado a una cámara Leica DFC 300 FX, por lo que se tomaron las imágenes manualmente utilizando el software Leica application suite v. 2.3.1., y posteriormente se procedió al conteo celular manual con el programa de imagen ImageJ 1.47v (Wayne Rasband, National institutes of Health, USA). En este caso, como solo queríamos detectar apoptosis, teñimos las células con anexina V-FITC pero no con IP. Además, para poder determinar el número total de células, teñimos los núcleos, al igual que en el caso anterior, con Hoechst 33342.

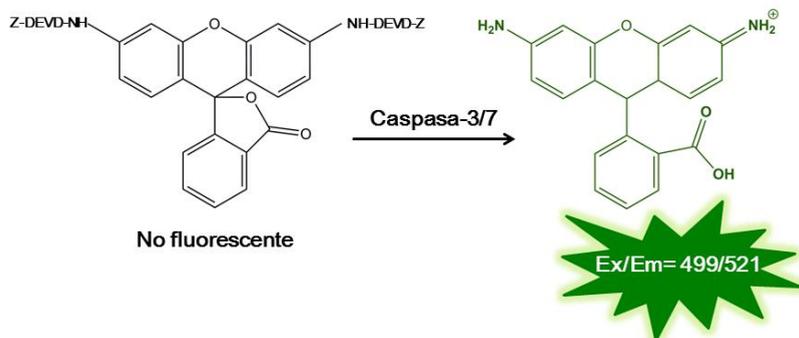
Se sembraron las células en 1ml de medio en placas de 12 pocillos (BD Biosciences), y a las 24h se indujo la apoptosis añadiendo camptotecina a las concentraciones indicadas anteriormente (subapartado controles positivos). En las condiciones correspondientes se añadió 20 $\mu$ M de Z-VAD-FMK una hora antes. Tras 24 y 48h de tratamiento, añadimos directamente al mililitro de medio de cultivo (contiene calcio) 50 $\mu$ l de anexina y 20 $\mu$ l de una solución de 10 $\mu$ g/ml de Hoechst diluido en PBS (concentración final 0.2 $\mu$ g/ml). A continuación se incubaron las células en el incubador durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo tomamos las imágenes y procedimos al conteo manual de las células vivas (solo teñidas con Hoechst) y las células apoptóticas (teñidas con Hoechst y Anexina V-FITC). Se realizaron 3 experimentos por tiempo y en cada uno de ellos se tomaron 6 fotos por condición con un aumento de 40X. Los resultados se expresan como porcentaje de células apoptóticas con respecto al número total de células.

## 12. Determinación de la actividad caspasa-3/7

Las caspasas-3/7 son dos miembros de esta familia de cisteinil-aspartato-proteasas que juegan un papel efector en la muerte celular por apoptosis. Estas caspasas comparten estructura y especificidad por ciertos sustratos pero se diferencian en la secuencia de sus respectivas regiones N-terminal.

Para la determinación de la actividad de estas caspasas utilizamos el kit “*SensoLyte® Homogeneous Rh110 Caspase-3/7 Assay Kit (fluorimetric)*” (AnaSpec) que se basa en la especificidad enzimática que muestran ambas caspasas por la secuencia de amino ácidos DEVD (Asp-Glu-Val-Asp), produciendo su ruptura por el extremo C-terminal del residuo de aspartato.

Para ello, tras la lisis celular, se añade este sustrato unido a fluoróforo rodamina 110 (Rh110), el (Z-DEVD)<sub>2</sub>-Rh110, que por hidrólisis enzimática de las caspasas-3/7 procedentes de las células libera la rodamina que emite a un máximo de 520nm (fluorescencia verde) al excitarla a un máximo de 496nm (**Ilustración 18**). Por tanto, se puede relacionar la intensidad de fluorescencia con la actividad enzimática.



**Ilustración 18: Hidrólisis proteolítica del sustrato de las caspasas-3/7 (Z-DEVD)<sub>2</sub>-Rh11**

La metodología a seguir fue acorde a las instrucciones del fabricante. Las células se sembraron en placas opacas (negras) de 96

pocillos (Corning®) en 100µl de medio y tras 24h se añadieron 100µl más conteniendo medio (condición control) o PTER, de tal forma que las concentraciones finales de éste en el pocillo fueran 10, 20 y 50µM. Tras 24 y 48h de tratamiento, se añadió directamente al medio de cultivo 50µl/pocillo de una solución que contiene DTT (ditiotreitól) y el sustrato (Z-DEVD)<sub>2</sub>-Rh110 diluidos en un tampón de ensayo que lisa las células y aporta las condiciones óptimas para la medida de la actividad enzimática. Se mezcló bien en un agitador de placas DELFIA (PerkinElmer) durante 60 segundos a 300-400rpm y se midió la intensidad de fluorescencia (Ex/Em=485nm/538nm) a los 60 minutos con un FluorosKan Ascent FL (Thermo LabSystems).

La fluorescencia obtenida se relativizó al número de células medido en paralelo de forma indirecta por el método de la sulforodamina B (Ver apartado 2.3 de esta misma sección).

### **13. Análisis de proteínas mediante *Western Blot***

El *western blot* es una técnica que nos permite examinar la cantidad de una proteína específica en una muestra y comparar sus niveles con respecto a los existentes en otras muestras. Para ello seguimos los siguientes pasos:

#### **13.1. Extracción de proteínas**

Para la obtención de los extractos proteicos de las células en cultivo, en primer lugar se eliminó el medio de cultivo de las placas y se lavaron con PBS frío. A continuación, las células se rascaron en presencia de un tampón de lisis compuesto por 20mM de Tris pH 7.5, 150mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1mM de EGTA y Triton™ X-100 1% (v/v), suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas (5µl/ml tampón) y de fosfatasa (10µl/ml tampón), todo ello de la casa comercial Sigma-Aldrich. El lisado se recogió y se sometió a tres ciclos de sonicación de 5s de ultrasonidos y 15s de parada utilizando un sonicador Branson

SLPe. Tras la sonicación el lisado se centrifugó a 15000g, 4°C, 15min. La concentración de proteínas de los sobrenadantes se determinó según el método colorimétrico descrito por Bradford, usando el reactivo *Coomassie Blue G-250* (Thermo Scientific) y midiendo la absorbancia de las muestras a 595nm. Los valores obtenidos se interpolan en una recta patrón de albúmina sérica bovina (BSA; Roche) de rango 0.01mg/ml-2mg/ml.

### 13.2. Electroforesis y transferencia de proteínas

Las proteínas se separaron en función de su peso molecular mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE). Para ello se tomaron alícuotas de las muestras conteniendo 40µg de proteína, se mezclaron con el volumen adecuado de tampón de carga (Tris 50mM pH6.8, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v), 0.005% azul de bromofenol (p/v)) y se incubaron a 98°C durante 5min.

Una vez preparadas, las muestras se cargaron en geles comerciales en gradiente de poliacrilamida del 4-15% (*Criterion™ XT precast gel, Bio-Rad*) y se sometieron a electroforesis utilizando el sistema *Criterion Precast Gel System* (Bio-Rad) y un tampón compuesto por Tris 25mM, glicina 200mM y SDS al 0.1% (p/v), pH 8,3. Así mismo, se utilizó un marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Standards Dual Color, Bio-Rad*).

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas presentes en el gel se transfirieron en seco a membranas de PVDF (difluoruro de polivinildeno) utilizando el sistema *iBlot® Dry Blotting System* de *Invitrogen* (Life Technologies).

### 13.3. Inmunodetección

Para la inmunodetección, en primer lugar las membrana transferidas se incubaron, para el bloqueo de uniones inespecíficas, en agitación suave, a temperatura ambiente, durante 1h con una solución

de leche desnatada al 5% en TBS-Tween (Tris-Cl 20mM, NaCl 150mM, Tween-20 0.1%, pH 7.5) (solución de bloqueo). A continuación, se incubaron a 4°C durante toda la noche, también en agitación suave, con los correspondientes anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo, dirigidos frente a las proteínas especificadas en la **Tabla 1**. Para detectar la unión del anticuerpo primario, tras varios lavados con TBS-Tween de 10 minutos cada uno, las membranas se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (mostrados en la **Tabla 1**) conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP).

Anticuerpos primarios					
Diana	MW (KDa)	Origen	Especie reactiva	Dilución	Casa comercial
Cleaved-PARP	89	Monoclonal de conejo	Humano, Mono	1:1000	Cell signaling Technology
GAPDH	37	Monoclonal de conejo	Humano, Conejo, Ratón	1:1000	Cell signaling Technology
LC3B	14/16	Monoclonal de conejo	Humano, Conejo, Ratón	1:1000	Cell signaling Technology
P62/SQSTM1	62	Monoclonal de conejo	Humano, rata, ratón	1:1000	Sigma-Aldrich
Hsp70/Hsp72	70	Monoclonal de conejo	Humano, rata, ratón	1:1000	Enzo Life Sciences
$\alpha$ -Tubulina	50	Monoclonal de ratón	Humano, Hámster, ratón	1:1000	GeneScript
Anticuerpos secundarios					
Diana	Conjugado		Dilución	Casa comercial	
Anti Rabbit IgG	HRP		1:3000	Cell signaling Technology	
Anti Mouse IgG	HRP		1:10000	Jackson Immunoresearch	

**Tabla 1: Resumen de anticuerpos utilizados en los ensayos por *western blot***

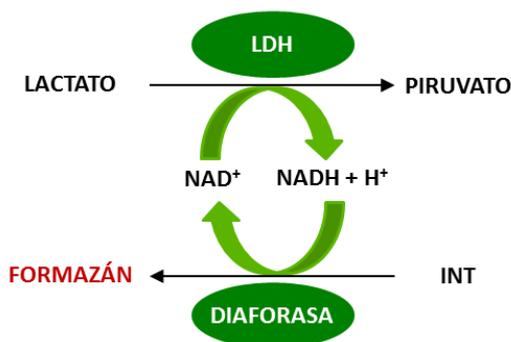
Finalmente, tras lavar las membranas varias veces con TBS-Tween para eliminar el exceso del anticuerpo secundario, se incubaron con el reactivo comercial ECL (Pierce, Thermo Scientific), que permite la detección por quimioluminiscencia de los anticuerpos conjugados con peroxidasa. El luminol del ECL, en presencia de peróxido de hidrógeno, es

transformado por la HRP a un dianión excitado el cual emite luz al volver al estado fundamental (Schneppenheim, 1991). Esta luz puede ser captada por una cámara de quimioluminiscencia. En nuestro caso utilizamos para ello el sistema ChemiDoc™ XRS+ de Bio-Rad. La señal obtenida se analizó mediante densitometría utilizando el software *Image Lab 2.0.1* (BioRad).

## 14. Determinación de la actividad LDH

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática que está presente en las células. Cuando las membranas citoplasmáticas sufren un daño considerable, se produce la liberación de LDH, por lo que su cuantificación en los sobrenadantes del cultivo celular se puede utilizar como indicador de la integridad de la membrana plasmática y por tanto de muerte celular por necrosis (Decker and Lohmann-Matthes, 1988).

Para la detección de su actividad utilizamos el kit de Roche “*Cytotoxicity Detection Kit<sup>PLUS</sup> (LDH)*”. Este kit se basa en una reacción enzimática acoplada. En el primer paso la LDH liberada al medio celular cataliza la oxidación de lactato a piruvato mediante la reducción del  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . En el segundo paso de la reacción la enzima diaforasa utiliza este  $\text{NADH} + \text{H}^+$  formado para catalizar la reducción de la sal de tetrazolio INT (2-[4-iodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-cloruro feniltetrazolium) a formazán que absorbe a una longitud de onda máxima de 500nm (rojo). Por tanto, esta reacción se puede monitorizar espectrofotométricamente siendo la cantidad de formazán formado proporcional a la cantidad de LDH liberada al medio de cultivo y por tanto a la cantidad de células muertas o con la membrana celular dañada.



**Ilustración 19: Reacción enzimática acoplada para la detección de la actividad LDH**

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a razón de  $0.2 \times 10^6$  células en 2ml de medio completo. A las 24h se añadió el PTER a las diferentes concentraciones (0, 10, 20, 50, 75 y  $100 \mu\text{M}$ ) en los pocillos correspondientes, y a las 24, 48 y 72 horas post-adición se recogieron  $50 \mu\text{l}$  de cada condición experimental para su análisis y se transfirieron a una placa de 96 pocillos transparente.

Las determinaciones se realizaron el mismo día de la recogida de las muestras y según las instrucciones del kit. Para ello, a los  $50 \mu\text{l}$  de muestra se añadieron  $50 \mu\text{l}$  de una disolución preparada que contenía: diaforasa,  $\text{NAD}^+$ , la sal de tetrazolio INT y lactato sódico. Tras un periodo de incubación de 20min a temperatura ambiente se midió la absorbancia espectrofotométricamente a 492nm en un lector de placas (Multiskan spectrum; Thermo Scientific) y se le restó el ruido de fondo medido a 690nm para cada pocillo.

Para la determinación del porcentaje de citotoxicidad inducida por los polifenoles se restó a las absorbancias de las muestras la absorbancia del medio de cultivo sin células ya que tanto el rojo fenol del medio como la LDH presente en el suero bovino fetal del medio pueden alterar los resultados.

A los valores obtenidos se les aplicó la siguiente ecuación que tiene en cuenta las absorbancias obtenidas para los distintos controles introducidos en el ensayo:

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = 100 \times \frac{\text{Abs muestra} - \text{Abs control negativo}}{\text{Abs control positivo} - \text{Abs control negativo}}$$

Dónde:

- **Control negativo** = Absorbancia de las células no tratadas
- **Control positivo** = Absorbancia máxima obtenida tras incubar las células con una solución de Triton™ X-100 (Panreac) al 2% (100µl por pocillo durante 15 minutos).

## 15. Detección de autofagia por microscopía confocal

Este ensayo se utiliza para monitorizar la formación de autofagosomas en células transfectadas con el plásmido GFP-LC3.

### 15.1. Transfección transitoria de las células tumorales humanas

Las cuatro líneas tumorales se transfectaron con el plásmido de expresión pEGFP-LC3 (Addgene) por medio de lipofección. Esta técnica consiste en la formación de pequeños liposomas que contienen el ADN que queremos introducir en la célula. Para ello se utilizó el reactivo catiónico “Lipofectamine® LTX and PLUS™ Reagents” (Invitrogen, Life Technologies).

Según las instrucciones del fabricante, 24h antes de la transfección, se sembraron las células en 800µl de medio de cultivo completo sin antibióticos, sobre cubreobjetos estériles, en placas de 12 pocillos. La densidad celular el día de la transfección fue de un 60%. Para la preparación de los complejos de ADN/lipofectamina se diluyeron, en primer lugar, 2µg del plásmido en 200µl de medio *Opti-MEM® I Reduced*

*Serum Medium* (Gibco, Life Technologies). A esta solución se añadió  $1\mu\text{l}$  de *PLUS<sup>TM</sup> reagent*. La mezcla se vortexó y se dejó incubar durante 5min a temperatura ambiente. A continuación se añadieron  $2.5\mu\text{l}$  de Lipofectamina LTX, se mezcló todo vortexando y se dejó incubar 30min a temperatura ambiente para que se formaran los complejos. Transcurrido este tiempo, se agregaron por goteo a cada pocillo los  $200\mu\text{l}$  de la solución de los complejos ADN/lipofectamina sobre el medio de cultivo y se mezcló suavemente agitando la placa. Las células se dejaron incubando durante 24h para su transfección a  $37^{\circ}\text{C}$  en un incubador de  $\text{CO}_2$ . Tras ese periodo de tiempo, se reemplazó el medio de cultivo con lipofectamina por 1ml de medio completo nuevo para evitar la posible toxicidad producida ésta y se procedió al tratamiento de las células (**Ilustración 20**).

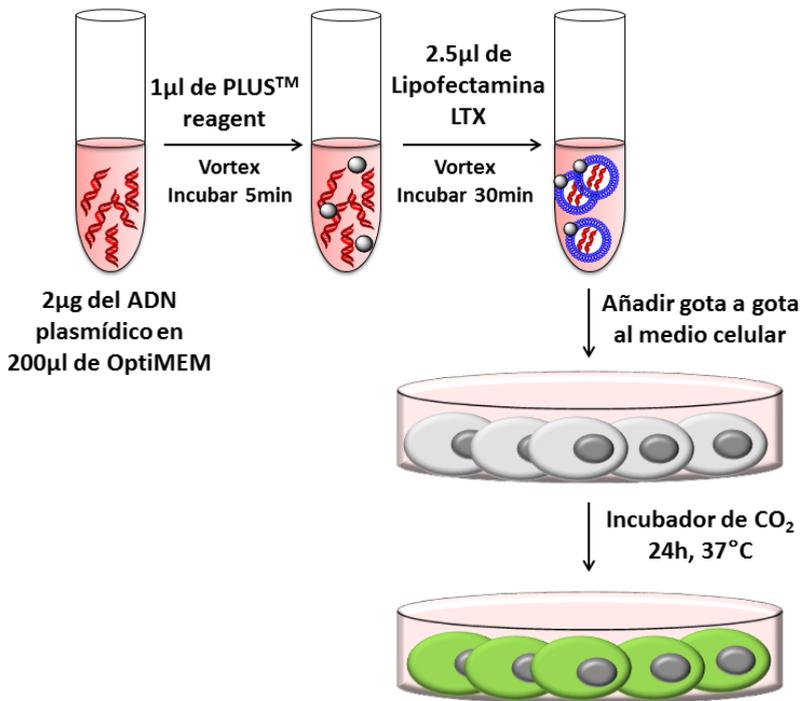


Ilustración 20: Esquema de la transfección con Lipofectamina LTX

## **15.2. Tratamiento celular, preparación de la muestra para microscopía confocal y análisis de imagen.**

Las células se trataron 24h post-transfección con PTER 50 $\mu$ M durante 24h o con rapamicina 100nM durante 1h. Transcurrido este tiempo, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% a 4°C. Una hora después, se lavaron las células con PBS para eliminar el PFA, y los cubreobjetos con las células se sacaron de las placas de cultivos y se montaron en portaobjetos utilizando el reactivo “ProLong® Gold Antifade Reagent” (Molecular Probes®, Life Technologies). Las preparaciones fueron visualizadas con un microscopio confocal Leica TCS Sp2 con un aumento de 40X y zoom de 3. Los filtros de detección de fluorescencia utilizados fueron 488nm de excitación y 519nm de emisión.

Se tomaron 10 imágenes por condición y se contaron en cada una el número de células con puntos verdes. Se consideraron células punteadas aquellas que poseían más de 25 puntos. Estos puntos representan la incorporación de GFP-LC3-II a la membrana de los autofagosomas (Mizushima et al., 2010).

## **16. Visualización lisosomal por tinción de células vivas con *Lysotracker® red***

Par evaluar el volumen y la morfología de los lisosomas, teñimos las células, tras 24h de tratamiento con la sonda fluorescente *LysoTracker red* (Molecular probes®, Life Technologies) que se acumula en el interior de orgánulos ácidos como los lisosomas y puede ser detectado por microscopía de fluorescencia (Ex/Em=577/590).

Esta sonda consiste en un fluoróforo unido a una base débil, que a pH neutro solo está parcialmente protonada. Esto le permite difundir pasivamente a través de la membrana plasmática y acumularse en los lisosomas por lo que puede marcar células vivas. El mecanismo por el cual se acumula específicamente en los lisosomas no se conoce con

precisión, aunque parece que durante el proceso la sonda sufre un proceso de protonación y queda retenida en la membrana de estos orgánulos (Zhang et al., 1994).

24h después de la siembra de las células en placas de 12 pocillos, tratamos las células durante 24h más con PTER 10 o 50 $\mu$ M y transcurrido este tiempo se procedió según las instrucciones del fabricante. Para ello, añadimos a cada pocillo 7.5 $\mu$ l de una solución de *lysotracker red* de tal forma que la concentración final en el pocillo fue de 75nM. Tras incubar las células durante 30min en el incubador de CO<sub>2</sub>, eliminamos el medio de cultivo con el *lysotracker*, lavamos 2 veces con PBS y dejamos 1ml de este. Finalmente tomamos imágenes con una cámara Leica DFC 300 FX acoplada a un microscopio invertido Nikon Diaphot 300 utilizando un filtro de excitación de 545nm y otro de emisión de 620nm (Fluorescencia roja). El software utilizado para tomar las imágenes fue Leica application suite v. 2.3.1. Se realizaron 3 experimentos y en cada uno de ellos se tomaron 6 fotos por condición con un aumento de 40x.

## **17. Detección de la relocalización del naranja de acridina por citometría de flujo**

El naranja de acridina (Molecular probes, Life Technologies) es fluorocromo sensible al pH que atraviesa fácilmente la membrana plasmática. Debido a que es una base débil, este compuesto tiene afinidad por orgánulos ácidos como los lisosomas, en cuyo interior se protona y acumula, de forma reversible, emitiendo fluorescencia roja con una intensidad proporcional al grado de acidez. Sin embargo, cuando se localiza en el citoplasma y núcleo donde su concentración es más baja y el pH más elevado, emite fluorescencia verde. De esta forma, midiendo estas intensidades de fluorescencia por citometría de flujo, podemos determinar si existen alteraciones en la membrana lisosomal (Raben et al., 2009).

Para ello, sembramos las células en placas de 6 pocillos y a las 24h las tratamos con distintas concentraciones de PTER (0, 10, 20, 50 $\mu$ M).

24h más tarde añadimos al medio de cultivo una concentración final de naranja de acridina de 2µg/ml e incubamos durante 15min en el incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C. Finalmente, se lavaron las células con PBS dos veces, se tripsinizaron, se centrifugaron y se resuspendieron en 400µl de PBS. Esta suspensión celular se analizó por citometría de flujo para determinar los cambios en la fluorescencia. Se utilizó un citómetro de flujo FACSCanto I (Becton Dickinson®) en donde se analizaron 10000 eventos por condición. Para el análisis de la fluorescencia verde se utilizó un láser que emitía una luz de excitación a 488nm y se detectó la emisión a 520nm. Para el análisis de la fluorescencia roja se utilizó una longitud de onda de excitación de 545nm y se midió la emisión a 620nm. Los resultados se analizaron mediante el software DIVA 6 (Becton Dickinson®).

## 18. Inmunocitoquímica

Mediante esta técnica se puede evaluar, por microscopía de fluorescencia, la localización subcelular de una determinada proteína utilizando anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos.

Para iniciar el ensayo, se sembraron las células en placas de 12 pocillos sobre cubreobjetos previamente esterilizados. 24h más tarde, las células fueron tratadas con PTER 50µM durante 24h más, y transcurrido este tiempo se procedió al estudio de las proteínas de interés.

Para ello, en primer lugar, se eliminó el medio de cultivo, y tras lavar las células con PBS dos veces, se fijaron con PFA 4% durante 30min a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, con calcio y magnesio; Gibco®, Life Technologies), se permeabilizaron las células con Triton™ X-100 al 0.2% (v/v) en DPBS durante 3min a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se incubaron en la solución de bloqueo (Triton™ X-100 0.3% (v/v), BSA 1% (p/v) y SBF 5% (v/v) en DPBS) durante 20 minutos, también a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo primario pertinente (**Tabla 2**) diluido en el tampón de bloqueo se realizó a 4°C,

durante toda la noche, en una cámara húmeda. Después de 5 lavados más durante 5min en el tampón de dilución del anticuerpo secundario (Triton™ X-100 0.1% (v/v) y BSA 0.25% (p/v) en DPBS), se incubó durante 1h a temperatura ambiente en una cámara oscura con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con un fluorocromo (**Tabla 2**). Seguidamente, se volvieron a lavar las muestras 3 veces durante 5min con este mismo tampón y se incubaron con 2µg/ml de Hoechst 33342 o con 1µg/ml de IP durante 10min en oscuridad para teñir los núcleos celulares.

Finalmente, se lavaron los cubreobjetos 3 veces con DPBS y se montaron en portaobjetos utilizando el reactivo “ProLong® Gold Antifade Reagent” (Molecular Probes®, Life Technologies). Las preparaciones fueron visualizadas con un microscopio confocal Leica TCS Sp2 con un aumento de 40X y zoom de 3 utilizando los filtros de excitación/emisión correspondientes según el anticuerpo secundario utilizado.

Anticuerpos primarios				
Diana	Origen	Especie reactiva	Dilución	Casa comercial
Catepsina D	Monoclonal de ratón	Humano	1:100	Boster Biological
Catepsina L	Monoclonal de ratón	Humano, rata, ratón	1:25	Boster Biological
α-Tubulina	Monoclonal de ratón	Humano, Hámster, ratón	1:100	GeneScript
Anticuerpos secundarios				
Diana	Ex/Em	Dilución	Casa comercial	
Alexa Fluor®633 Anti Mouse IgG	632/646	1:1000	Molecular probes, Life technologies	
Alexa Fluor®488 Anti Mouse IgG	488/519	1:1000	Molecular probes, Life technologies	

**Tabla 2:** Resumen de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los ensayos de inmunocitoquímica.

## 19. Determinación de la actividad cisteín y aspartil catepsina

La liberación de cisteín y aspartil catepsinas lisosomales al citosol es un indicador de alteraciones en la membrana lisosomal (Boya and Kroemer, 2008). Por eso, determinamos su actividad total tras la lisis completa de las células, y su actividad citosólica tras la lisis parcial de las células, es decir, lisando la membrana para liberar el contenido citosólico, pero sin que se produzca la ruptura de los lisosomas. Para ello se utilizó el tampón SCA (HEPES 20mM, KCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, sacarosa 250mM, pefabloc 500μM), con diferente concentración del detergente no iónico digitonina. Para la determinación de la actividad catepsina total se utilizaron 200μg/ml de digitonina (stock 50mg/ml, calentar a 65°C para su disolución) en todas las líneas. Para la determinación de la actividad catepsina citosólica utilizaremos 20μg/ml para la línea A375 y 30μg/ml para el resto.

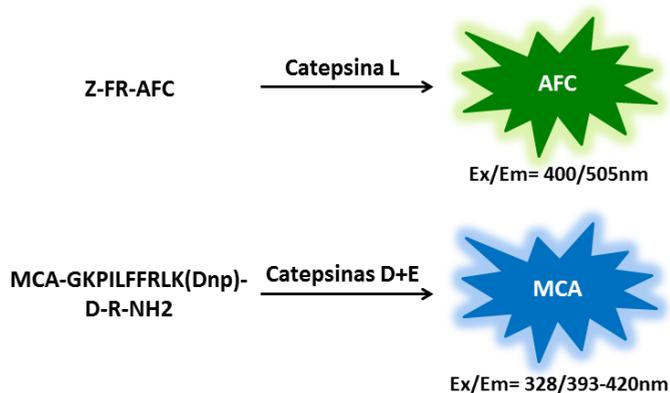
La determinación de estas concentraciones se obtuvo previamente realizando un ensayo con *Lysotracker* y en paralelo otro para determinar LDH. De esta forma se testaron diferentes concentraciones de digitonina en todas las líneas y se escogieron, en caso del tampón de catepsinas citosólicas, aquellas que producían la liberación total de LDH sin romper los lisosomas, y en caso del tampón de catepsinas totales, aquellas que produjeran liberación total de LDH y ruptura de los lisosomas.

Una vez calculadas las concentraciones óptimas de digitonina en ambos tampones, se realizó el ensayo. Para ello, se sembraron las células en placas de 6 pocillos, y 24h después se trataron con distintas concentraciones de PTER (0, 20 y 50μM). Tras 24h de incubación, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron las células 3 veces con PBS y se añadió a cada pocillo 200μl del tampón de catepsinas citosólicas o del tampón de catepsinas totales. Las placas con el tampón se incubaron durante 15min en un agitador orbital en hielo. Transcurrido este tiempo, se recogió el tampón con cuidado para no rascar las células y se cogió una alícuota de 50μl para la determinación de las actividades. El tiempo

es muy importante, sobre todo para la extracción de las catepsinas citosólicas, por lo que hay anotar el tiempo de adición y recoger a los 15min exactos.

Para la determinación de la actividad cisteín catepsina, utilizamos un sustrato fluorogénico de la catepsina L, el Z-FR-AFC (Z-Phe-Arg-AFC; AFC= 7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin). Como resultado de esta reacción se libera el grupo AFC que tiene un espectro de excitación/emisión= 400/505nm (Tchoupe et al., 1991).

Para la determinación de la actividad aspartil catepsina, utilizamos un sustrato fluorogénico de las catepsinas D y E, el MCA-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-D-Arg-NH<sub>2</sub> o MCA-GKPILFFRLK(Dnp)-D-R-NH<sub>2</sub> (MCA= 7-methoxycoumarin-4-yl)acetyl; Dnp=dinitrophenyl). Como resultado de esta reacción se libera el grupo MCA que tiene un espectro de excitación/emisión= 328/393-420nm (Yasuda et al., 1999).



**Ilustración 21: Esquema de la determinación de la actividad catepsina**

Así pues, a los 50µl de muestra, se añadieron 50µl más de tampón con el sustrato fluorogénico correspondiente en placas opacas (negras) de 96 pocillos. En ambos casos los sustratos se añadieron en tampón SCA suplementado con 8µl/ml de una solución 1M de DTT (concentración final=8mM), y con 5µl/ml de una solución 100mM de pefabloc (concentración final=0.5mM). Del Z-FR-AFC se añadieron 10µl/ml de

tampón de una solución stock de 20mM. Del MCA-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-D-Arg-NH<sub>2</sub> también se añadieron 10µl/ml, en este caso de un stock de 1mM.

Una vez realizada la mezcla, la fluorescencia de los compuestos liberados se midió cada 5min durante 1h a 30°C, en caso del Z-FR-AFC, y a 40°C, en caso del sustrato de las aspartil catepsinas, con un fluorosKan Ascent FL (Thermo labsystems). Los filtros utilizados para medir la fluorescencia del sustrato de la catepsina L fueron 405/501 (excitación y emisión respectivamente) y en el caso del sustrato de la catepsina D fueron 320-420nm. La actividad catepsina se obtuvo calculando la pendiente de la recta obtenida.

Los resultados se expresan como porcentaje de actividad catepsina citosólica con respecto a la actividad total. El aumento de este cociente indica un aumento en la actividad catepsina citosólica y por tanto, un aumento en la liberación de estas proteasas al citosol.

## 20. Silenciamiento génico de Hsp70 (Hsp72)

El silenciamiento que se llevó a cabo fue post-transcripcional utilizando ARNs de interferencia (siRNAs; *small interfering RNA*). Estas moléculas son secuencias de RNA de doble cadena de entre 19-21 nucleótidos. Actúan a nivel del ARN mensajero (ARNm) que codifica la proteína de interés uniéndose a él por complementariedad de bases y favoreciendo su degradación.

Debido a que solo se diferencian en dos aminoácidos, con el nombre común de Hsp70-1 (o Hsp72) se agrupan las proteínas Hsp70-1A y Hsp70-1B (o Hsp70A1A y Hsp70A1B). Por tanto, para el silenciamiento de Hsp70-1 tuvimos que utilizar conjuntamente dos siRNAs (ON-TARGETplus™ SMART pool siRNA, Dharmacon, Thermo Scientific), uno con la secuencia complementaria de Hsp70-1A y otro con la de Hsp70-1B. También se adquirieron, de la misma casa comercial, un siRNA contra la GAPDH como control positivo, y como control negativo un “pool” de siRNAs non-target, es decir, sin especificidad por ninguna proteína.

Los siRNAs fueron introducidos en las células mediante transfección usando el agente transfectante DharmaFECT® 1, que era el recomendado por la casa comercial de la que obtuvimos los siRNAs.

El protocolo que seguimos para el silenciamiento de HSP70 lo pusimos a punto para dos formatos de placas diferentes (12 y 96 pocillos) según el experimento a realizar tras la transfección.

En caso de las placas de 12 pocillos, las líneas HT29 y MCF7 se sembraron a razón de  $75 \times 10^3$  células/pocillo en 1ml del medio completo correspondiente sin antibióticos. Tras 24h, las células fueron transfectadas con los siRNAs contra Hsp70-1, con el control negativo o con el control positivo tal y como se describirá a continuación.

En primer lugar se prepararon dos tubos, en uno de ellos se añadieron por pocillo 5 $\mu$ l de una solución de 5 $\mu$ M del siRNA correspondiente en un volumen final de 100 $\mu$ l de medio sin suero ni antibióticos de tal forma que su concentración final en el pocillo fuera de 25nM. Esta solución se mezcló cuidadosamente por pipeteo y se dejó incubar 5min a temperatura ambiente. En el otro tubo se añadieron, según si se trataba de la línea celular MCF7 o de la línea HT29, 2 o 3 $\mu$ l respectivamente, del agente transfectante Dharmafect 1 en 100 $\mu$ l finales de medio sin suero ni antibióticos. Esta solución también se mezcló cuidadosamente por pipeteo y se dejó incubar 5min a temperatura ambiente. Seguidamente se mezcló el contenido de ambos tubos, se vorteo y se incubó durante 20min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, a estos 200 $\mu$ l se añadieron 800 $\mu$ l de medio completo sin antibióticos para obtener un volumen final de 1ml que se añadió por pocillo tras lavar las células 2 veces con PBS. Finalmente, las células se dejaron para su transfección en un incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C.

A las 48h post-transfección, se procedió al análisis por *western blot* de los niveles de Hsp70 en las células transfectadas con el siRNA contra esta proteína, o con el control negativo (siRNA non-target), y los niveles de GAPDH en el caso de las células transfectadas con el siRNA contra esta proteína.

Paralelamente, a este mismo tiempo (48h post-transfección) se procedió al tratamiento de las células transfectadas con PTER 50 $\mu$ M, y 24h después del tratamiento y 72h post-transfección, se procedió al análisis de la actividad catepsina tal y como se ha descrito anteriormente en el apartado 2.15 de esta sección.

Por otro lado, en el caso de la transfección de las placas de 96 pocillos, las líneas celulares HT29 y MCF7 se sembraron, respectivamente, a razón de  $5 \times 10^3$  y  $7.5 \times 10^3$  células por pocillo en 100 $\mu$ l de medio completo sin antibióticos. Como en este caso el volumen final del pocillo es 100 $\mu$ l en vez de 1ml, se realizó el mismo protocolo descrito anteriormente pero ajustando las cantidades de los reactivos a este volumen. De esta forma, por pocillo, se prepararon 0.5 $\mu$ l de la solución de 5 $\mu$ M del siRNA correspondiente en 10 $\mu$ l de medio sin suero ni antibióticos, y 0.2 o 0.3 $\mu$ l de agente transfectante (para MCF7 y HT29 respectivamente) en otros 10 $\mu$ l de este medio. A la mezcla de ambas soluciones se añadieron 80 $\mu$ l de medio completo sin antibióticos para completar hasta los 100 $\mu$ l que necesitábamos por pocillo. A continuación, se procedió a reemplazar el medio de cultivo de las placas por esta solución de transfección.

En este caso, 24h post-transfección se añadieron 100 $\mu$ l/pocillo más de medio con PTER de tal forma que su concentración final en el pocillo fuera de 20 o 50 $\mu$ M en las células tratadas. Tras 24h de tratamiento y 48 post-transfección se procedió a evaluar la viabilidad celular por el método de la sulforhodamina B descrito en el apartado 2.3 de esta sección.

## **21. Análisis de PTER y sus metabolitos por UPLC-MS/MS**

El PTER y sus metabolitos glucuronidados y sulfatados fueron separados por cromatografía líquida de ultra eficacia (UPLC) y detectados por espectrometría de masas (tándem MS/MS). Esta técnica es muy selectiva y permite determinar compuestos concretos en matrices muy complejas como son las muestras biológicas.

Las muestras fueron analizadas en el servicio de espectrometría de masas del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia. El sistema cromatográfico utilizado consta de un espectrómetro de masas triple cuadrupolo Acquity® TQ Detector (Waters®) equipado con una fuente de ionización Z-spray operando en modo ión negativo acoplado al software *MassLynx* 4.1 para el procesado de los datos. Las muestras fueron analizadas por UPLC en fase reversa con una columna Acquity UPLC BEH C18 (Waters®) (2.1 x 50mm) con 1.7µm de tamaño de partícula.

En cuanto a la preparación y tratamiento de las muestras para su análisis, en primer lugar, se sembraron  $0.1 \times 10^6$  células/ml en 5ml de medio completo en placas Petri de 60mm de diámetro. Paralelamente, se añadieron 5ml de medio completo sin células en una placa control. Tras 24h, todas las placas fueron tratadas con PTER 20µM y a las 6 y 24h post-tratamiento se recogieron, por un lado, alícuotas de 500µl de medio de las placas con las células tratadas y de las placas control sin células. Por otro lado, tras eliminar el resto del medio y lavar las células con PBS varias veces, se procedió a la lisis de las células tratadas añadiendo 500µl de tampón acetato sódico 0.2M pH 5.0 y rascando las células para su recogida. Las alícuotas de medio se centrifugaron 5min, 500g a 4°C (para eliminar posibles células muertas y restos celulares que interfirieran con el resultado) y el sobrenadante fue transferido a otro tubo. Por otro lado, los lisados celulares se sometieron a tres ciclos de sonicación de 5s de ultrasonidos y 15s de parada utilizando un sonicador Branson SLPe para romper completamente las membranas celulares. A continuación, se transfirieron 100µl de cada muestra (medio control, medio celular, lisado celular) a un tubo nuevo donde se añadieron 200µl de metanol (MetOH; Panreac) frío para precipitar las proteínas. La solución resultante se vorteoó y centrifugó a 17000g, 5min a 4°C. 100µl del sobrenadante fueron recogidos para su análisis por UPLC-MS/MS (**Ilustración 22**).

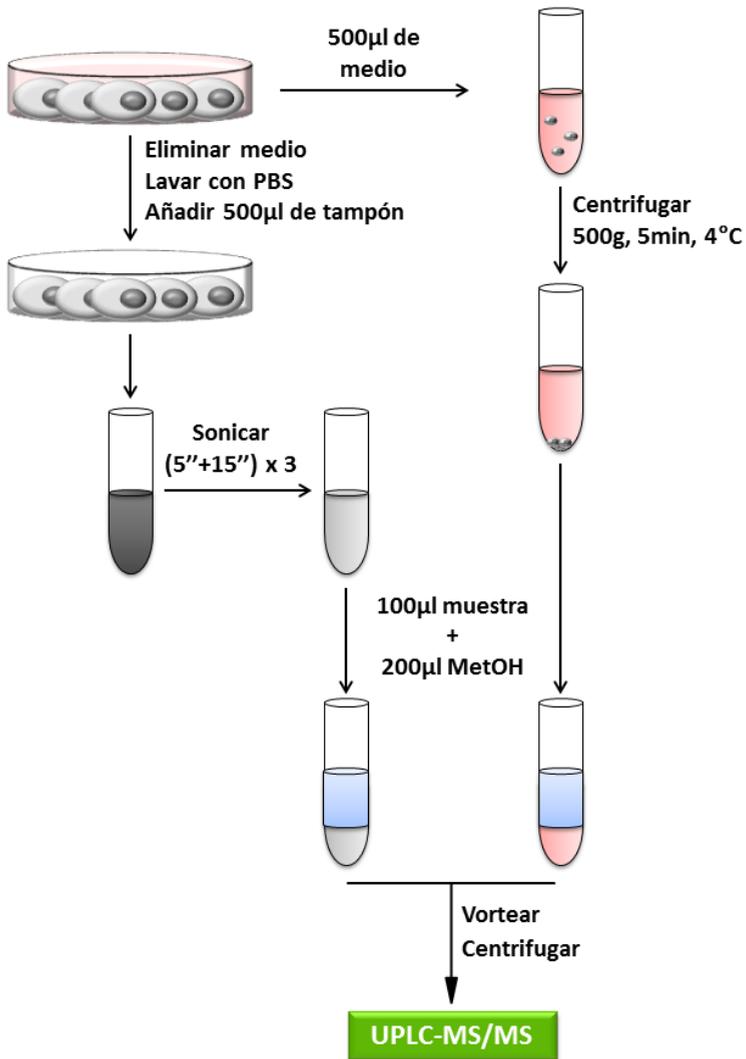


Ilustración 22: Esquema de la preparación de muestras para el análisis por UPLC-MS/MS

En todos los casos, se inyectaron 5µl de muestra en la columna de UPLC con un flujo de 0.4ml/min y a temperatura ambiente. El proceso cromatográfico se realizó en gradiente donde los eluyentes fueron: A= 0.1% de ácido fórmico en agua y B= MetOH. En la siguiente ilustración se muestra el gradiente en función del porcentaje de B.

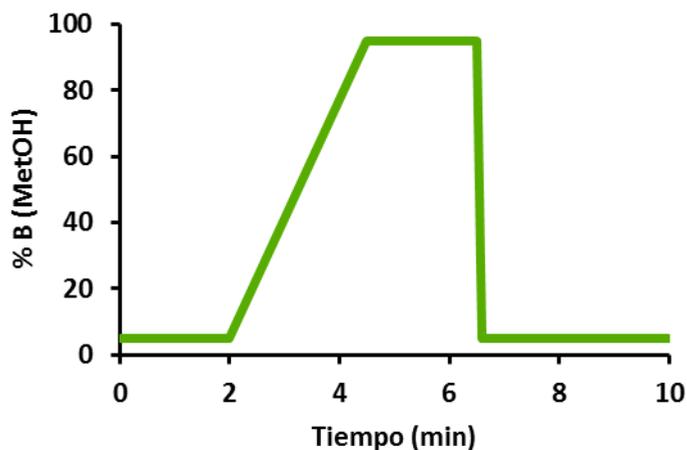


Ilustración 23: Gradiente de elución: % de B (MetOH)

Los compuestos en estudio se eluyeron cuando el porcentaje de MetOH era del 95%. El proceso se finalizó con un reequilibrado de la columna para volver a sus condiciones iniciales (95% de A/ 5% de B).

Las condiciones empleadas para la espectrometría de masas fueron las expuestas en la **Tabla 3**.

<b>Electrospray</b>	Negativo (ES-)
<b>Energía del capilar</b>	2.99 KeV
<b>Temperatura de la fuente</b>	120°C
<b>Gas de secado/nebulización</b>	Nitrógeno (flujo: 600 l/h)
<b>Temperatura de solvatación</b>	300°C
<b>Gas de colisión</b>	Argón ( $1.5 \times 10^{-3}$ mbar)

Tabla 3: Condiciones para la espectrometría de masas. Kiloelectronvoltio (KeV); milibar (mbar)

Las transiciones seleccionadas para la determinación del PTER y sus conjugados sulfatados (PTER-S) y glucuronidados (PTER-GLU) con sus respectivas energías de colisión e ionización se muestran en la **Tabla 4**.

Compuesto	Transición (m/z)	Energía del cono (Ev)	Energía de colisión (Ev)	Tiempo de retención (min)
<b>PTER</b>	255.05>255.05	40	27	5.48
<b>PTER-S</b>	335>255.1	40	27	5.50
<b>PTER-GLU</b>	431>175	40	27	5.20

**Tabla 4: Transiciones seleccionadas. Masa/carga (m/z); Electronvoltio (Ev)**

La concentración del PTER se determinó realizando previamente una curva de calibrado que abarcaba valores de concentración entre 0.01-50 $\mu$ M. Los resultados se expresan en nmoles de PTER en porcentaje con respecto al control y, en el caso del resto de compuestos incluyendo el PTER, se representan las áreas obtenidas tras la integración de los datos.

## 22. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar. Ésta última se representa en forma de barras de error mostrándose solo la semibarra positiva para simplificar los gráficos.

Los datos fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA) de un factor o de varios factores, según fue lo más apropiado. La homogeneidad de las varianzas fue analizada por el test de Levene. La hipótesis nula fue aceptada para todos aquellos valores de los test en los que el valor F no resultó significativo con un valor de p mayor de 0.05. Los datos para los cuales el valor F fue significativo, se analizaron con un test de Tukey en caso del ANOVA de un factor, o con un test de Bonferroni en caso del ANOVA de varios factores.

Los programas informáticos utilizados han sido Excel para el cálculo y gráficos y el GraphPad Prism v.5.0 para la realización del análisis estadístico.

# RESULTADOS

---



# 1. COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS ANTITUMORALES DEL PTEROSTILBENO Y EL RESVERATROL

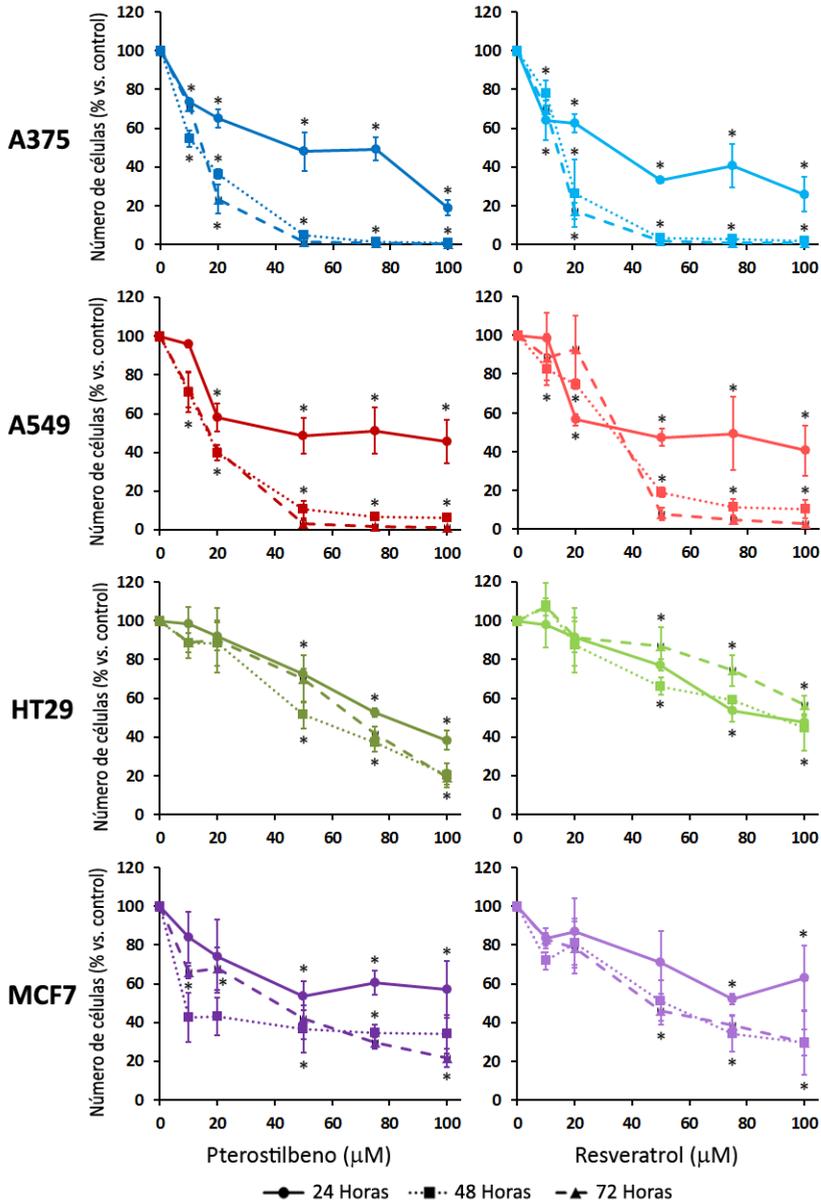
---

## 1.1. Efectos citotóxicos del pterostilbeno en comparación con el resveratrol

Con el objeto de estudiar los posibles efectos antitumorales del PTER y el RESV, se trataron *in vitro* 4 líneas tumorales humanas de distintos orígenes: A375 (melanoma), A549 (pulmón), HT29 (colon) y MCF7 (mama). Se utilizaron concentraciones crecientes de ambos polifenoles (0, 10, 20, 50, 75 y 100 $\mu$ M). A distintos tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas) se realizaron contajes celulares, obteniéndose los resultados que se muestran en la **Figura 1**.

Tal y como podemos observar en esta figura, el tratamiento con ambos polifenoles reduce el número de células *in vitro*, y este efecto es concentración y tiempo dependiente. Así mismo, los efectos son dependientes de la línea celular. En las líneas más sensibles a ambos polifenoles, las A375 y las A549, observamos una disminución más acusada del número de células con respecto al control. De hecho en ambas líneas podemos observar, a las 24h y a las concentraciones más bajas, una disminución de aproximadamente un 40% en el número de células viables. El número de células vivas a las 48h y 72h también a las concentraciones más bajas disminuye entre un 60-80% llegando a ser prácticamente cero a partir del tratamiento con 50 $\mu$ M de PTER y RESV. Sin embargo, las líneas HT29 y MCF7 son más resistentes, mostrando como máximo una reducción del 80% en el número de células, incluso a la concentración más alta y en el tiempo de incubación más largo.

Esta diferencia en la sensibilidad al tratamiento entre líneas también se pone de manifiesto en la **Tabla 5** donde se han obtenido las IC50s (concentración necesaria para reducir crecimiento celular en un 50%) de ambos polifenoles en todas las líneas.



**Figura 1: Efecto del PTER y el RESV en el crecimiento tumoral *in vitro*.**

Las líneas celulares se incubaron 24, 48 y 72h (línea continua, punteada y discontinua respectivamente) con las concentraciones indicadas de ambos polifenoles. El número de células vivas fue analizado utilizando el Countess® Automatic Cell Counter (Invitrogen). Los resultados se expresan como número de células en porcentaje con respecto al control ± desviación estándar donde el control es 100 (n=4). Los resultados fueron analizados

estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguida de un test de Tukey donde  $*p < 0.05$  en comparación con el grupo control.

Tanto en la **Figura 1** como en la **Tabla 5**, observamos como el PTER muestra efectos antitumorales similares e incluso más potentes que el RESV. De hecho, en la **Tabla 5** observamos como los valores de IC50 del PTER son menores que los del RESV en todas las líneas.

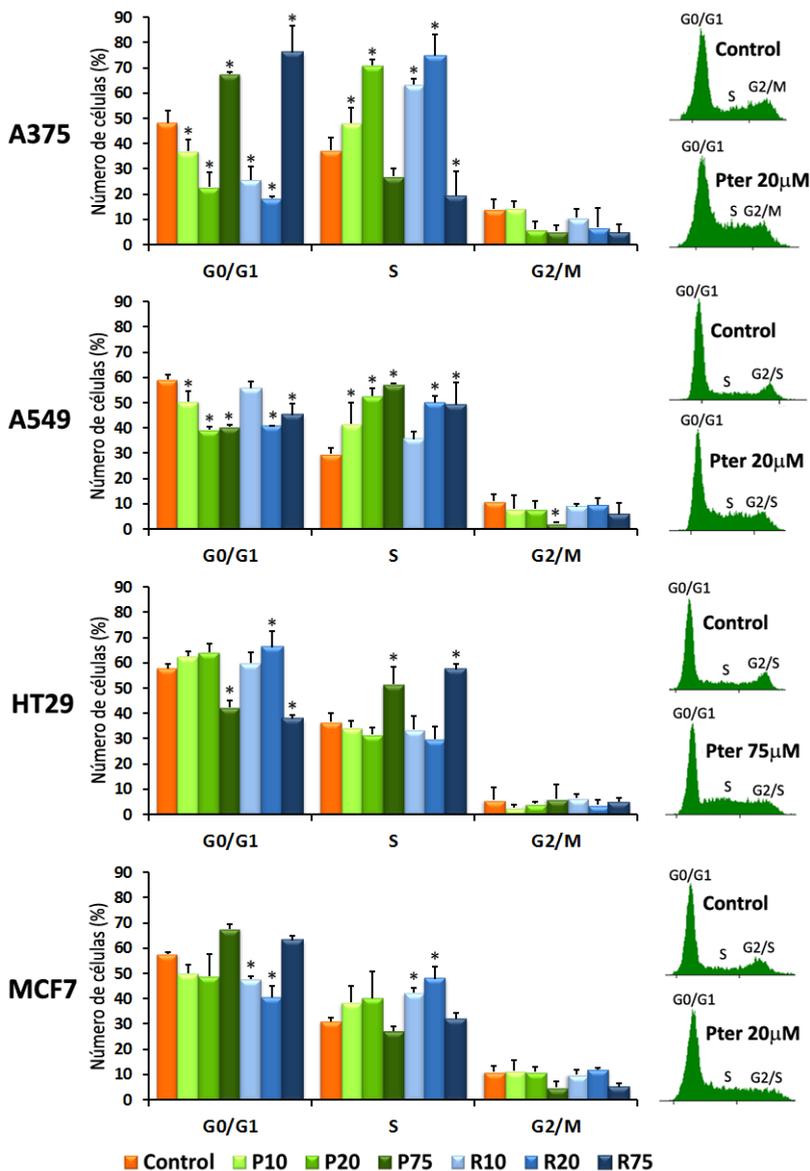
Línea celular	IC50	
	Pterostilbeno ( $\mu\text{M}$ )	Resveratrol ( $\mu\text{M}$ )
<b>A375</b>	14,66	25,51
<b>A549</b>	28,55	36,23
<b>HT29</b>	60,26	71,86
<b>MCF7</b>	43,99	56,64

**Tabla 5: IC50 de PTER y RESV para las cuatro líneas tumorales *in vitro*.**

Las diferentes líneas fueron sembradas en placas de 96 pocillos. A las 24 horas de la siembra fueron añadidas distintas concentraciones de PTER o RESV ( $0\mu\text{M}$ - $200\mu\text{M}$ ). 48h tras la adición las células fueron fijadas y tratadas según el protocolo de la sulforhodamina B para la cuantificación indirecta del número de células. A partir de los datos obtenidos de 3 experimentos diferentes con 3 réplicas cada uno se calcularon las IC50s mediante regresión no lineal con el software GraphPad Prism.

## 1.2. Efecto citostático del pterostilbeno en comparación con el resveratrol: Alteración del ciclo celular y de la síntesis de ADN

Dado que los resultados obtenidos mediante los estudios de citotoxicidad demuestran que el PTER induce muerte celular en todas las líneas testadas (**Figura 1**), nos planteamos si este efecto va acompañado o precedido de una parada de ciclo celular, y si es similar al producido por el RESV.



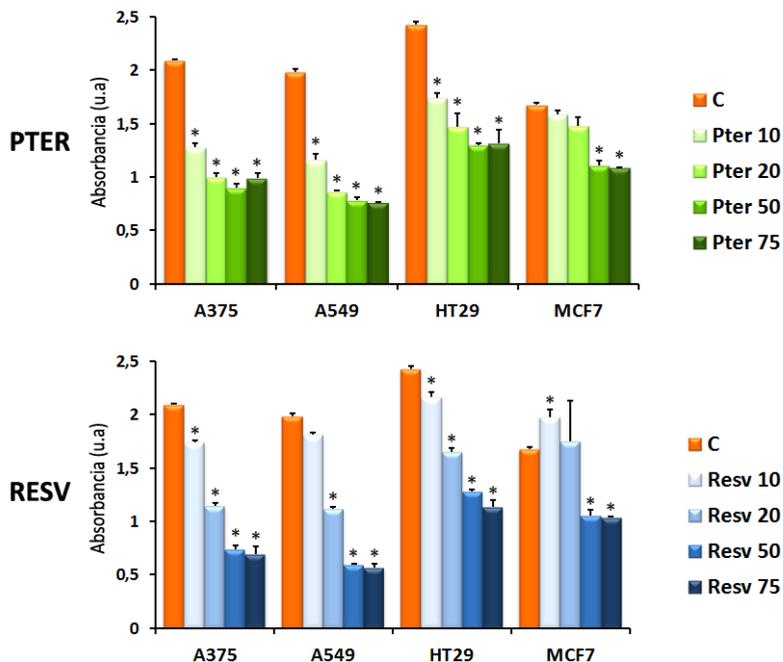
**Figura 2: Efecto del PTER y el RESV en la distribución del ciclo celular.**

Las cuatro líneas tumorales se sembraron en placas de 6 pocillos y tras 24h fueron tratadas con las concentraciones indicadas de PTER o RESV. 24h después fueron fijadas y teñidas con IP tal y como se explica en el apartado de material y métodos. El número de células en cada fase del ciclo (mostrado en los gráficos) y el contenido de ADN (mostrado en los histogramas) fue analizado por citometría (10.000 eventos celulares/muestra). En los gráficos los resultados se expresan como número de células en porcentaje con

respecto al control  $\pm$  desviación estándar donde el control es 100 (n=3). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguida de un test de Bonferroni donde  $*p < 0.05$  en comparación con el grupo control. También se muestran los histogramas representativos del ciclo celular del grupo control y de un grupo tratado con PTER.

Para ello analizamos el efecto que producen ambos polifenoles sobre la distribución del ciclo celular tras 24h de incubación (**Figura 2**). Tal y como se observa en esta figura, ambos polifenoles se comportan de forma similar produciendo en las líneas A375 y A549 una parada de ciclo en fase S a las concentraciones más bajas ensayadas (10 y 20 $\mu$ M), e incluso en G0/G1 a concentraciones mayores. Observamos también una parada de ciclo similar en fase S en la línea HT29, pero en este caso a la concentración más elevada (75 $\mu$ M). En la línea MCF7 también observamos una tendencia a la acumulación en fase S a concentraciones bajas (10 y 20 $\mu$ M).

Así mismo, para evaluar el efecto del PTER y el RESV sobre la síntesis de ADN, evaluamos la incorporación de BrdU al ADN en síntesis de las células en proliferación. Para ello incubamos las células 4h con los polifenoles y a continuación añadimos BrdU durante 2h más. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 3**. En ella podemos observar cómo, incluso a las concentraciones más bajas, la incorporación de BrdU, y por tanto, la síntesis del ADN disminuye, con respecto al control, de forma similar en las células tratadas con ambos polifenoles. Además, en ambos casos podemos observar como las líneas A375 y A549 muestran una disminución en la síntesis del ADN más acentuada que las líneas HT29 y MCF7.



**Figura 3: Efecto del PTER y el RESV en la síntesis del ADN.**

Las cuatro líneas tumorales se sembraron en placas de 96 pocillos y tras 24h fueron tratadas con las concentraciones indicadas de PTER o RESV. La síntesis de ADN se evaluó determinando la incorporación de BrdU al ADN tras 4h de incubación con las distintas concentraciones de PTER o RESV, seguidas por 2h más junto con 10 $\mu$ M de BrdU. Los resultados se expresan como unidades de absorbancia  $\pm$  desviación estándar (n=3). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguida de un test de Bonferroni donde \*p<0.05 en comparación con el grupo control.

## 2. ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR EL PTEROSTILBENO

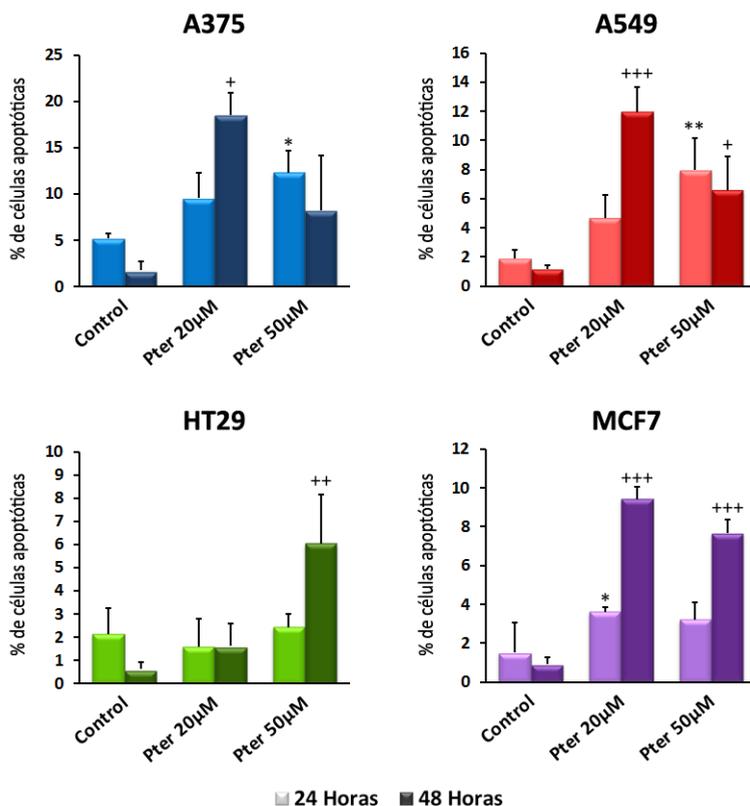
Tras comprobar que el efecto antitumoral del PTER y el RESV es similar, nos centramos en determinar cuáles son los mecanismos de muerte celular inducidos por el PTER, ya que, a diferencia del RESV, existe un escaso conocimiento al respecto. Con este fin, evaluamos

distintos tipos de muerte: apoptosis, necrosis y necroptosis, autofagia y muerte celular lisosomal.

## 2.1. Apoptosis

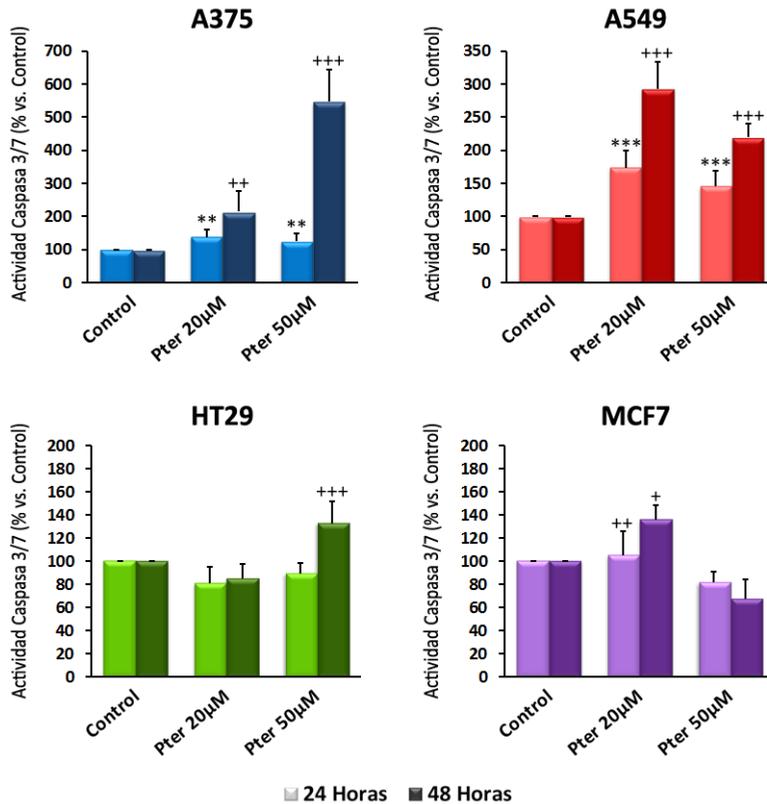
Para evaluar si el PTER induce muerte celular por apoptosis analizamos el porcentaje de células apoptóticas por microscopía automatizada de fluorescencia, 24 y 48h tras el tratamiento con PTER. Para ello, teñimos las células con anexina V-FITC, una proteína que se une al fosfolípido fosfatidilserina, y con IP, un agente intercalante del ADN. De este modo obtenemos el porcentaje de células apoptóticas tempranas y tardías representando la suma de ambas. Los resultados se muestran en la **Figura 4**, en la que podemos observar como excepto en la línea HT29 todas siguen la misma tendencia: a las 24h se observa un aumento concentración dependiente del porcentaje de células apoptóticas, mientras que a las 48h observamos un aumento mayor pero solo con PTER 20 $\mu$ M (entre un 10-20% de células), ya que con 50 $\mu$ M se produce una disminución del número de células apoptóticas. Estos cambios son más acusados en las líneas A375 y A549 que en la línea MCF7, y a 48h es completamente diferente. En el caso de la línea HT29, observamos solo un aumento del porcentaje de células apoptóticas a 48h y con la concentración más elevada de PTER (50 $\mu$ M).

Para comprobar si la apoptosis producida es debida a la activación de las caspasas-3 y 7 (las principales efectoras del proceso apoptótico), medimos su actividad a los mismos tiempos de incubación y las mismas concentraciones de PTER que en el caso anterior. Estos datos se representan en la **Figura 5**, donde podemos observar que la incubación con el polifenol induce la activación de las caspasas-3 y 7. Estos cambios siguen siendo más evidentes en las líneas A375 y A549 que en las HT29 y MCF7 donde la actividad caspasa es escasa.



**Figura 4: Inducción de apoptosis**

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos negras de fondo transparente y 24h más tarde fueron tratadas con PTER (20 y 50µM). Tras 24 (color claro) y 48 (color oscuro) horas de tratamiento fueron teñidas con anexina V-FITC, Hoechst 33342 y IP. El análisis de la muerte celular se llevó a cabo por microscopía automatizada de fluorescencia, contabilizándose como células apoptóticas aquellas teñidas solo con anexina (apoptóticas tempranas) y las teñidas con anexina y IP (apoptóticas tardías) y la totalidad de las células teñidas con Hoechst. Los datos se representan como porcentaje de células apoptóticas (tempranas más tardías) ± desviación estándar (n=3). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test de Tukey donde \*p<0.05 y \*\*p<0.01 con respecto al grupo control a las 24h de tratamiento; y +p<0.05, ++p<0.01 y +++p<0.001 con respecto al grupo control a las 48h de tratamiento.

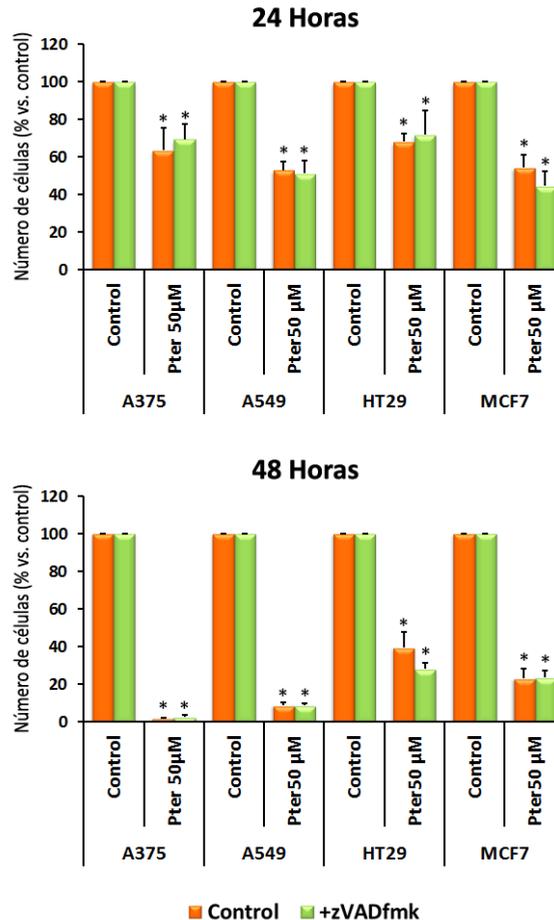


**Figura 5: Inducción de la actividad caspasa-3/7 por el PTER.**

Las cuatro líneas tumorales se sembraron en placas de 96 pocillos y se determinó la actividad caspasa-3/7 tras 24 (color claro) y 48 (color oscuro) horas de tratamiento con concentraciones crecientes de PTER. Los resultados se expresan como unidades relativas de fluorescencia (proporcional a la actividad caspasa-3/7) con respecto al número de células, en porcentaje con respecto al control  $\pm$  desviación estándar, donde el control es 100 ( $n=3$ ). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test de Tukey donde  $**p<0.01$  y  $***p<0.001$  con respecto al grupo control a las 24h de tratamiento; y  $+p<0.05$ ,  $++p<0.01$  y  $+++p<0.001$  con respecto al grupo control a las 48h de tratamiento.

Para evaluar la contribución de las caspasas en la apoptosis inducida por el PTER, tratamos las células con PTER 50µM en presencia o ausencia de un inhibidor pancaspasa, el Z-VAD-FMK (20µM), y determinamos el número de células tras 24 y 48 horas de tratamiento.

Tal y como podemos observar en la **Figura 6**, el inhibidor pancaspasa fue incapaz de revertir la muerte celular inducida por el PTER, ya que no observamos diferencias significativas en el número de células en las condiciones tratadas con PTER con o sin Z-VAD-FMK a ninguno de los dos tiempos de tratamiento.



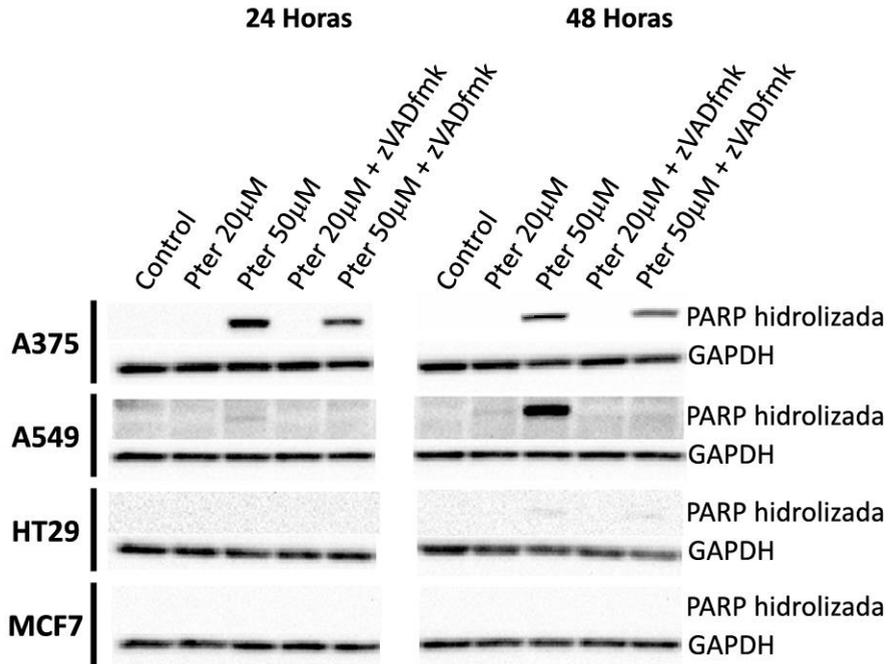
**Figura 6: Contribución de la apoptosis dependiente de caspasas a la muerte celular inducida por el PTER.**

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y tratadas durante 24 y 48h con PTER 50µM. En las condiciones correspondientes, las células se pretrataron con el inhibidor pancaspasa Z-VAD-FMK (20µM) una hora antes de la adición del PTER y se dejaron incubando con él durante todo el experimento. El número de células fue analizado utilizando el Countess® Automatic Cell Counter (Invitrogen). Los resultados se

expresan como número de células en porcentaje con respecto al control  $\pm$  desviación estándar (n=3). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test de Tukey donde \* $p < 0.05$  con respecto al grupo control.

Para completar el estudio de la inducción de apoptosis por PTER, nuestro siguiente paso fue evaluar mediante *western blot* el fragmento mayor (89 kDa) de la proteína poli ADP-ribosa polimerasa o PARP (**Figura 7**). PARP, una proteína nuclear implicada en la detección y reparación del daño en el ADN, es un sustrato de las caspasas-3 y 7, por lo que si estas están activadas, tienen la capacidad de fragmentarla. Por tanto la detección del fragmento mayor de PARP es un parámetro indicativo de la activación de las caspasas (Duriez and Shah, 1997; Germain et al., 1999). Este experimento también lo hicimos con dos concentraciones distintas de PTER, a dos tiempos distintos y en presencia o ausencia de Z-VAD-FMK. Como podemos observar en la **Figura 7**, solo se observa la fragmentación de PARP en las líneas A375 y A549. Además, observamos que el Z-VAD-FMK es un buen inhibidor de la actividad pancaspasa ya que revierte la fragmentación de PARP.

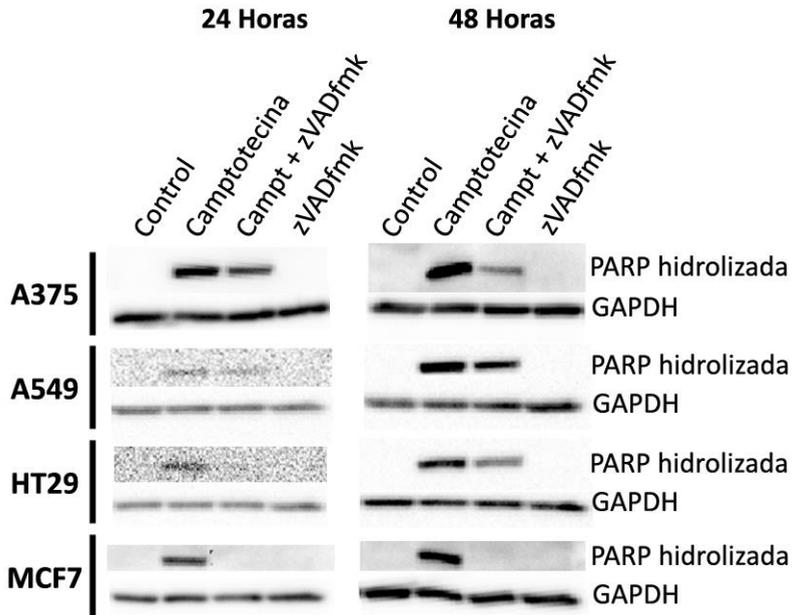
Para corroborar esto último, hicimos una serie de experimentos utilizando como control positivo de apoptosis la camptotecina a la concentración de 50nM para la línea A375 y 500nM para el resto de líneas. Estas concentraciones las seleccionamos en función de la IC50 de la camptotecina para cada una de estas líneas. En primer lugar, volvimos a realizar un *western blot* del fragmento mayor de PARP, en este caso tratando las cuatro líneas con camptotecina y con o sin Z-VAD-FMK (**Figura 8**). Tal y como ya observábamos en la **Figura 7**, el Z-VAD-FMK es capaz de disminuir la fragmentación de PARP en todas las líneas.



**Figura 7: Fragmentación de PARP.**

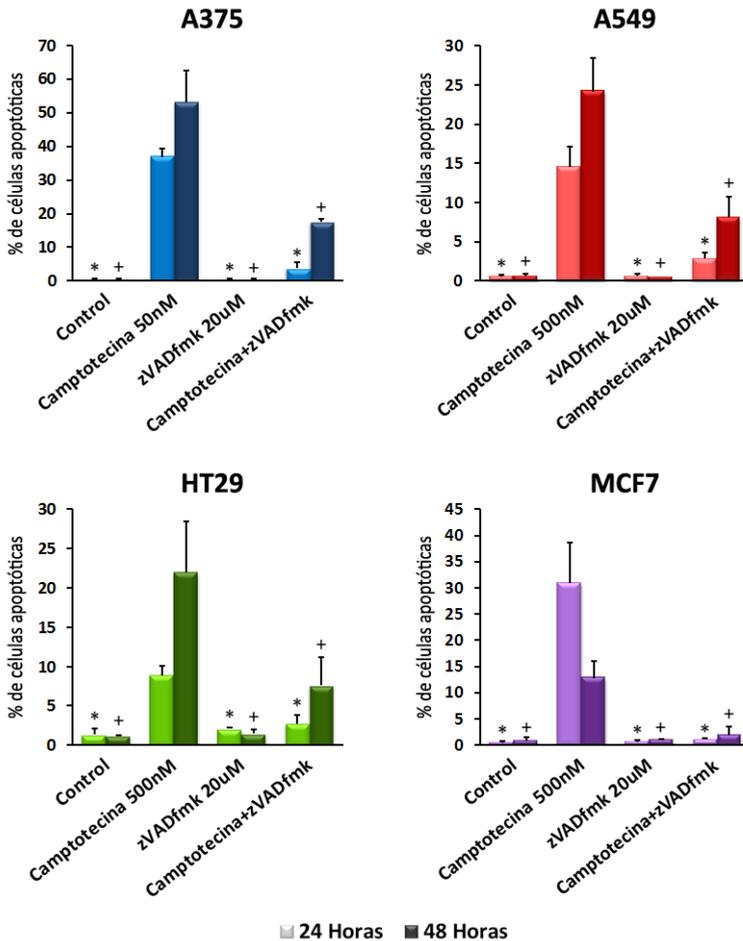
Las cuatro líneas celulares fueron sembradas, y tras 24h, tratadas durante 24 o 48 horas más con PTER 20 o 50µM. En las condiciones correspondientes, las células se pretrataron con el inhibidor pancaspasa Z-VAD-FMK (20µM) una hora antes de la adición del PTER. A los tiempos correspondientes (24 y 48h tras la adición del PTER), se extrajeron proteínas para evaluar mediante *western blot* la existencia del fragmento mayor (89 kDa) del enzima PARP. Como control de carga se utilizó la GAPDH. La imagen corresponde a un experimento representativo de 4 experimentos similares.

Por último, y también tras tratar las células con camptotecina a las mismas concentraciones que en el experimento anterior, y en presencia o en ausencia de Z-VAD-FMK, incubamos las células con anexina V-FITC, y contamos con un microscopio de fluorescencia el número de células teñidas con respecto al total, obteniendo el porcentaje de células apoptóticas. Los resultados se muestran en la **Figura 9**, donde podemos observar como el Z-VAD-FMK da lugar a una disminución significativa del número de células apoptóticas con respecto al grupo tratado con camptotecina, en todas las líneas y a los dos tiempos de incubación utilizados (24 y 48h).



**Figura 8: Capacidad del inhibidor pancaspasa Z-VAD-FMK: Fragmentación de PARP.**

24h después de la siembra, las cuatro líneas celulares fueron tratadas durante 24 o 48 horas más con la camptotecina, un control positivo de apoptosis, a la concentración de 50nM en la línea A375 y 500nM en el resto de líneas. En las condiciones correspondientes, las células se pretrataron con el inhibidor pancaspasa Z-VAD-FMK (20 $\mu$ M) una hora antes de la adición de la camptotecina. Tras 24 y 48h de tratamiento con la camptotecina, se extrajeron proteínas para evaluar mediante *western blot* la existencia del fragmento mayor (89 kDa) del enzima PARP. Como control de carga se utilizó la GAPDH. La imagen corresponde a un experimento representativo de 4 experimentos similares.



**Figura 9: Actividad del inhibidor pancaspasa Z-VAD-FMK: % de células apoptóticas.**

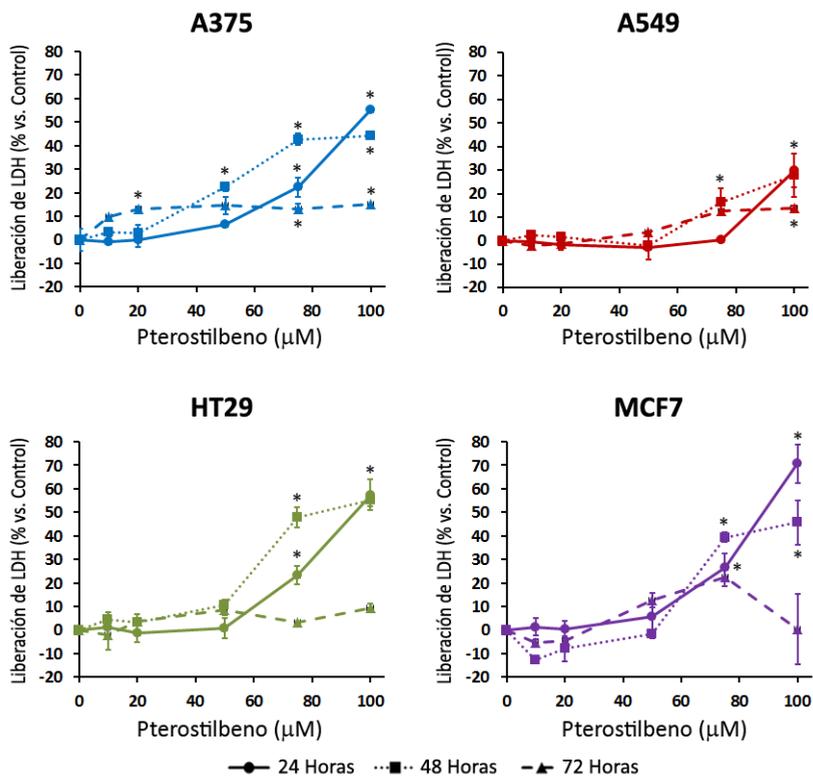
Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y tras 24h, tratadas con camptotecina, 50nM en la línea A375 y 500nM en el resto de líneas. En las condiciones correspondientes, las células se pretrataron con el inhibidor Z-VAD-FMK (20µM) una hora antes de la adición de la camptotecina. Tras 24 (color claro) y 48h (color oscuro) de incubación, las células fueron teñidas con anexina V-FITC. En la figura se representa el número de células anexina-V positivas con respecto al número total de células (%) ± desviación estándar (n=3). Esto se determinó por microscopía de fluorescencia. El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test de Tukey donde \*p<0.05 con respecto al grupo tratado con camptotecina a las 24h de tratamiento; y +p<0.05 con respecto al grupo tratado con camptotecina a las 48h de tratamiento.

## 2.1. Necrosis

Tras evaluar el efecto del PTER como inductor de muerte celular por apoptosis, estudiamos de forma paralela su capacidad para inducir necrosis.

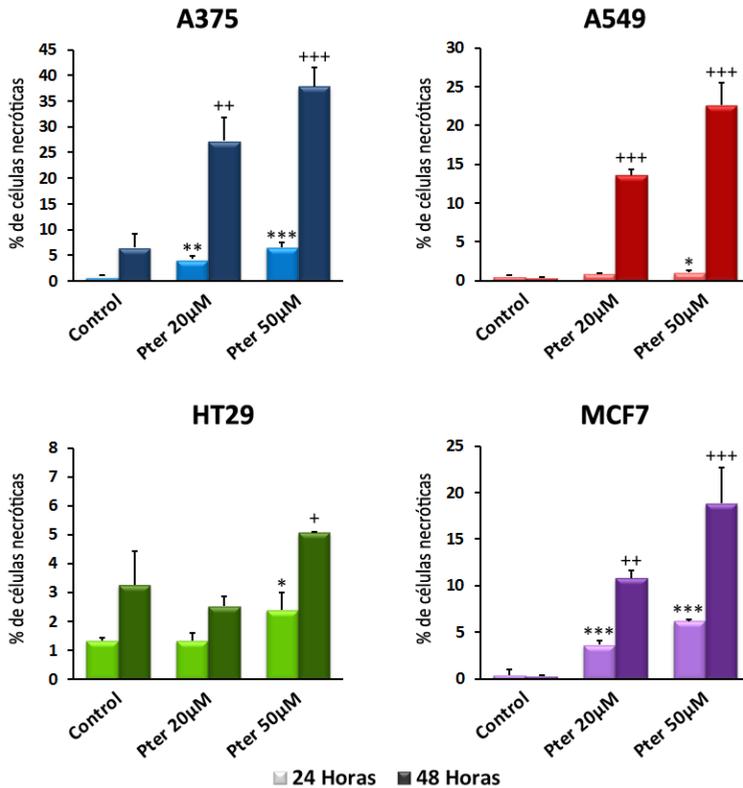
En primer lugar evaluamos la integridad de la membrana plasmática midiendo la actividad de la enzima LDH liberada al medio de cultivo extracelular (Vanden Berghe et al., 2013). Para ello incubamos las 4 líneas celulares con concentraciones crecientes de PTER (0, 10, 20, 50, 75 y 100 $\mu$ M) y a distintos tiempos (24, 48 y 72h). En la **Figura 10** podemos observar la liberación de LDH a partir de las 24h en todas las líneas a concentraciones de PTER de 75 $\mu$ M o superiores. Por debajo de esta concentración, todas las líneas muestran una liberación como máximo de un 10% con respecto al control, excepto la línea celular A375 que con 50 $\mu$ M de PTER muestra una liberación de LDH del 20%.

A continuación evaluamos el porcentaje de células necróticas por microscopía automatizada de fluorescencia tras 24 y 48h de tratamiento con PTER. Para ello procedimos del mismo modo que en el caso de la detección de células apoptóticas, pero tras la tinción celular con Anexina-FITC y IP, solo contabilizamos las células teñidas únicamente con IP. Estos datos se muestran en la **Figura 11** en la que podemos observar un aumento concentración dependiente del porcentaje de células necróticas a los dos tiempos de tratamiento. Este aumento es mucho mayor a las 48h donde observamos un porcentaje de células necróticas de entre un 25-40% en el caso de la línea A375, entre un 10-25% en el caso de las líneas A549 y MCF7, y mucho más bajo en la línea HT29 en la que solo observamos un 5% de células necróticas a las 48h y con la concentración más elevada.



**Figura 10: Liberación de actividad LDH al medio extracelular.**

Tras 24h de la siembra, las cuatro líneas fueron tratadas durante 24, 48 y 72h (línea continua, punteada y discontinua respectivamente) con concentraciones crecientes de PTER (0, 10, 20, 50, 75 y 100μM). A los tiempos correspondientes se recogió una alícuota del medio extracelular donde se midió la actividad LDH. Los resultados se expresan como actividad LDH relativizada al número de células, en porcentaje con respecto al control  $\pm$  desviación estándar (n=3). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test de Tukey donde \*p<0.05.

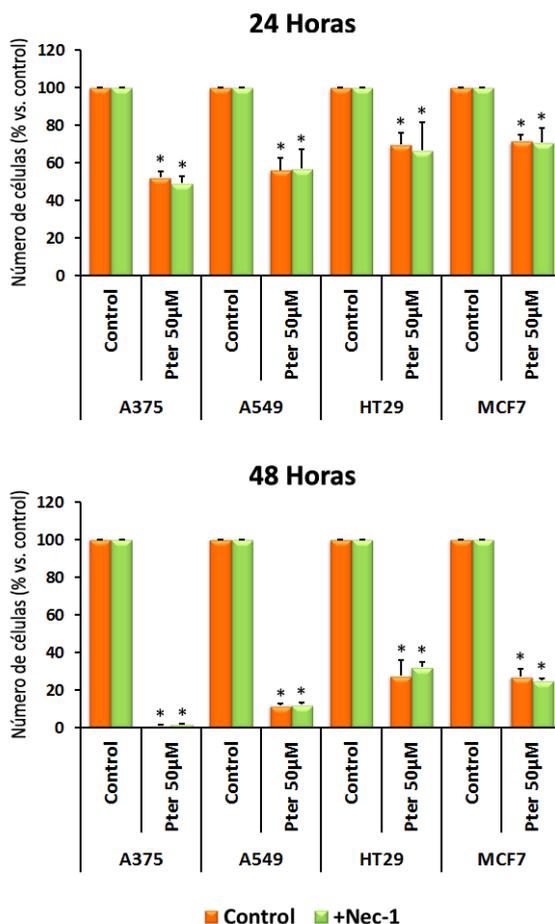


**Figura 11: Porcentaje de necrosis inducido por el PTER.**

24h después de la siembra de las células en placas de 96 pocillos negras de fondo transparente, éstas fueron tratadas con PTER (20 y 50µM) y tras 24 (color claro) y 48h (color oscuro) de tratamiento fueron teñidas con Hoechst 33342 e IP. El análisis de la muerte celular se llevó a cabo por microscopía automatizada de fluorescencia, contabilizándose como células necróticas aquellas teñidas con IP. Las teñidas con Hoechst se utilizaron para obtener el número de células totales. Los datos se representan como porcentaje de células necróticas  $\pm$  desviación estándar. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test de Tukey donde \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  con respecto al grupo control a las 24h de tratamiento; y + $p < 0.05$ , ++ $p < 0.01$  y +++ $p < 0.001$  con respecto al grupo control a las 48h de tratamiento.

Para determinar si la necrosis inducida por el PTER es programada, es decir, si era necroptosis, recurrimos a la utilización de un inhibidor de este tipo de muerte. Para ello, tratamos las células con PTER 50µM en presencia o ausencia de Nec-1. Tras 24 y 48h de tratamiento procedimos

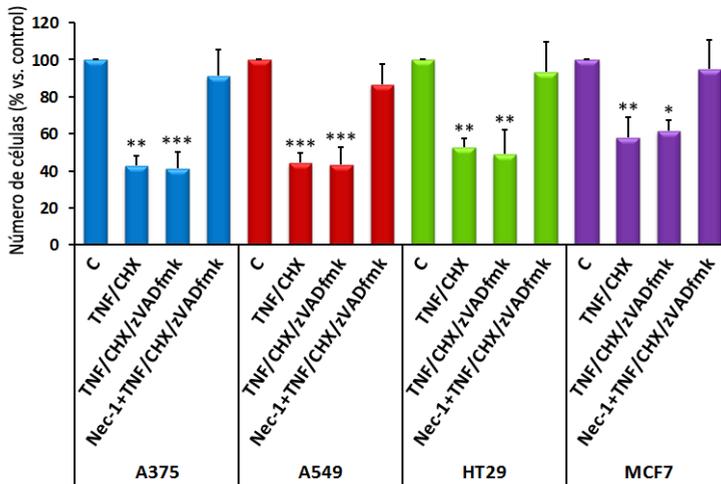
al conteo celular. Estos resultados se muestran en la **Figura 12**, en la que podemos observar que Nec-1 no revierte la muerte celular inducida por el PTER a ninguno de los dos tiempos de tratamiento.



**Figura 12: Contribución de la necrosis a la muerte celular inducida por el PTER.**

Las líneas celulares se sembraron en placas de 6 pocillos y tras 24h fueron pretratadas una hora antes de la adición de PTER 50µM, con 25µM del inhibidor Nec-1. Tras 24 y 48h de incubación con ambos compuestos, el número de células fue analizado utilizando el Countess® Automatic Cell Counter (Invitrogen). Los resultados se expresan como número de células en porcentaje con respecto al control  $\pm$  desviación estándar (n=3). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test de Tukey donde \*p<0.05 con respecto al grupo control.

Por último, para demostrar que Nec-1 es un buen inhibidor de la necrosis programada, realizamos un experimento utilizando como control positivo una combinación inductora de necrosis: TNF- $\alpha$  junto con CHX. A esta combinación le añadimos Z-VAD-FMK para inhibir la posible muerte por apoptosis, y para comprobar la capacidad inhibidora de la Nec-1, la añadimos en las condiciones correspondientes (Sawai and Domae, 2011). Tras 48h de tratamiento con los compuestos, procedimos al conteo celular que se muestra en la **Figura 13**. En ella podemos observar como Nec-1 es capaz de inhibir la muerte por necrosis inducida por el TNF- $\alpha$  y la CHX, ya que revierte la disminución en el número de células producida por dicha combinación.



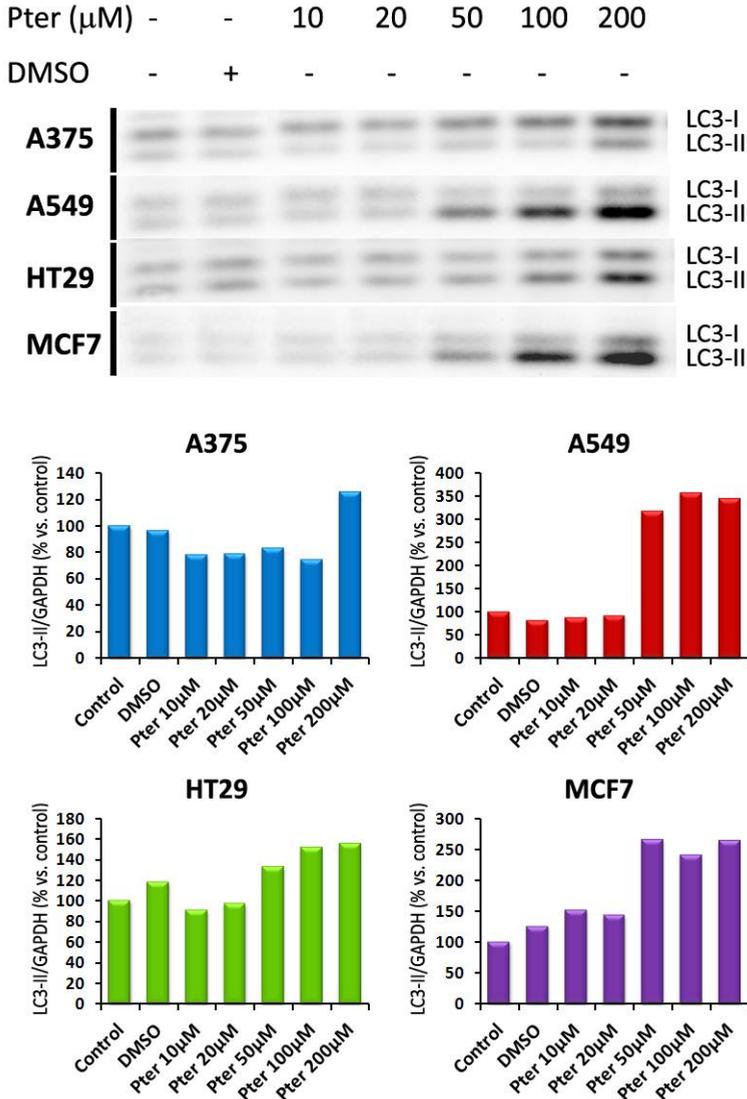
**Figura 13: Capacidad de Nec-1 como inhibidor de necrosis.**

Las células fueron tratadas 24h post-siembr con TNF- $\alpha$  (50ng/ml) y CHX (2 $\mu$ g/ml) durante 48h. En las condiciones correspondientes, antes de esta adición, las células fueron pretratadas durante una hora con Z-VAD-FMK (20 $\mu$ M) solo o en combinación con Nec-1 (25 $\mu$ M). El número de células fue analizado utilizando el Countess® Automatic Cell Counter (Invitrogen). Los resultados se expresan como número de células en porcentaje con respecto al control  $\pm$  desviación estándar, donde el control es 100 (n=3). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test de Tukey donde \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001 con respecto al grupo control.

## 2.2. Autofagia

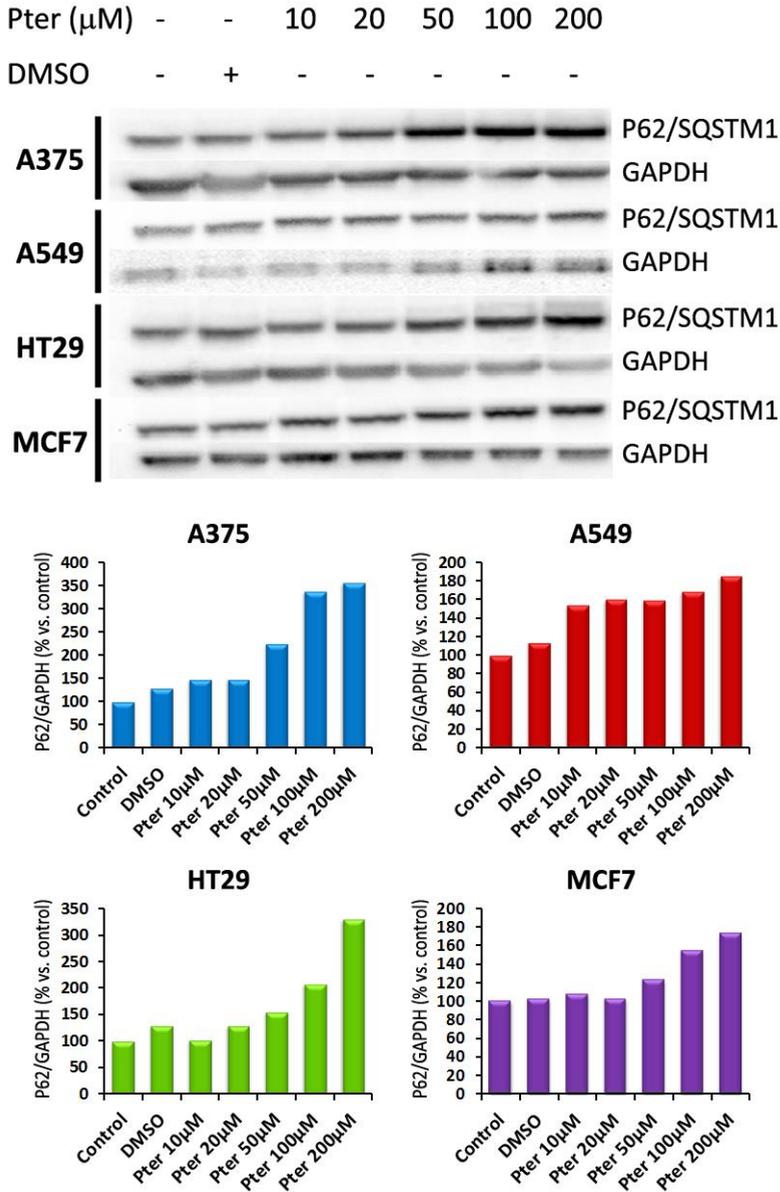
Tras evaluar la contribución de la apoptosis y la necrosis en el mecanismo de acción del PTER, nos centramos en el estudio de su capacidad para inducir muerte celular por autofagia. Para ello, en primer lugar, analizamos los niveles de LC3-II para evaluar la formación de autofagosomas, y los niveles de p62/SQSTM1 para evaluar el flujo autofágico. En caso de haber autofagia estos deberían aumentar y disminuir respectivamente (Bjorkoy et al., 2009; Klionsky et al., 2012; Mizushima and Yoshimori, 2007).

Tal y como podemos observar en la **Figura 14**, al analizar por *western blot* la proteína LC3-II a las 24 horas de tratamiento con PTER, observamos un aumento de sus niveles que se hace más acusado conforme aumentamos la concentración del polifenol. Sin embargo, en caso de p62/SQSTM1 (**Figura 15**), observamos un aumento de sus niveles de manera concentración-dependiente en todas las líneas. Como LC3-II es incorporado tanto a la membrana interna como a la externa de los autofagosomas, la expresión de la proteína GFP fusionada con LC3 se utiliza para identificar puntos que representan a los autofagosomas (Kimmelman, 2011). Por ello, para completar el estudio del efecto del PTER sobre la inducción y el flujo autofágico, transfectamos las cuatro líneas tumorales con el vector pEGFP-LC3. A continuación, las tratamos durante 24h con 50 $\mu$ M de PTER, o 1h con 100nM de rapamicina como control positivo. De esta forma, en la **Figura 16** se muestran, por un lado y a modo representativo, imágenes de microscopía confocal de la línea celular MCF7-EGFP-LC3. En estas imágenes podemos observar que al comparar las células tratadas con PTER y las tratadas con rapamicina, aparece un número similar de células punteadas, es decir, que en ambas condiciones existe una relocalización de LC3 que se corresponde con la formación de autofagosomas. Sin embargo, este acúmulo citoplasmático de LC3 tiene un aspecto diferente en cada condición, mientras en las células tratadas con rapamicina observamos pequeñas vesículas, en las células tratadas con PTER éstas se encuentran agregadas. Por otro lado, se muestra que en todas las líneas el tratamiento con PTER induce acúmulo de autofagosomas en un 30-40% de las células.



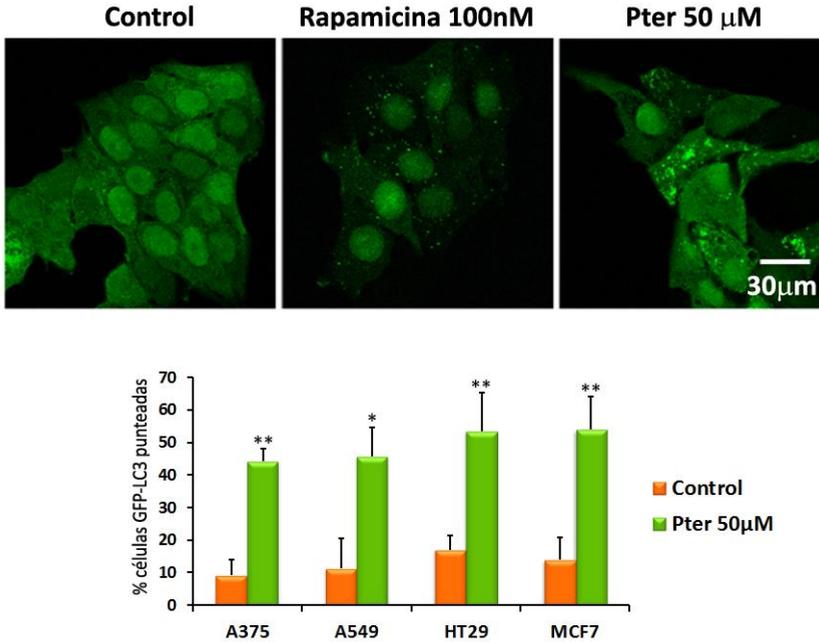
**Figura 14: Efecto del PTER en el flujo autofágico: Niveles de LC3**

Las 4 líneas celulares se trataron, 24h post-siembra, con concentraciones crecientes de PTER (10-200 $\mu\text{M}$ ), o con el vehículo. Tras 24h de tratamiento, las células fueron lisadas para la extracción de proteínas y el posterior análisis por *western blot* de los niveles de LC3-I y II (parte superior de la figura). En la parte inferior de la figura se representan las densitometrías obtenidas al relativizar los niveles de LC3-II a la GAPDH. Estos resultados se expresan como porcentaje con respecto al control. La imagen corresponde a un experimento representativo de 4 experimentos similares.



**Figura 15: Efecto del PTER en el flujo autofágico: niveles de p62/SQSTM1.**

24h después de la siembra, las células se trataron con concentraciones crecientes de PTER (10-200 $\mu\text{M}$ ). Tras 24h se realizó la extracción de proteínas. En la parte superior se muestran las imágenes de *western blot* de las proteínas p62/SQSTM1 y GAPDH. En la parte inferior se representan los niveles densitométricos de p62/SQSTM1 relativizados con respecto a los niveles de GAPDH como porcentaje con respecto al control. La imagen corresponde a un experimento representativo de 4 experimentos similares.



**Figura 16: Efecto del PTER en el flujo autofágico. Localización de LC3.**

Las cuatro líneas celulares fueron transfectadas con el vector pEGFP-LC3 y tratadas durante 24h con 50μM de PTER o 1h con 100nM de rapamicina. En la parte superior de la figura se muestran las imágenes visualizadas por microscopía confocal de la línea MCF7 a modo representativo (Imágenes similares se obtuvieron en las demás líneas). En la parte inferior de la figura, el gráfico muestra el porcentaje de células punteadas en la condición control y en la tratada con 50μM de PTER durante 24h (n=4). Se consideraron células punteadas aquellas que poseían más de 25 puntos. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguida de un test de Bonferroni donde \*p<0.05; y \*\*p<0.01 con respecto al grupo control.

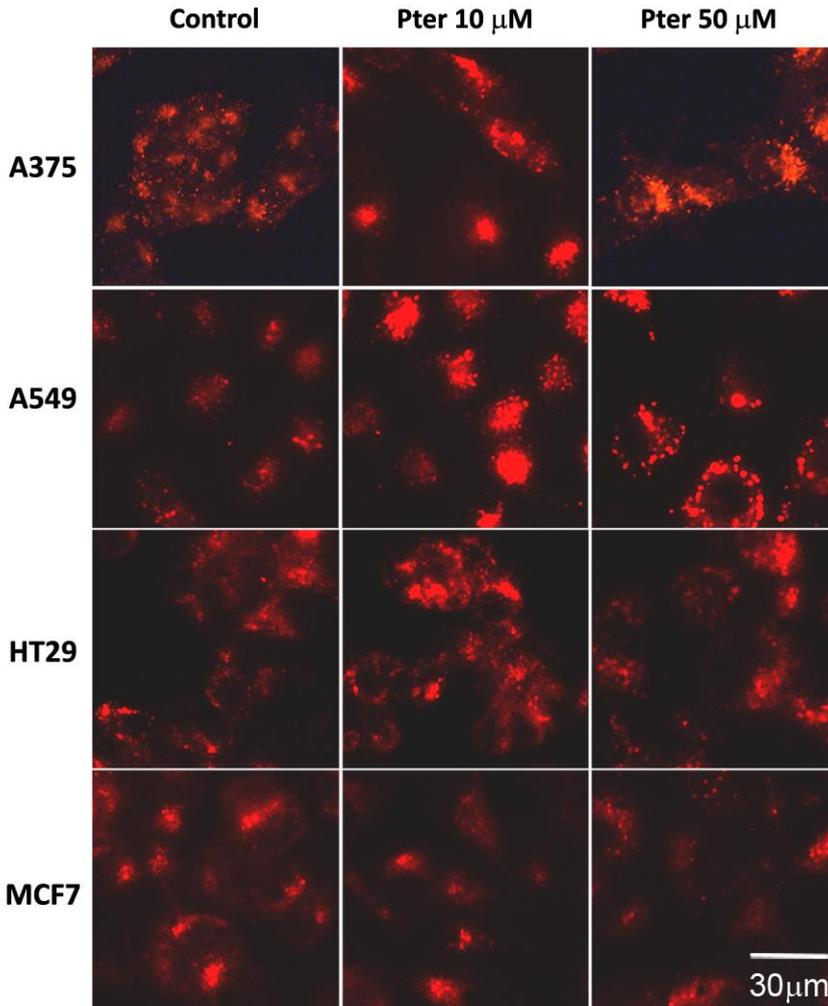
### 3. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LA PERMEABILIZACIÓN DE LA MEMBRANA LISOSOMAL EN LA CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR EL PTER

---

Tras analizar los tres tipos de muerte celular programada clásica y debido a la posible alteración de los lisosomas, nos centramos en el estudio de un tipo de muerte celular programada alternativa, la muerte celular lisosomal.

Para estudiar si el PTER induce este tipo de muerte, determinamos si existen alteraciones en la membrana lisosomal por distintos métodos. En primer lugar, evaluamos el volumen y la morfología de los lisosomas. Para ello, tras 24h de incubación de las células con PTER, teñimos las células con *LysoTracker red*, una sonda fluorescente que se acumula en el interior de orgánulos ácidos (preferentemente lisosomas) y puede ser detectado por microscopía de fluorescencia (Boya and Kroemer, 2008). Tal y como podemos observar en la **Figura 17** el PTER induce, incluso a bajas concentraciones, un aumento en la fluorescencia roja, es decir, un aumento en el número y/o tamaño de los lisosomas en todas las líneas, pero de forma más marcada en las A375 y A549.

Para evaluar la integridad de la membrana lisosomal, primeramente teñimos las células con el fluorocromo acidotrópico naranja de acridina. Este compuesto se acumula, de forma reversible, en orgánulos ácidos como los lisosomas emitiendo fluorescencia roja. Sin embargo, cuando se localiza en el citoplasma y núcleo donde su concentración es más baja y el pH más elevado, emite fluorescencia verde. Por ello, la fluorescencia del naranja de acridina depende tanto de su concentración como de los cambios de pH, siendo un buen indicador para monitorizar la integridad de la membrana lisosomal y/o los cambios en el pH lisosomal (Denamur et al., 2011; Trincheri et al., 2007).



**Figura 17: Tinción lisosomal con LysoTracker.**

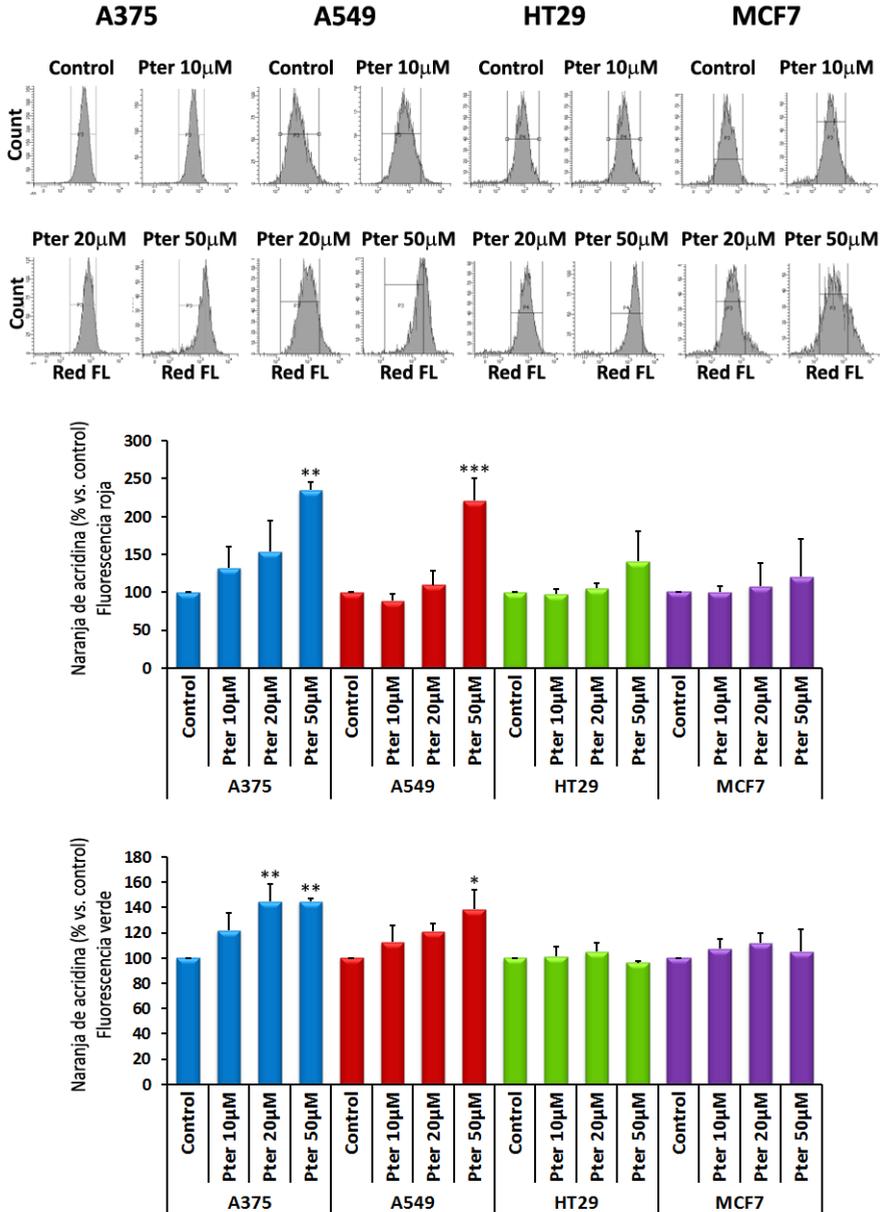
Las cuatro líneas celulares fueron sembradas en placas de 6 pocillos y tras 24h, tratadas con las concentraciones indicadas de PTER durante 24h más. Transcurrido este tiempo, las células fueron teñidas con *LysoTracker red* (75nM) durante 30 minutos y visualizadas por microscopía de fluorescencia.

En la **Figura 18** se muestra el análisis por citometría de flujo de las cuatro líneas teñidas con naranja de acridina tras 24h de tratamiento con distintas concentraciones de PTER. Tal y como se puede observar, en las células tratadas con el polifenol se produce tanto un aumento en la

fluorescencia roja como un aumento, menos pronunciado, en la fluorescencia verde en comparación con las células control, indicando alteraciones a nivel lisosomal. Estos cambios ocurren fundamentalmente en las líneas celulares más sensibles al tratamiento (A375 y A549).

A continuación, para confirmar estas alteraciones, nos centramos en evaluar la liberación al citosol de cisteín y aspartil catepsinas lisosomales, lo cual es un marcador de permeabilización de la membrana lisosomal (Boya and Kroemer, 2008). Para ello, por un lado, tras el tratamiento durante 24h con PTER 20 $\mu$ M, determinamos por inmunofluorescencia la relocalización de la catepsina D (aspartil catepsina) y la catepsina L (cisteín catepsina). Aunque este ensayo lo realizamos en todas las líneas y debido a que en todas ellas observamos un efecto similar, en la **Figura 19** solo se muestran los resultados de la línea celular A549. Las imágenes revelan una tinción difusa por todo el citoplasma de ambas catepsinas en las células tratadas, mientras que en las células control esta tinción es más localizada en los lisosomas.

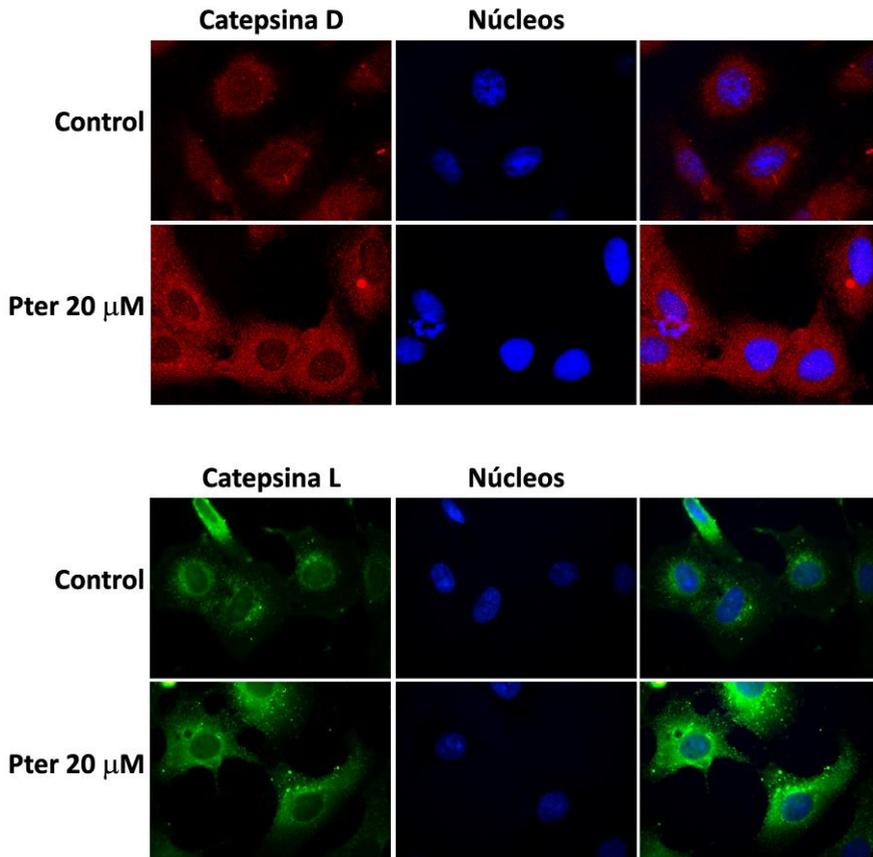
Por otro lado, también tras 24h de incubación, pero en este caso con dos concentraciones de PTER (20 y 50 $\mu$ M), se midió la actividad cisteín (L) y aspartil (D y E) catepsina citosólica con respecto a la total (citosólica y lisosomal). Tal y como podemos observar en la **Figura 20**, el PTER produce un incremento concentración-dependiente y estadísticamente significativo de la actividad catepsina citosólica en todas las líneas, es decir, que induce la liberación de catepsinas.



**Figura 18: Tinción con naranja de acridina**

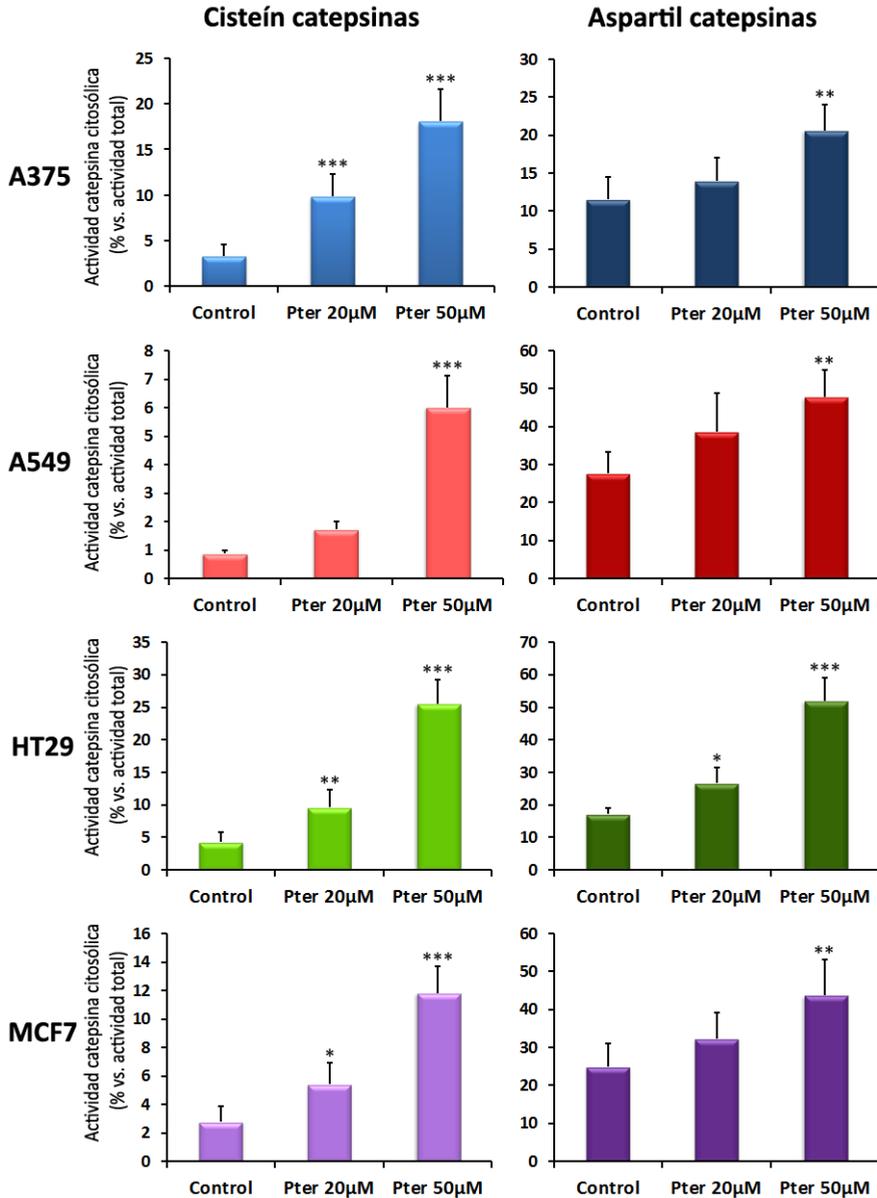
Las células se sembraron en placas de 6 pocillos y tras 24h de tratamiento con las concentraciones indicadas de PTER, se tiñeron con naranja de acridina (2μg/ml) durante 15 minutos y se determinaron los cambios en la fluorescencia por citometría de flujo. En la parte superior se muestran los histogramas de fluorescencia roja obtenidos. Los

gráficos de barras de la parte inferior muestran el porcentaje de células con fluorescencia roja (arriba) o verde (abajo) con respecto al control  $\pm$  desviación estándar, donde el control es 100. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test de Tukey donde  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$  y  $***p<0.001$  con respecto al grupo control.



**Figura 19: Inmunofluorescencia de la localización de aspartil y cisteín catepsinas.**

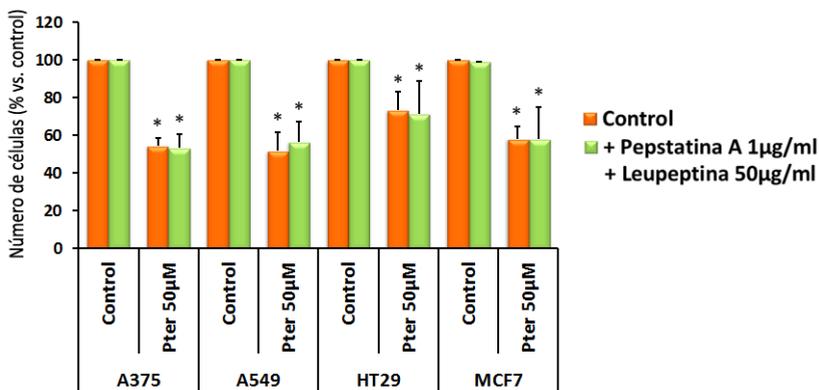
En esta figura se muestran imágenes de microscopía confocal de la línea celular A549. Las células se sembraron sobre cubreobjetos en placas de 12 pocillos, y tras 24h se trataron con PTER 20 $\mu$ M durante 24h más. Transcurrido este tiempo las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4%. En azul se aprecian los núcleos tras marcaje con Hoechst 2  $\mu$ g/ml, en rojo la catepsina D (aspartil catepsina) tras marcaje secundario con Alexa Fluor® 633 y en verde la catepsina L (cisteín catepsina) tras marcaje secundario con Alexa Fluor® 488.



**Figura 20: Determinación de la actividad cisteín y aspartil catepsina citosólica vs. total.** Tras tratar las células durante 24h con PTER a distintas concentraciones (20 y 50µM), se extrajeron las catepsinas citosólicas y las totales utilizando distintos tampones. La actividad cisteín catepsina (gráficos de la izquierda) se determinó por fluorimetría utilizando un sustrato de la catepsina L (Z-FR-AFC). Del mismo modo se determinó la actividad aspartil catepsina (gráficos de la derecha) utilizando un sustrato de las

catepsinas D y E (MCA-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-D-Arg-NH<sub>2</sub>). Los resultados se expresan como actividad catepsina citosólica en porcentaje con respecto a la actividad total  $\pm$  desviación estándar. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test de Tukey donde \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  con respecto al grupo control.

Por último, para determinar la contribución de las cisteín y las aspartil catepsinas en la muerte celular inducida por el PTER, evaluamos el efecto de la inhibición de su actividad en la citotoxicidad inducida por este polifenol. Para ello determinamos el número de células tras 24h de tratamiento con PTER 50 $\mu$ M en presencia o ausencia de una mezcla de inhibidores: la pepstatina A, un inhibidor de aspartil peptidasas entre las que se encuentran las catepsinas D y E además de pepsina, renina y quimosina; junto con la leupeptina, un inhibidor reversible de serin y cisteín proteasa entre las que se encuentran las catepsinas B, H y L y otras proteasas como la calpaína o la tripsina. En la **Figura 21** podemos observar como esta mezcla de inhibidores fue incapaz de evitar la muerte celular producida por el PTER.

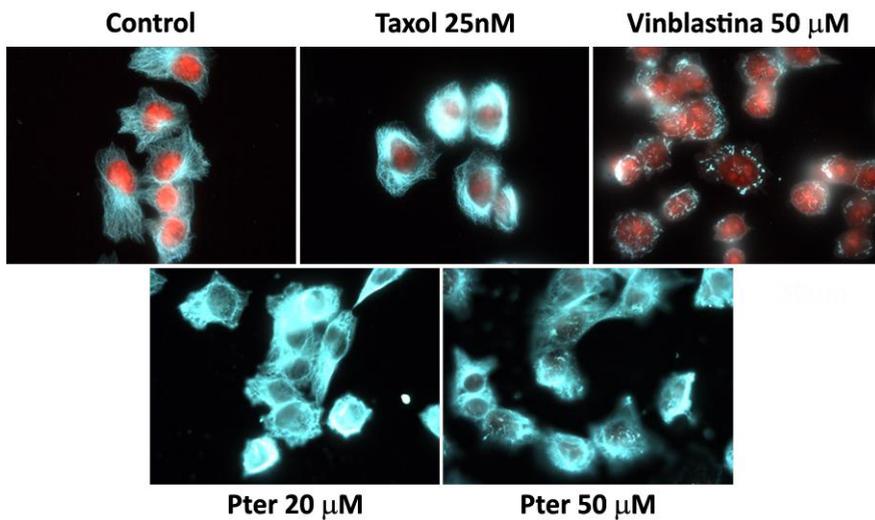


**Figura 21: Contribución de las catepsinas en la muerte celular inducida por el PTER.**

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos y tras 24h fueron pretratadas 1h antes de la adición de PTER 50 $\mu$ M, con 1 $\mu$ g/ml de pepstatina A y 50 $\mu$ g/ml de leupeptina. Tras 24h de incubación con ambos compuestos, se realizaron contajes celulares. Los resultados se expresan como número de células en porcentaje con respecto al control  $\pm$  desviación estándar (n=3). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de

la varianza (ANOVA) seguido de un test de Tukey donde  $*p < 0.05$  con respecto al grupo control.

Paralelamente al estudio de integridad de la membrana lisosomal, estudiamos el efecto del PTER sobre los microtúbulos ya que estos están implicados en la alteración de la membrana lisosomal. En la **Figura 22**, se ve claramente como el PTER altera la polimerización de la tubulina de los microtúbulos.

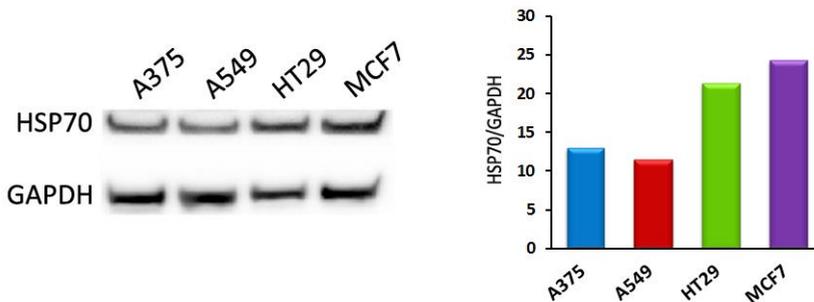


**Figura 22: Inmunocitoquímica de tubulina tras tratamiento con PTER.**

En esta figura se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de la línea celular A549. Las células se sembraron sobre cubreobjetos en placas de 12 pocillos, y tras 24h se trataron con PTER 50 $\mu$ M, Taxol 25nM o vinblastina 50 $\mu$ M durante 24h más. Transcurrido este tiempo las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4%. En rojo se aprecian los núcleos tras marcaje con IP y en azul la  $\alpha$ -tubulina tras marcaje secundario con Alexa Fluor® 488. El color verde de las imágenes se ha cambiado por el color azul para visualizar mejor los cambios.

### 3.1. Silenciamiento de Hsp70, un protector de la membrana lisosomal

Hsp72, más comúnmente llamada Hsp70-1 o Hsp70, es una proteína de choque térmico que ejerce un papel citoprotector al estabilizar la membrana lisosomal inhibiendo su permeabilización (Kirkegaard et al., 2010). Para evaluar cómo afecta la presencia de esta proteína al efecto citotóxico del PTER mediado por la permeabilización lisosomal, en primer lugar evaluamos sus niveles basales en las 4 líneas tumorales. Estos se muestran en la **Figura 23** en la que podemos observar como los niveles de esta proteína son más elevados en las líneas más resistentes al tratamiento, es decir, en las líneas celulares HT29 y MCF7.

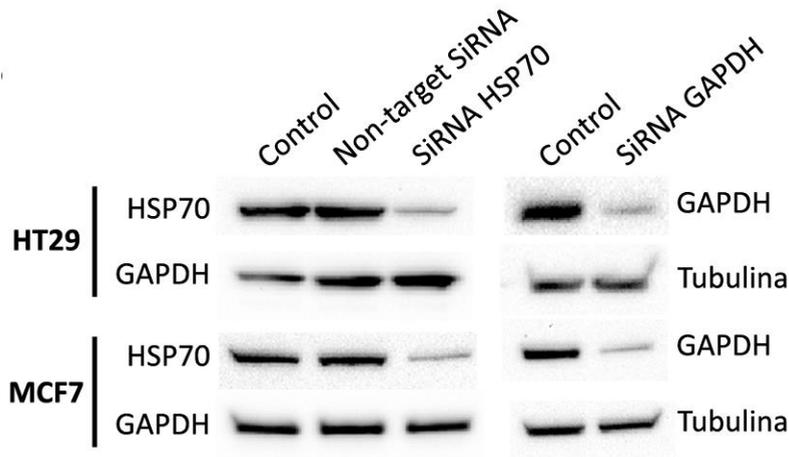


**Figura 23: Niveles basales de la proteína de choque térmico Hsp70.**

24h post-siembra las 4 líneas tumorales fueron lisadas para la extracción de proteínas y el posterior análisis por *western blot* de los niveles Hsp70 utilizando como control de carga la GAPDH. En la parte derecha de la figura se representan las densitometrías obtenidas al relativizar los niveles de Hsp70 a la GAPDH. La imagen corresponde a un experimento representativo de 4 experimentos similares.

Con objeto de estudiar la posible correspondencia entre los niveles de Hsp70 y la susceptibilidad al PTER silenciamos la expresión de esta proteína en las líneas celulares con niveles más elevados. Para ello utilizamos un siRNA contra Hsp70 y como control negativo un siRNA *non-target*, es decir, sin especificidad por ninguna proteína, para evaluar la toxicidad producida por este tipo de moléculas. Paralelamente, como control positivo utilizamos un siRNA contra la GAPDH.

Para comprobar que tanto la técnica de transfección como el siRNA contra Hsp70 eran efectivos determinamos mediante *western blot* los niveles de la proteína. En la **Figura 24** podemos observar como los niveles de la GAPDH, disminuyen al tratar las células con el siRNA contra esta proteína. Esto indica que la técnica de silenciamiento funciona correctamente. Además, como cabía esperar, el siRNA contra Hsp70 disminuye los niveles de dicha proteína mientras que el siRNA *non target* no tiene ningún efecto sobre sus niveles.

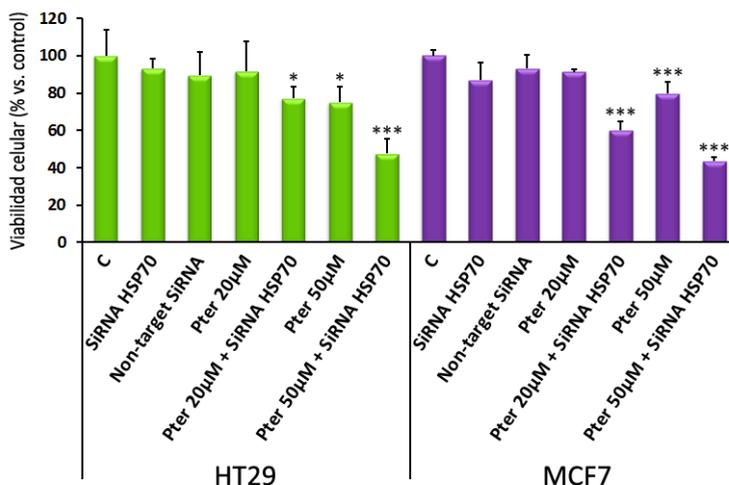


**Figura 24: Silenciamiento de Hsp70.**

24h tras la siembra de las líneas celulares HT29 y MCF7, las células fueron transfectadas con un siRNA *non-target*, con un siRNA contra Hsp70 o con un siRNA contra GAPDH, todos ellos a una concentración de 25nM. Tras 48h de incubación, las células fueron lisadas para la extracción de proteínas y el posterior análisis por western blot. En las células tratadas con el siRNA *non-target* y el siRNA contra Hsp70, se analizaron los niveles Hsp70 utilizando como control de carga la GAPDH; y en las células transfectadas con el siRNA contra la GAPDH, se detectaron los niveles de esta proteína utilizando como control de carga la tubulina. La imagen corresponde a un experimento representativo de 4 experimentos similares.

Tras comprobar que las concentraciones de los siRNAs y los tiempos de incubación tras la transfección eran los correctos, procedimos a determinar si el silenciamiento de Hsp70 en estas dos líneas las hacía más sensibles al tratamiento con PTER. Para ello transfectamos las células 24h post-siembra y, tras 24h de incubación con

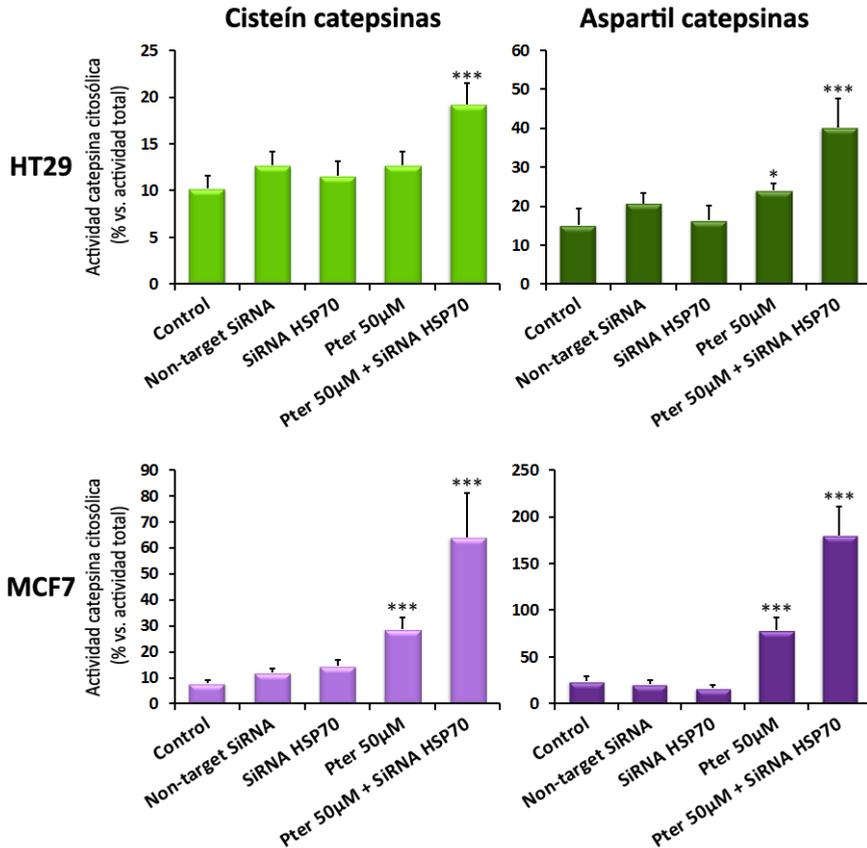
los siRNAs correspondientes, añadimos el PTER a dos concentraciones distintas (20 y 50  $\mu\text{M}$ ) e incubamos durante 48h. En resumen, 72h post-adición de los siRNAs y 48h tras la adición con el PTER determinamos la viabilidad celular con el método de la sulforhodamina B. Los resultados se muestran en la **Figura 25**. En ella observamos, por un lado, que el siRNA no tiene efectos tóxicos significativos para las células y, por otro lado, que en las condiciones en que se ha silenciado Hsp70 la citotoxicidad inducida por el PTER es mayor. Estos efectos son más pronunciados en la línea MCF7 donde observamos una diferencia evidente entre la condición tratada con PTER 20  $\mu\text{M}$  y su homóloga tras silenciar Hsp70.



**Figura 25: Viabilidad celular tras el silenciamiento de Hsp70.**

Las líneas celulares HT29 y MCF7 fueron sembradas en placas de 96 pocillos a razón de 7500 y 10000 células/pocillo respectivamente. Las células fueron transfectadas 24h post-siembra y 24h después tratadas con PTER (20 y 50  $\mu\text{M}$ ) durante 48h más. La viabilidad celular fue determinada indirectamente por el método de la sulforhodamina B tras 72h de transfección y 48h de tratamiento. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control  $\pm$  desviación estándar ( $n=4$ ). Los datos se analizaron estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test de Tukey donde  $*p<0.05$ , y  $***p<0.001$  con respecto al grupo control.

Para determinar si el aumento de la susceptibilidad celular al disminuir los niveles de Hsp70 está mediado por un aumento de la permeabilidad lisosomal, medimos la actividad cisteín y aspartil catepsina citosólica con respecto a la total en estas dos líneas tratadas con PTER 50 $\mu$ M y tras haber silenciado o no Hsp70.

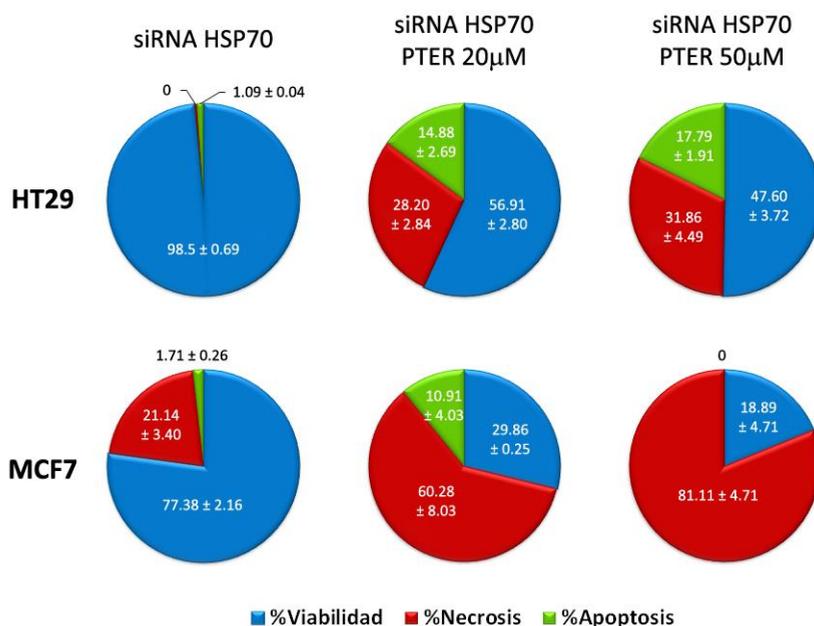


**Figura 26: Actividad catepsina tras silenciamiento de Hsp70.**

La actividad cisteín y aspartil catepsina citosólica y total se midió en las líneas HT29 y MCF7 72h post-transfección y 24h post-tratamiento con PTER 50 $\mu$ M. La actividad cisteín catepsina (gráficos de la izquierda) se determinó por fluorimetría utilizando un sustrato de la catepsina L (Z-Phe-Arg-AFC). Del mismo modo se determinó la actividad aspartil catepsina (gráficos de la derecha) utilizando un sustrato de las catepsinas D y E (Mca-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-D-Arg-NH<sub>2</sub>). Los resultados se expresan como actividad catepsina citosólica en porcentaje con respecto a la actividad total  $\pm$  desviación

estándar. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test de Tukey donde \* $p < 0.05$  y \*\*\* $p < 0.001$  con respecto al grupo control.

En la **Figura 26** se representan los resultados que demuestran que al silenciar Hsp70 aumenta la permeabilización lisosomal inducida por el PTER ya que se observa una mayor liberación de catepsinas. De hecho, la depleción de Hsp70 hace que se detecte el doble de actividad catepsina citosólica tras el tratamiento con Pter. Esto ocurre en las dos líneas celulares y en ambos tipos de catepsinas.



**Figura 27: Estudio de la muerte celular inducida por el PTER tras silenciar Hsp70.**

Las líneas celulares HT29 y MCF7 fueron sembradas en placas de 96 pocillos negras de fondo transparente y tras 24h, fueron transfectadas con el siRNA Hsp70. 24h más tarde, fueron tratadas con PTER (20 y 50 μM) durante 48h y transcurrido este tiempo fueron teñidas con anexina V-FITC, Hoechst 33342 y IP. El análisis de la muerte celular se llevó a cabo por microscopía automatizada de fluorescencia. Los datos se representan como porcentaje de muerte o viabilidad ± desviación estándar (n=4).

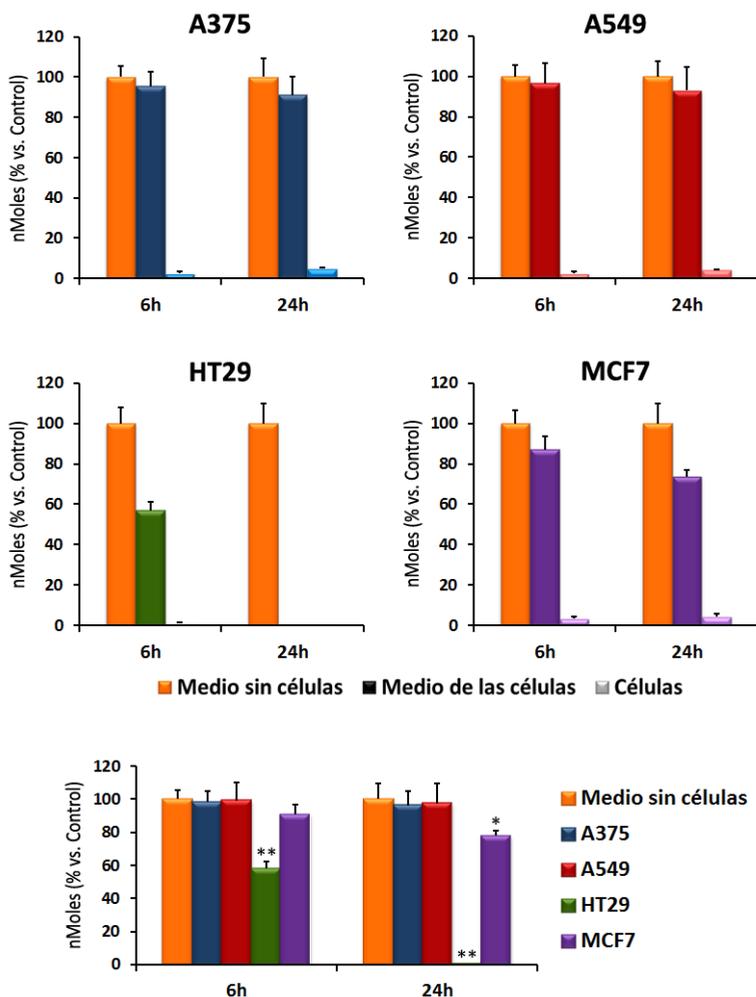
En la **Figura 27** se representa el tipo de muerte inducido por el PTER tras el silenciamiento de Hsp70. Como se puede observar, las células mueren principalmente por necrosis.

## 4. METABOLISMO CELULAR DEL PTEROSTILBENO

---

Para evaluar la capacidad de metabolización del PTER por las líneas celulares testadas, cuantificamos sus niveles por UPLC-MS/MS tanto en las células como en el medio de cultivo tras incubarlas con PTER 20 $\mu$ M durante 6 y 24h. Estas cantidades las comparamos con un control tratado con PTER a la misma concentración y los mismos tiempos pero en ausencia de células.

En la **Figura 28** podemos observar como en las líneas A375 y A549 la cantidad de PTER en el medio disminuye ligeramente con respecto al control. Esta disminución es ligeramente mayor a 24h que a 6h y se corresponde con un aumento de la cantidad de PTER intracelular. De hecho, la cantidad total de PTER en estas líneas (suma de PTER en el medio y en interior celular) es prácticamente igual a la del medio control. En el caso de la línea MCF7 observamos como a 24h la disminución de la cantidad de PTER en el medio es bastante más acusada que a las 6h. Además, esta disminución es mayor que en las líneas anteriores. Sin embargo, esta reducción no se corresponde con un aumento de la cantidad de PTER en el interior celular, de hecho la cantidad total de PTER a las 24h disminuye significativamente con respecto al control. En caso de la línea HT29 observamos como la cantidad de PTER disminuye a las 6h en el medio mucho más que en el resto de las líneas sin observarse un aumento en los niveles intracelulares, siendo también en este caso la disminución de la cantidad total de PTER estadísticamente significativa con respecto al control. Además, a las 24h no se detectó PTER ni en el medio ni en las células, siendo el PTER total prácticamente cero.



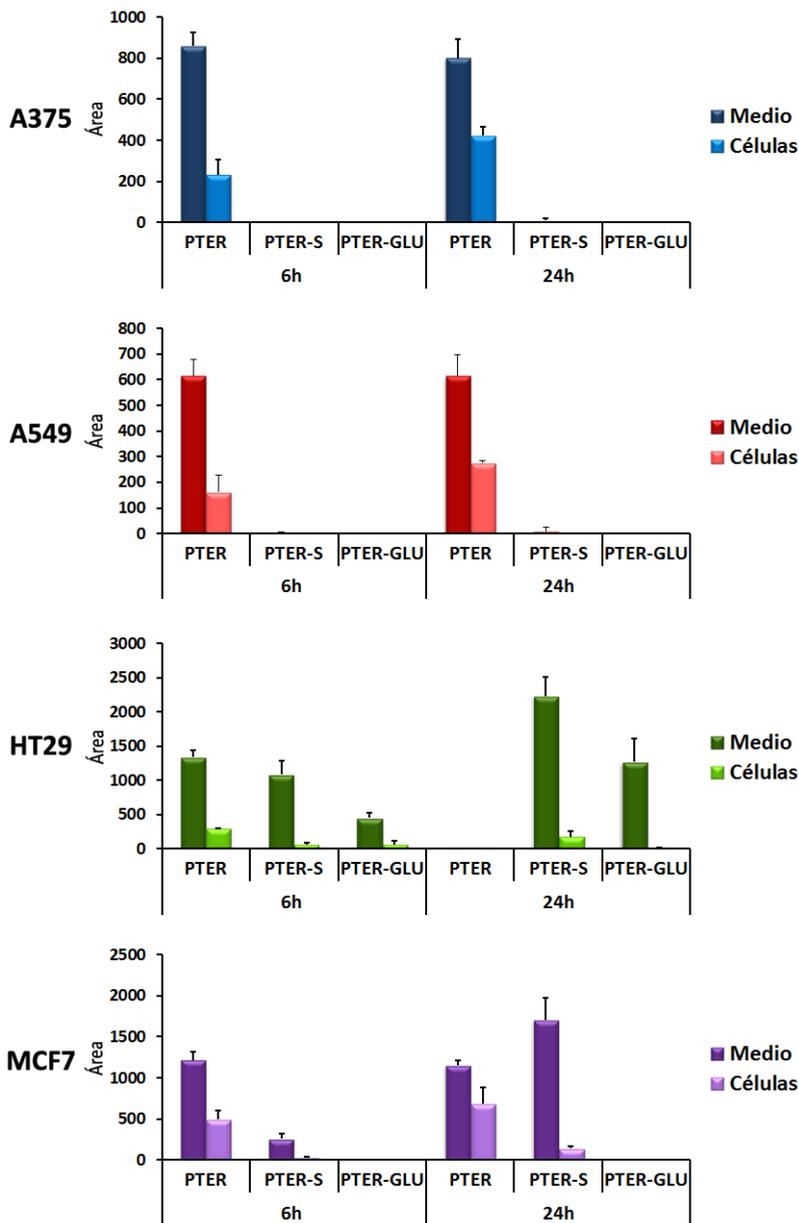
**Figura 28: Variación de la cantidad de PTER en función del tiempo de incubación.**

Las células se sembraron en 5ml de medio ( $0.1 \times 10^6$  cels/ml) en placas Petri de 60mm de diámetro. Paralelamente, se añadieron 5ml de medio en una placa control sin células. Tras 24h, todas las placas fueron tratadas con PTER  $20 \mu\text{M}$ . 6 y 24h después de la adición se recogieron muestras del medio de la placa control sin células (color naranja) así como del lisado celular (color claro) y del medio de éstas (color oscuro) y se determinaron las cantidades de PTER por UPLC-MS/MS de forma independiente (parte superior de la figura). En la parte inferior se representa la cantidad total de PTER en cada línea (suma de la cantidad de PTER en el medio y en el lisado celular) con respecto a la cantidad de PTER en el medio. En ambas figuras los resultados se expresan como nmoles de PTER en porcentaje con respecto al control  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). En la figura inferior Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de la varianza

(ANOVA) seguida de un test de Bonferroni donde  $*p<0.05$  y  $**p<0.001$  en comparación con el grupo control.

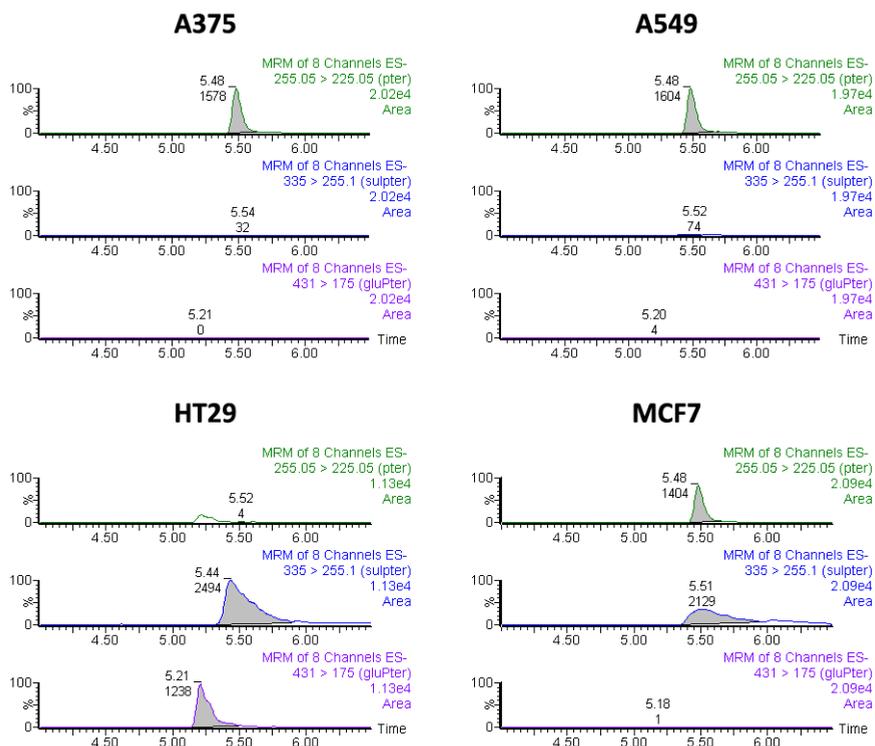
Para completar nuestro análisis, detectamos, también por UPLC-MS/MS, los niveles de PTER junto con sus metabolitos mayoritarios, el PTER sulfatado (PTER-S) y el PTER glucuronidado (PTER-GLU). Estos metabolitos no están disponibles comercialmente, por lo que no se pueden preparar estándares de cuantificación. Por ello, en la **Figura 29** se representan las áreas detectadas para cada uno de los metabolitos y para el PTER. Tal y como podemos observar en ella, en las líneas A375 y A549 solo se detectó PTER, siendo el PTER-S y el PTER-GLU prácticamente indetectable a ninguno de los tiempos testados. Por el contrario en el caso de la línea HT29, detectamos tanto PTER-S como PTER-GLU a los dos tiempos de tratamiento. Además, aunque sí detectamos PTER a las 6h, a las 24h de tratamiento fue indetectable. En la línea celular MCF7 no detectamos PTER-GLU pero sí PTER-S y PTER tanto a las 6 como a las 24h de tratamiento.

En la **Figura 30** se muestra un ejemplo característico de los cromatogramas obtenidos para el PTER y cada uno de sus metabolitos, tras el análisis por UPLC-MS/MS del medio de las células tratadas durante 24h con PTER 20 $\mu$ M.



**Figura 29: Detección por UPLC-MS/MS de PTER y sus metabolitos.**

A las 6 y 24h después de la incubación de las células con PTER 20 $\mu$ M se recogieron muestras del medio (color oscuro) y del lisado celular (color claro). En los gráficos de barras se representan las áreas obtenidas para PTER, PTER-S y PTER-GLU  $\pm$  desviación estándar (n=3) obtenidas por UPLC-MS/MS.



**Figura 30: Ejemplo de cromatogramas obtenidos tras el análisis por UPLC-MS/MS.**

En esta figura se muestra un ejemplo de los cromatogramas de PTER (verde), el PTER-S (azul) y el PTER-GLU (morado) tras el análisis por UPLC-MS/MS del medio de las cuatro líneas celulares tras 24h de tratamiento con PTER 20 $\mu$ M. El eje de abscisas es el tiempo de retención de los compuestos y el eje de ordenadas el porcentaje de respuesta obtenida para cada uno de ellos.



## DISCUSIÓN

---



El cáncer es una enfermedad caracterizada por alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen progresivamente a una transformación de las células normales en malignas. Esto da lugar a una proliferación celular anormal y descontrolada que se manifiesta con la aparición de un tumor (Alberts et al., 2007; Hanahan and Weinberg, 2000).

Los principales problemas en el tratamiento del cáncer son, por un lado, el desarrollo de resistencias y por otro la toxicidad inespecífica que producen las terapias antitumorales en las células normales (Garg et al., 2005). Aunque en los últimos años han surgido nuevas terapias que pueden prolongar la vida de los pacientes días, meses, e incluso años, la calidad de vida es en muchos casos cuestionable. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que resulten más eficaces y, si es posible, sin comprometer la calidad de vida de los pacientes.

En este escenario los polifenoles naturales ofrecen algo de esperanza, ya que pueden contribuir significativamente a mejorar la eficacia del tratamiento contra el cáncer al combinarlos con otros agentes antitumorales (Asensi et al., 2011). Los mecanismos de acción antitumorales de los polifenoles están siendo intensamente estudiados en la actualidad. Sin embargo dichos mecanismos han de ser evaluados cuidadosamente debido a que existen grandes discrepancias e incluso contradicciones en la bibliografía.

El RESV, uno de los polifenoles más estudiados, posee acción antioxidante y una clara acción antitumoral (Rimando et al., 2002). Aunque su acción antioxidante puede reducir el estrés oxidativo y promover la supervivencia celular (Kairisalo et al., 2011), se ha comprobado que su acción antitumoral está mediada, en parte, por la inducción de apoptosis y autofagia (Bernhard et al., 2000; Cui et al., 2010; Delmas et al., 2011; Filippi-Chiela et al., 2011; Opipari et al., 2004). Sin embargo, aunque esta acción antitumoral se ha demostrado en numerosos experimentos *in vitro*, su efectividad antitumoral *in vivo* es cuestionable debido a que presenta una baja biodisponibilidad oral y una reducida vida media (Asensi et al., 2002). Por ello, es interesante

considerar otros compuestos naturales que conserven las propiedades anticancerígenas pero que, a ser posible, posean mejores características farmacocinéticas. En este contexto, el PTER, un análogo estructural dimetoxilado del RESV con mayor vida media y mayor biodisponibilidad representa una buena opción terapéutica orientada al tratamiento del cáncer (Estrela et al., 2013).

## 1. Acción antitumoral del pterostilbeno vs resveratrol

---

### 1.1. Efecto citotóxico

El efecto antitumoral que puede presentar un compuesto es claramente dependiente de su mecanismo de acción y del tumor tratado, debido a la elevada heterogeneidad biológica intra e intertumoral. Por ello, nos planteamos estudiar el papel antitumoral del PTER en comparación con el RESV en cuatro líneas celulares de diferente origen embrionario: melanoma (A375), pulmón (A549), colon (HT29) y mama (MCF7). En concreto elegimos esas cuatro porque son líneas muy utilizadas, tanto *in vitro* como *in vivo*, en terapias experimentales preclínicas contra cáncer de pulmón, mama, colon y melanoma. Los resultados obtenidos demuestran que el PTER tiene efectos antitumorales *in vitro* similares e incluso ligeramente más potentes que el RESV en todas las líneas tumorales testadas (**Figura 1 y Tabla 5**). Estos datos coinciden en su mayoría con la bibliografía previamente publicada (Nutakul et al., 2011). Debido a los datos obtenidos y al hecho de poseer una mejor farmacocinética, el PTER se convierte en una mejor opción terapéutica que el RESV.

Por otro lado, en nuestros resultados observamos como la acción anticancerígena de ambos polifenoles se correlaciona directamente con la concentración y con el tiempo de exposición a los mismos. Además,

podemos observar una respuesta diferencial al tratamiento en las líneas utilizadas en los estudios. De las cuatro líneas testadas observamos que existen dos más sensibles al tratamiento polifenólico, la de melanoma (A375) y la de pulmón (A549), y dos más resistentes, la de colon (HT29) y la de mama (MCF7). Esta sensibilidad diferencial es totalmente lógica si consideramos que cada línea es de distinto origen embrionario.

Otro hecho que nos planteamos fue si el efecto citotóxico que muestra el PTER afecta también a las células normales. Para ello tratamos con PTER, a modo representativo, una línea celular de melanocitos humanos y determinamos que su IC50 era de 52.1µM, muy similar a la que encontramos en las dos líneas más resistentes al tratamiento, las HT29 y las MCF7. Sin embargo, a pesar de estas observaciones *in vitro*, diferentes polifenoles como el RESV, la CURC, los polifenoles del té verde o el propio PTER, han mostrado actividad antitumoral *in vivo* sin mostrar efectos tóxicos relevantes en el organismo a dosis terapéuticas efectiva (Davalli et al., 2012; Ferrer et al., 2005; Priego et al., 2008).

## 1.2. Efecto citostático

Diferentes estudios han demostrado que el efecto citotóxico del RESV va precedido por un efecto citostático. De hecho estos estudios demuestran que, en distintas líneas tumorales, la parada de ciclo en fase S precede a la activación de la apoptosis (Bernhard et al., 2000; Colin et al., 2009; Delmas et al., 2002; Fulda and Debatin, 2004; Kuwajerwala et al., 2002).

El efecto citostático del PTER también ha sido descrito en diferentes trabajos (Alosi et al., 2010; Chen et al., 2010b; Lin et al., 2012; Pan et al., 2007; Siedlecka-Kroplewska et al., 2012; Tolomeo et al., 2005). Sin embargo, no está bien definido si dicho efecto es previo o acompaña al efecto citotóxico o la relevancia que pueda tener la parada de ciclo sobre la muerte celular inducida por el PTER.

En nuestros resultados se observa, de forma análoga a la citotoxicidad inducida por ambos polifenoles, que los efectos citostáticos fueron dependientes de la línea estudiada. En la **Figura 2** queda reflejado como las líneas A375 y A549 fueron más susceptibles al tratamiento que las líneas HT29 y MCF7. De hecho, en la línea HT29, solo observamos parada de ciclo celular a la concentración estudiada más elevada. En general la tendencia a 24h es una parada de ciclo en fase S y en algunas líneas, a la concentración más elevada, en fase G0/G1. Esta observación coincide con los resultados obtenidos por otros grupos de investigación (Alosi et al., 2010; Bernhard et al., 2000; Chen et al., 2010b; Lin et al., 2012; Pan et al., 2007; Siedlecka-Kroplewska et al., 2012; Tolomeo et al., 2005).

Para corroborar la parada de ciclo en la fase S evaluamos el grado de incorporación de BrdU al ADN durante las seis primeras horas de incubación con ambos polifenoles. Tal y como muestran nuestros resultados, incluso a las dosis más bajas, existe una disminución de la síntesis del ADN en todas las líneas tratadas con ambos polifenoles. Además, se continúa viendo un comportamiento diferencial entre líneas (**Figura 3**). Estos datos revelan que ambos polifenoles inducen parada de ciclo, incluso a tiempos muy cortos, debido a una disminución en la síntesis del ADN que imposibilita que las células progresen a lo largo de la fase S llegando a impedir su síntesis completa. Según Kuwajerwala y cols., (Kuwajerwala et al., 2002), esto podría ser debido a que los polifenoles, al mismo tiempo que activan vías de señalización que dan lugar a la entrada de las células en fase S, son capaces de impedir la síntesis de ADN por inhibición directa de algunas enzimas clave para su síntesis. De hecho, esta hipótesis fue corroborada para el RESV por Locatelli y cols., (Locatelli et al., 2005).

Sin embargo, la parada del ciclo celular observada tras el tratamiento polifenólico, no es suficiente para explicar la gran disminución en el número de células observada en los ensayos de citotoxicidad. Esta disminución solo puede ser explicada si además de

existir una parada de ciclo, se activan simultáneamente mecanismos de muerte celular.

El RESV, tal y como se ha descrito previamente, es un potente inductor de apoptosis (Bernhard et al., 2000; Delmas et al., 2002) y autofagia (Delmas et al., 2002; Opirari et al., 2004). Por esta razón nos planteamos determinar si los mecanismos de muerte celular inducidos por el PTER son similares.

## 2. Mecanismos de muerte celular inducidos por el pterostilbeno

---

Aunque no se conoce cuál es su diana principal, el PTER es capaz de alterar múltiples vías de señalización críticas en el desarrollo del cáncer (Chen et al., 2010b; McCormack et al., 2011; Pan et al., 2011b; Schneider et al., 2010; Wang et al., 2012).

La **apoptosis** es el tipo de muerte celular programada que inducen la mayoría de agentes antineoplásicos. De hecho, en el caso de los polifenoles, numerosas evidencias indican que la apoptosis es una de las vías de señalización críticas en su mecanismo de acción antitumoral (Asensi et al., 2011). Sin embargo, concretamente sobre el PTER existe cierta controversia. Mientras algunos autores postulan que la apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular inducido por el polifenol (Alosi et al., 2010; Pan et al., 2007), otros alegan que esta coexiste con otros mecanismos y que es el conjunto de todos ellos el que contribuye a la muerte celular inducida (Chen et al., 2010b; Wang et al., 2012).

Para evaluar la contribución de la apoptosis en el mecanismo de acción del PTER, analizamos en primer lugar el porcentaje de células apoptóticas tras 24 y 48h de tratamiento (**Figura 4**). Observamos que en las líneas A375, A549 y MCF7 se produce un aumento, concentración dependiente, del número de células apoptóticas a las 24h. Sin embargo, a las 48h, en la condición tratada con PTER 50 $\mu$ M el porcentaje de células

apoptóticas disminuye. Esto puede ser debido a que, además de apoptosis, se estén activando otros mecanismos de muerte celular. De hecho, a ese tiempo y esa concentración se observa una disminución mayor del número de células en comparación con las células tratadas con PTER 20 $\mu$ M. En el caso de la línea celular HT29 el porcentaje de células apoptóticas a 24h no varía con respecto al control, solo observamos un ligero aumento a las 48h, mostrando una elevada resistencia al tratamiento con el polifenol (**Figura 4**).

Aunque la activación de las caspasas es característica de la muerte celular por apoptosis (Favaloro et al., 2012), ésta se puede dar por un mecanismo independiente de caspasas (Cregan et al., 2004; Tolomeo et al., 2005). Con el objeto de averiguar si la apoptosis producida por el PTER es dependiente o no de estas proteasas, determinamos la actividad de las caspasas-3 y 7. Además, debido a que la línea celular MCF7 es deficiente en caspasa-3 (Janicke et al., 1998), analizamos la fragmentación de PARP, ya que dicho proceso está mediado por la caspasa-7 y otras proteasas (Germain et al., 1999).

En la **Figura 5** puede observarse como la actividad caspasa se correlaciona con el porcentaje de células apoptóticas mostrado en la **Figura 4**. Esto indica que la apoptosis inducida por el PTER es debida, al menos en parte, a la activación de las caspasas. En el caso de la línea A375, tras 48h de incubación con PTER 50 $\mu$ M, no se observa la correlación mencionada. Ello puede ser debido a una cuestión metodológica ya que, los datos mostrados se han relativizado al número de células adheridas a la placa, sin tener en cuenta la elevada susceptibilidad de esta línea y, por tanto, las células no adheridas. Esto hace que se sobreestimen los datos sobre la actividad caspasa.

Contrariamente a los datos obtenidos de la actividad caspasa, cuando analizamos los datos de la fragmentación de PARP (**Figura 7**) observamos un aumento de ésta tras el tratamiento durante 48h con PTER 50 $\mu$ M, al menos en las líneas A375 y A549, sugiriendo que además de las caspasas, deben haber otras proteasas que contribuyan a la fragmentación de esta proteína. En caso de las líneas HT29 y MCF7,

coincidiendo con la prácticamente inexistente activación de las caspasas 3 y 7, no se detecta el fragmento hidrolizado de PARP.

A continuación, para evaluar la relevancia de la activación de las caspasas en la muerte celular inducida por el PTER, preincubamos las células con un inhibidor pancaspasa, el Z-VAD-FMK, y analizamos el número de células. En la **Figura 6** puede observarse la incapacidad de este inhibidor para revertir la muerte celular inducida por el PTER.

Todos estos resultados en conjunto sugieren, por un lado, que el PTER podría inducir apoptosis por un mecanismo independiente de caspasas tal y como sugieren otros autores (Schneider et al., 2010; Tolomeo et al., 2005), y por otro lado, que este tipo de muerte debe ir acompañada por otros mecanismos para explicar la disminución en el número de células tras el tratamiento con PTER. Por esta razón, continuamos investigando el papel de otros tipos de muerte celular en la citotoxicidad producida por el PTER.

Aunque la **necrosis** se ha descrito clásicamente como un tipo de muerte “accidental” que tiene lugar cuando las células son sometidas a agresiones severas, se ha observado que la necrosis puede ser regulada, es decir, programada, denominándose en este caso necroptosis. Este tipo de muerte celular programada, es independiente de caspasas y está regulada por las quinasas RIP1 y RIP3 (Vanden Berghe et al., 2010).

Debido a que la lisis celular es una de las principales características que diferencia a una célula necrótica de una apoptótica, para determinar si la necrosis es el principal tipo de muerte producido por el PTER, evaluamos en primer lugar la integridad de la membrana plasmática (Vanden Berghe et al., 2013). Para ello, analizamos por un lado la actividad del enzima LDH liberado al medio de cultivo extracelular al romperse la membrana plasmática de las células necróticas. Y por otro lado, el porcentaje de células necróticas, teñidas previamente con IP, por microscopía automatizada de fluorescencia (Vanden Berghe et al., 2013).

En la **Figura 10** puede observarse como a concentraciones menores de 50 $\mu$ M, se produce una leve liberación de LDH tras 24h de

incubación con el polifenol. Sin embargo, a las 72h de incubación con el PTER puede observarse una disminución en la liberación del enzima. Esto es debido a que la LDH es muy inestable en el medio de cultivo y es degradada por acción de distintos factores como el pH o por compuestos específicos como el piruvato en el medio de cultivo (Kendig and Tarloff, 2007; Vanden Berghe et al., 2013), lo cual da lugar a una disminución de su actividad a tiempos de incubación más prolongados sin ser ello indicativo de una disminución en su liberación.

Los datos obtenidos para la LDH se corresponden con los datos de microscopía, ya que observamos un aumento concentración y tiempo dependiente del porcentaje de células necróticas (**Figura 11**). De hecho, excepto en el caso de la línea celular HT29 en la que solo observamos un aumento muy leve de este tipo de muerte, en el resto de líneas el porcentaje de células necróticas a 48h es similar, en el caso del tratamiento con PTER 20 $\mu$ M, y superior, en el caso del tratamiento con PTER 50 $\mu$ M, al porcentaje de células apoptóticas mostrado con anterioridad (**Figura 4**). Estos datos sugieren que, aunque ambos tipos de muerte coexisten, se produce una mayor activación de necrosis en detrimento de la apoptosis a mayor tiempo de exposición y a concentraciones más elevadas.

Sin embargo, la inhibición de la necrosis programada o necroptosis utilizando Nec-1, un inhibidor de RIP1 que es una de las quinasas fundamentales en la regulación de la necroptosis o necrosis celular programada, no revirtió la disminución del número de células inducida por el PTER (**Figura 12**), por lo que la necrosis producida es independiente de RIP1. Así pues, continuamos indagando los mecanismos de acción citotóxicos del PTER. Para ello, proseguimos con el estudio de otro tipo de muerte celular, la autofagia.

La **autofagia** es un proceso catabólico que se caracteriza por la degradación y reciclaje lisosomal de orgánulos dañados y macromoléculas. Aunque generalmente la autofagia constituye un mecanismo protector y de supervivencia para la célula, en algunos casos puede dar lugar a muerte celular programada independiente de caspasas

(Hoyer-Hansen and Jaattela, 2008). De hecho, se ha propuesto que los polifenoles pueden activar la autofagia como un mecanismo de muerte celular alternativo (Chen et al., 2010b; Opiari et al., 2004).

La determinación de los niveles de la proteína LC3-II se utiliza ampliamente para la evaluación de la autofagia. En la célula esta proteína se encuentra en dos formas, una soluble en el citosol (LC3-I) y otra lipidada unida a la doble membrana de los autofagosomas (LC3-II). Solo cuando se induce autofagia, LC3-I se convierte en su forma lipidada asociada a los autofagosomas y media en su fusión con los lisosomas. Por tanto, una disminución en los niveles de LC3-I y un aumento en los niveles de LC3-II es indicativo de la formación de autofagosomas y, por tanto, de la inducción de la autofagia (Klionsky et al., 2008; Mizushima and Yoshimori, 2007).

Nuestros resultados muestran que el PTER induce autofagia ya que observamos un aumento concentración dependiente en los niveles de LC3-II en todas las líneas (**Figura 14**). Existe una fuerte tendencia científica a analizar erróneamente la autofagia mediante la relativización de los niveles de LC3-II frente a los de LC3-I. En nuestros resultados, para poder comparar el efecto de las distintas concentraciones de PTER sobre LC3-II, se han relativizado los niveles de esta proteína a los del control de carga (GAPDH) tal y como dictan las últimas guías para la interpretación de ensayos de monitorización de autofagia (Klionsky et al., 2012; Klionsky et al., 2008; Mizushima and Yoshimori, 2007).

LC3-II está presente en la membrana interna y externa del autofagosoma. Una vez fusionados éstos con los lisosomas, la proteína LC3-II de la cara interna es degradada en el interior de los autolisosomas, y la ubicada en la cara externa es deconjugada volviendo al citosol. Esto significa que si el proceso autofágico llega a término, los niveles de LC3-II deberían disminuir (Mizushima and Yoshimori, 2007; Tanida, 2011).

Debido a la variabilidad en los niveles de LC3-II a lo largo de este proceso, su determinación en un único punto en el tiempo no es indicativa del flujo autofágico, solo lo es de la inducción de la autofagia. Por ello, la determinación de este marcador se ha de complementar con

otros métodos que permitan detectar el flujo autofágico (Klionsky et al., 2012). Uno de ellos es la detección por *western blot* de p62/SQSTM1. Esta proteína reconoce agregados proteicos ubiquitinados y se une a ellos promoviendo su incorporación al interior del autofagosoma, y por tanto su degradación al producirse la fusión de los autofagosomas con los lisosomas. Por ello, si la autofagia está inhibida, p62/SQSTM1 no se degrada y se acumula. Por el contrario, si el proceso autofágico progresa, se observa una disminución de sus niveles. Ello demuestra que p62/SQSTM1 puede ser usado como marcador para estudiar el flujo autofágico (Bjorkoy et al., 2009; Klionsky et al., 2012; Mizushima and Yoshimori, 2007).

Nuestros resultados muestran como la incubación con PTER induce un aumento de los niveles de LC3-II y contrariamente a lo que cabía esperar, un aumento en los niveles de P62/SQSTM1 (**Figura 15**).

Para corroborar que el PTER actúa induciendo autofagia pero que este proceso no llegaba a su fin, transfectamos las cuatro líneas tumorales con eGFP-LC3 y tras tratarlas con PTER observamos, tal y como esperábamos, una acumulación de autofagosomas (**Figura 16**). Esto indica que el tratamiento con PTER, a pesar de estimular la formación de los autofagosomas, inhibe la autofagia bloqueando la fusión entre autofagosomas y lisosomas (Klionsky et al., 2008). Estos resultados se contradicen con otros ya publicados en los que se indica que el PTER induce autofagia (Chen et al., 2010b; Wang et al., 2012). Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se evalúa el flujo autofágico y las conclusiones obtenidas en ambos trabajos se basan únicamente en la acumulación de LC3-II y en la presencia de autofagosomas. Es en este punto donde nuestros hallazgos son particularmente novedosos, pues clarifican un mecanismo celular que hasta ahora se creía importante en el tipo de muerte inducido por el PTER.

### 3. El pterostilbeno induce alteraciones lisosomales

---

A la vista de los resultados presentados, nos planteamos si el PTER, al bloquear la fusión de los lisosomas con los autofagosomas, podría inducir alteraciones en los lisosomas al igual que otros compuestos que actúan a este nivel (Boya et al., 2003; Groth-Pedersen et al., 2007; Kroemer and Jaattela, 2005; Yang et al., 2011b). Por ello nos planteamos estudiar el estado de estos orgánulos.

Lo que observamos fue que al tratar las células con PTER se producía un aumento del volumen y/o número de los lisosomas (**Figura 17**). Este aumento podría ser debido a alteraciones de la membrana lisosomal, a una alteración del tráfico vesicular, o a una mezcla de ambos (Boya et al., 2003; Groth-Pedersen et al., 2007).

Es interesante remarcar que el aumento del volumen de los lisosomas se correlaciona con una disminución de la estabilidad de su membrana secundaria a un aumento en la tensión de la misma. Esto incrementa la probabilidad de su ruptura lo cual puede dar lugar a un tipo de muerte celular alternativa, la muerte celular lisosomal (Boya et al., 2003; Groth-Pedersen et al., 2007; Ono et al., 2003).

Los lisosomas son orgánulos citoplasmáticos ácidos que contienen numerosas hidrolasas responsables de la degradación y reciclaje de las macromoléculas vertidas en su interior (Cesen et al., 2012). En respuesta a ciertos estímulos se puede producir la permeabilización de la membrana lisosomal y por tanto, la liberación masiva al citosol de estas enzimas hidrolíticas capaces de provocar la llamada muerte celular lisosomal (Kroemer and Jaattela, 2005). Este tipo de muerte celular es ejecutada principalmente por un tipo de hidrolasas lisosomales, las catepsinas. Estas proteasas, una vez liberadas al citosol pueden activar la muerte celular por apoptosis o una muerte celular similar a la apoptosis pero independiente de caspasas. Incluso se ha postulado como, en caso de una ruptura generalizada de la membrana

lisosomal, puede llegar a producirse muerte celular por necrosis (Aits and Jaattela, 2013). Este programa alternativo de muerte celular se ha postulado en los últimos años como una buena alternativa terapéutica en el tratamiento de tumores resistentes a la apoptosis (Rammer et al., 2010).

Así pues, viendo que existía algún tipo de alteración lisosomal, nos centramos en evaluar el efecto del PTER sobre la integridad de la membrana de estos orgánulos para comprobar si era posible que estuviera activando este tipo de muerte. Los resultados obtenidos tras la tinción de las células con naranja de acridina confirmaron el aumento del volumen lisosomal (aumento de la fluorescencia roja), así como la liberación del contenido lisosomal al citoplasma (aumento de la fluorescencia verde). Estos cambios fueron mucho más evidentes en las líneas más susceptibles al PTER, A375 y A549 (**Figura 18**).

Un signo distintivo de la permeabilización de la membrana lisosomal es la translocación de los componentes solubles lisosomales, entre ellos las catepsinas, del lumen lisosomal al citosol (Boya and Kroemer, 2008). Nuestros datos de inmunofluorescencia y de actividad catepsina citosólica confirman que el PTER efectivamente induce la liberación de aspartil y cisteín catepsinas al citosol (**Figuras 19 y 20**).

Aunque no está claro el mecanismo por el cual el PTER induce la permeabilización lisosomal, resultados preliminares (**Figura 22**) indican que el PTER induce alteraciones sobre el grado de polimerización de los microtúbulos. De hecho otros polifenoles naturales entre los que se encuentran derivados sintéticos del RESV, también actúan a este nivel (Hong et al., 2009; Ruan et al., 2012; Schneider et al., 2003).

Los microtúbulos están directamente implicados en el tráfico de orgánulos citoplasmáticos, entre ellos los lisosomas y los autofagosomas. De hecho, aunque no actúan directamente en la fusión entre ambos orgánulos, sí que son indispensables para la formación de los autofagosomas y para ubicarlos próximos a los lisosomas para facilitar su correcta fusión (Kochl et al., 2006; Mackeh et al., 2013). Además, se ha demostrado que los fármacos citotóxicos que actúan alterando la

polimerización de la tubulina, tanto estabilizadores (taxanos) como desestabilizadores de los microtúbulos (alcaloides de la vinca), inducen la desestabilización de la membrana lisosomal y como consecuencia, su permeabilización y la liberación al citosol de las hidrolasas lisosomales. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a este efecto son desconocidos (Aits and Jaattela, 2013; Broker et al., 2004; Groth-Pedersen et al., 2012; Groth-Pedersen et al., 2007).

Esto coincide con los resultados obtenidos ya que el PTER es capaz de inducir un acúmulo de autofagosomas, bloqueo de su fusión con los lisosomas, alteración de la membrana lisosomal, y liberación al citoplasma de catepsinas y otras hidrolasas lisosomales. Nuestras observaciones sugieren que la alteración de los microtúbulos puede ser uno de los mecanismos de acción implicados en el citotoxicidad del PTER.

Tal y como describimos en la presente tesis, la citotoxicidad inducida por el PTER es consecuencia de la permeabilización de la membrana lisosomal. Una vez liberadas las catepsinas y otras hidrolasas al citosol, estas inducen muerte por apoptosis (dependiente e independiente de caspasas), por necrosis, o por ambas en función de la concentración y el tiempo de exposición al polifenol. Por lo general, es predominante la apoptosis a tiempos cortos y concentraciones bajas, y la necrosis a tiempos más prolongados y concentraciones más elevadas donde existe una extensa liberación de hidrolasas lisosomales. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el caso del RESV en los que también se sugiere que es capaz de inducir muerte celular mediada por la permeabilización de la membrana lisosomal, y más concretamente por la liberación de las catepsinas D y L (Hsu et al., 2009; Trincheri et al., 2007).

Para corroborar si las catepsinas están implicadas en el mecanismo de acción citotóxico del PTER utilizamos diferentes inhibidores farmacológicos (pepstatina A, inhibidor de catepsinas D y E, y leupeptina inhibidor de catepsinas B, H y L). Contrariamente a lo que cabía esperar, su inhibición no revierte la muerte celular provocada por el PTER (**Figura 21**). Esto sugiere, a priori, que las catepsinas inhibidas no son las principales hidrolasas efectoras en la muerte celular lisosomal inducida

por el PTER. Hay que tener en cuenta que, aunque las catepsinas analizadas son las que se encuentran de forma mayoritaria en el lumen lisosomal, tras la permeabilización de la membrana del orgánulo se liberan al menos 50 enzimas hidrolíticas distintas incluyendo lipasas, fosfatasas, DNasas, RNasas, glicosidasas, peptidasas, sulfatasas y otras proteasas (Kroemer and Jaattela, 2005). Por tanto, la citotoxicidad inducida por la liberación masiva de todas ellas no puede ser inhibida bloqueando simplemente la acción de las catepsinas D, E, B, H y L. De hecho, como ya se ha descrito en otros trabajos, una de las características de la muerte celular lisosomal es que aunque las catepsinas parecen ser las ejecutoras de este proceso de muerte, su inhibición solo protege de forma parcial frente a la muerte celular, sugiriendo que deben estar implicadas otro tipo de enzimas o segundos mensajeros derivados de los lisosomas, y con mayor peso en este mecanismo (Aits and Jaattela, 2013). También se ha observado que el tipo de proteasas lisosomales involucradas en la muerte celular lisosomal depende del modelo celular, del estímulo que lo desencadene y probablemente de la disponibilidad de sustratos específicos y otros factores metabólicos desconocidos (Trincheri et al., 2007). Así pues, para evaluar la relevancia de este tipo de muerte en la citotoxicidad derivada del tratamiento con PTER, recurrimos al análisis de una de las proteínas implicadas en la protección de la membrana lisosomal, la proteína de choque térmico Hsp70 (Kirkegaard and Jaattela, 2009; Nylandsted et al., 2004; Petersen et al., 2010).

### **3.1. Papel de Hsp70, un inhibidor de la permeabilización de la membrana lisosomal, en el efecto citotóxico del pterostilbeno**

Hsp70, también llamada Hsp70-1 o Hsp72, es una proteína de choque térmico que se sintetiza en respuesta a señales de estrés promoviendo la supervivencia celular. Por ello, no es de extrañar que en las células tumorales se encuentren altos niveles de esta proteína y que

su expresión se correlacione con una peor respuesta al tratamiento (Murphy, 2013).

Una de las vías por las que Hsp70 promueve la supervivencia de las células tumorales es debida a su translocación a la membrana lisosomal, donde actúa como guardián de su integridad inhibiendo la liberación de hidrolasas intraluminales y, por tanto, evitando la muerte celular lisosomal (Kirkegaard and Jaattela, 2009; Nylandsted et al., 2004; Petersen et al., 2010).

Nuestros resultados muestran una clara correspondencia entre los niveles de Hsp70 y la susceptibilidad al tratamiento con PTER (**Figuras 1 y 23**). De hecho, las dos líneas con niveles más altos de Hsp70 eran menos sensibles al tratamiento polifenólico.

Para comprobar si el principal mecanismo de muerte inducido por el PTER está mediado por la permeabilización de la membrana lisosomal, procedimos a silenciar Hsp70 en las dos líneas más resistentes al tratamiento. El hecho de que al silenciar Hsp70, aumente, tras tratar las células con PTER, tanto la liberación de catepsinas al citosol como la susceptibilidad al tratamiento, indica que la citotoxicidad inducida por el PTER es mediada preferentemente por un aumento en la permeabilización de la membrana lisosomal (**Figuras 25 y 26**). Este hecho se corrobora en la **Figura 27** en la que se pone de manifiesto que aunque Hsp70 también se ha descrito como una proteína antiapoptótica, su silenciamiento y posterior tratamiento con PTER da lugar preferentemente a la muerte celular por necrosis, que sería inducida por una mayor liberación de hidrolasas lisosomales producida por el PTER al disminuir los niveles de Hsp70.

Es necesario indicar que la viabilidad celular obtenida para ambas líneas tras el tratamiento con PTER (**Figura 1**) difiere de la obtenida posteriormente en la **Figura 25**. Ello es debido a que el método utilizado para su análisis es diferente. Mientras que en la **Figura 1** evaluamos el número de células por contaje basado en el método de exclusión del colorante vital azul tripán, en la **Figura 25** lo determinamos por el método de la sulforhodamina B. Además, en esta última, debido a la

metodología necesaria para realizar el silenciamiento, en lugar de añadir el PTER a las 24h de la siembra celular como en el resto de experimentos, lo añadimos a las 48h, donde la confluencia en el cultivo celular era considerablemente superior, disminuyendo así el efecto del polifenol.

## **4. Efecto del metabolismo celular del pterostilbeno en su acción antitumoral**

---

A lo largo de este trabajo se ha observado cómo aunque el PTER tiene efectos antitumorales en todas las líneas celulares utilizadas, estas responden de forma diferente al tratamiento. Las líneas celulares HT29 y MCF7 muestran una mayor resistencia a los efectos antitumorales del PTER en comparación con las líneas A375 y A549. Esta observación experimental puede ser debida, en parte, a los distintos niveles intracelulares de Hsp70, pero no tiene porqué ser la única explicación.

La rápida metabolización es uno de los factores limitantes para la bioactividad de los polifenoles porque estos, en su forma nativa, son biológicamente más activos que sus metabolitos (Asensi et al., 2011).

Los polifenoles son sometidos mayoritariamente a procesos de metabolización de fase II. El PTER concretamente, sufre principalmente reacciones de sulfatación y glucuronidación, siendo sus metabolitos mayoritarios encontrados en plasma y orina el PTER sulfato (PTER-S) y el PTER glucurónido (PTER-GLU) (Kapetanovic et al., 2011; Remsberg et al., 2008; Shao et al., 2010).

Así pues, nos planteamos la posibilidad de que la diferente respuesta al tratamiento fuera también ocasionada por una distinta capacidad celular para metabolizar el PTER.

Para evaluar el grado de metabolización determinamos la cantidad de PTER en el medio y en las células. La suma la comparamos con un medio control tratado con PTER en las mismas condiciones pero sin

células para determinar si existía la misma cantidad de PTER inicial o si por el contrario este había desaparecido, es decir, se había transformado/metabolizado.

Nuestros resultados demuestran que, al tratar las líneas A375 y A549 con PTER, apenas se produce una disminución de su cantidad en el medio celular a los tiempos testados, y que ésta se corresponde con un aumento de la cantidad intracelular de PTER. Esto indica que el polifenol no se ha metabolizado. Sin embargo, en el caso de la línea celular MCF7, observamos que la cantidad de PTER en el medio disminuye más que en las líneas anteriormente mencionadas, sobre todo a 24h, pero en cambio, el aumento que se observa en el interior celular no explica esta desaparición. Estos datos sugieren que la disminución de la cantidad de PTER en esta línea podría ser debida a que éste ha sido metabolizado. En el caso de la línea celular HT29 la desaparición del PTER es mucho más acusada y rápida, de hecho a 24h ya no observamos presencia de PTER ni en el medio ni el interior celular por lo que a este tiempo todo el PTER ha sido metabolizado (**Figura 28**).

Para corroborar esta hipótesis necesitábamos evaluar la presencia o ausencia de PTER y sus metabolitos tanto en el medio como en las células (**Figuras 29 y 30**). Tal y como esperábamos, en las líneas más sensibles al tratamiento, A375 y A549, solo detectamos PTER. Esto indica que ambas líneas celulares presentan una baja capacidad para metabolizar el polifenol. En la línea celular MCF7 observamos la presencia de PTER-S tanto a 6 como a 24h, mientras que en la línea HT29 detectamos tanto PTER-S como PTER-GLU. Esto es indicativo de que las líneas más resistentes al tratamiento tienen mayor capacidad para metabolizar el PTER, y por tanto de reducir sus efectos celulares.

El hecho de que las líneas celulares HT29 y MCF7 presenten una mayor capacidad para metabolizar el PTER puede ser explicado con la bibliografía existente. Teniendo en cuenta que uno de los lugares principales de metabolización del PTER es el intestino (Manach et al., 2004), no es de extrañar que las HT29, una línea de carcinoma de colon, muestren una gran capacidad para metabolizar este polifenol. De hecho,

está descrito en la bibliografía que la glucuronidación de los polifenoles tiene lugar, en primer lugar, en el intestino por la familia de UGTs UGT1A. Además, las células de colon expresan la isoforma SULT1A3 que podría jugar un papel importante en la sulfatación de los polifenoles (Scalbert and Williamson, 2000). Todo ello coincide con nuestros resultados ya que en esta línea celular encontramos PTER sulfatado y glucuronidado. En cuanto a las células de mama, tanto normales como tumorales, se conoce que contienen varias enzimas implicadas en el metabolismo estrogénico, entre ellas sulfotransferasas que convierten el estradiol en estradiol sulfato que es biológicamente inactivo (Pasqualini, 2009). Esto explicaría porque tras tratar con PTER la línea celular de carcinoma de mama MCF7, éste es metabolizado activamente y transformado únicamente en PTER-S.

En conjunto, los datos indican que las líneas A375 y A549 metabolizan el PTER de forma mucho más lenta que las líneas HT29 y MCF7. Y entre estas dos últimas, la línea celular HT29 es bastante más rápida metabolizando el PTER que la línea MCF7. Estos datos coinciden con el grado de susceptibilidad al tratamiento: A375=A549 > MCF7 > HT29, y confirman que la distinta capacidad para metabolizar el PTER junto con los distintos niveles de Hsp70, son los responsables de la distinta respuesta al tratamiento con este polifenol.

# CONCLUSIONES

---



- ✓ La acción antitumoral del PTER y el RESV es tiempo y concentración dependiente. Además, el PTER tiene efectos antitumorales similares e incluso ligeramente más potentes que el RESV en las cuatro líneas tumorales testadas: A375 (melanoma), A549 (pulmón), HT29 (colon) y MCF7 (mama), por lo que se presenta como una mejor opción terapéutica.
- ✓ Las líneas celulares utilizadas responden de forma diferente al tratamiento con ambos polifenoles, siendo A375 y A549 más sensibles que HT29 y MCF7.
- ✓ El PTER y el RESV dan lugar a una parada de ciclo celular acompañada de una disminución de la síntesis de ADN. Este efecto citostático no explica la disminución en el número de células, claramente asociado a la activación de mecanismos de muerte celular.
- ✓ La citotoxicidad inducida por el PTER es consecuencia de la permeabilización de la membrana lisosomal. Esto da lugar a la liberación al citosol de hidrolasas lisosomales que desencadenarán muerte celular por apoptosis (dependiente e independiente de caspasas), necrosis, o por ambas en función de la concentración y el tiempo de exposición al polifenol.
- ✓ Los efectos citotóxicos del PTER dependen de los niveles de Hsp70 así como de la capacidad celular para metabolizar el polifenol. De hecho, las líneas más resistentes (HT29 y MCF7) presentan mayores niveles de Hsp70 y una mayor capacidad para metabolizar el PTER, mientras que las líneas más sensibles (A375 y A549) presentan niveles más bajos de Hsp70 y una capacidad metabólica menor.



# BIBLIOGRAFÍA

---



(2010). Pterostilbene. Monograph. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* 15, 159-163.

Acosta, J. C., and Gil, J. (2012). Senescence: a new weapon for cancer therapy. *Trends in cell biology* 22, 211-219.

Adrian, M., Jeandet, P., Breuil, A. C., Levite, D., Debord, S., and Bessis, R. (2000a). Assay of Resveratrol and Derivative Stilbenes in Wines by Direct Injection High Performance Liquid Chromatography. *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 37-41.

Adrian, M., Jeandet, P., Douillet-Breuil, A. C., Tesson, L., and Bessis, R. (2000b). Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. *Journal of agricultural and food chemistry* 48, 6103-6105.

Aggarwal, B. B., and Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical pharmacology* 71, 1397-1421.

Aits, S., and Jaattela, M. (2013). Lysosomal cell death at a glance. *Journal of cell science* 126, 1905-1912.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2007). *Molecular Biology of the Cell*, Fifth edn: Garland Publishing).

Alosi, J. A., McDonald, D. E., Schneider, J. S., Privette, A. R., and McFadden, D. W. (2010). Pterostilbene inhibits breast cancer in vitro through mitochondrial depolarization and induction of caspase-dependent apoptosis. *The Journal of surgical research* 161, 195-201.

Amarnath Satheesh, M., and Pari, L. (2006). The antioxidant role of pterostilbene in streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetes mellitus in Wistar rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 58, 1483-1490.

Amin, A. R., Wang, D., Zhang, H., Peng, S., Shin, H. J., Brandes, J. C., Tighiouart, M., Khuri, F. R., Chen, Z. G., and Shin, D. M. (2010). Enhanced anti-tumor activity by the combination of the natural compounds (-)-epigallocatechin-3-gallate and luteolin: potential role of p53. *The Journal of biological chemistry* 285, 34557-34565.

Amorati, R., Lucarini, M., Mugnaini, V., Pedulli, G. F., Roberti, M., and Pizzirani, D. (2004). Antioxidant activity of hydroxystilbene derivatives in homogeneous solution. *The Journal of organic chemistry* 69, 7101-7107.

Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B., and Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical research* 25, 2097-2116.

Andreoli, F., Barbosa, A. J., Parenti, M. D., and Del Rio, A. (2013). Modulation of epigenetic targets for anticancer therapy: clinicopathological relevance,

structural data and drug discovery perspectives. *Current pharmaceutical design* 19, 578-613.

Aquilano, K., Baldelli, S., Rotilio, G., and Ciriolo, M. R. (2008). Role of nitric oxide synthases in Parkinson's disease: a review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. *Neurochemical research* 33, 2416-2426.

Asensi, M., Medina, I., Ortega, A., Carretero, J., Bano, M. C., Obrador, E., and Estrela, J. M. (2002). Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free radical biology & medicine* 33, 387-398.

Asensi, M., Ortega, A., Mena, S., Feddi, F., and Estrela, J. M. (2011). Natural polyphenols in cancer therapy. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 48, 197-216.

Athar, M., Back, J. H., Tang, X., Kim, K. H., Kopelovich, L., Bickers, D. R., and Kim, A. L. (2007). Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and applied pharmacology* 224, 274-283.

Aumont, V., Krisa, S., Battaglia, E., Netter, P., Richard, T., Merillon, J. M., Magdalou, J., and Sabolovic, N. (2001). Regioselective and stereospecific glucuronidation of trans- and cis-resveratrol in human. *Archives of biochemistry and biophysics* 393, 281-289.

Back, J. H., Rezvani, H. R., Zhu, Y., Guyonnet-Duperat, V., Athar, M., Ratner, D., and Kim, A. L. (2011). Cancer cell survival following DNA damage-mediated premature senescence is regulated by mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent inhibition of sirtuin 1. *The Journal of biological chemistry* 286, 19100-19108.

Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research* 21, 381-395.

Bansal, S. S., Goel, M., Aqil, F., Vadhanam, M. V., and Gupta, R. C. (2011). Advanced drug delivery systems of curcumin for cancer chemoprevention. *Cancer prevention research* 4, 1158-1171.

Basli, A., Soulet, S., Chaher, N., Merillon, J. M., Chibane, M., Monti, J. P., and Richard, T. (2012). Wine polyphenols: potential agents in neuroprotection. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012, 805762.

Bayley, J. P., and Devilee, P. (2012). The Warburg effect in 2012. *Current opinion in oncology* 24, 62-67.

Bernhard, D., Tinhofer, I., Tonko, M., Hubl, H., Ausserlechner, M. J., Greil, R., Kofler, R., and Csordas, A. (2000). Resveratrol causes arrest in the S-phase prior to Fas-independent apoptosis in CEM-C7H2 acute leukemia cells. *Cell death and differentiation* 7, 834-842.

- Bhardwaj, A., Sethi, G., Vadhan-Raj, S., Bueso-Ramos, C., Takada, Y., Gaur, U., Nair, A. S., Shishodia, S., and Aggarwal, B. B. (2007). Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells. *Blood* 109, 2293-2302.
- Biankin, A. V., and Hudson, T. J. (2011). Somatic variation and cancer: therapies lost in the mix. *Human genetics* 130, 79-91.
- Bignold, L. P. (2007). Variation, "evolution", immortality and genetic instabilities in tumour cells. *Cancer letters* 253, 155-169.
- Billack, B., Radkar, V., and Adiabouah, C. (2008). In vitro evaluation of the cytotoxic and anti-proliferative properties of resveratrol and several of its analogs. *Cellular & molecular biology letters* 13, 553-569.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Overvatn, A., Brech, A., and Johansen, T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods in enzymology* 452, 181-197.
- Bignaut, M. (2012). Review of *Non-coding RNAs and the epigenetic regulation of gene expression*: A book edited by Kevin Morris. *Epigenetics* 7, 664-666.
- Bode, A. M., and Dong, Z. (2009). Epigallocatechin 3-gallate and green tea catechins: United they work, divided they fail. *Cancer prevention research* 2, 514-517.
- Bollag, G., Hirth, P., Tsai, J., Zhang, J., Ibrahim, P. N., Cho, H., Spevak, W., Zhang, C., Zhang, Y., Habets, G., *et al.* (2010). Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 467, 596-599.
- Borska, S., Sopol, M., Chmielewska, M., Zabel, M., and Dziegiel, P. (2010). Quercetin as a potential modulator of P-glycoprotein expression and function in cells of human pancreatic carcinoma line resistant to daunorubicin. *Molecules* 15, 857-870.
- Boya, P., Gonzalez-Polo, R. A., Poncet, D., Andreau, K., Vieira, H. L., Roumier, T., Perfettini, J. L., and Kroemer, G. (2003). Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene* 22, 3927-3936.
- Boya, P., and Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 27, 6434-6451.
- Boyerinas, B., Park, S. M., Hau, A., Murmann, A. E., and Peter, M. E. (2010). The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocrine-related cancer* 17, F19-36.

Boyle, P., and Levin, B. (2008). World Cancer Report 2008: International Agency for Research on Cancer (IARC).

Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews* 56, 317-333.

Broker, L. E., Huisman, C., Span, S. W., Rodriguez, J. A., Kruyt, F. A., and Giaccone, G. (2004). Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. *Cancer research* 64, 27-30.

Bursch, W., Ellinger, A., Gerner, C., Frohwein, U., and Schulte-Hermann, R. (2000). Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Annals of the New York Academy of Sciences* 926, 1-12.

Caldas, C., and Venkitaraman, A. R. (2001). Tumor Suppressor Genes. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, M. Editors-in-Chief: Stanley, and H. Kelly, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 232-237.

Caltagirone, S., Rossi, C., Poggi, A., Ranelletti, F. O., Natali, P. G., Brunetti, M., Aiello, F. B., and Piantelli, M. (2000). Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *International journal of cancer Journal international du cancer* 87, 595-600.

Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual review of physiology* 75, 685-705.

Cedar, H., and Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature reviews Genetics* 10, 295-304.

Cesen, M. H., Pegan, K., Spes, A., and Turk, B. (2012). Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. *Experimental cell research* 318, 1245-1251.

Cichocki, M., Paluszczak, J., Szafer, H., Piechowiak, A., Rimando, A. M., and Baer-Dubowska, W. (2008). Pterostilbene is equally potent as resveratrol in inhibiting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activated NFkappaB, AP-1, COX-2, and iNOS in mouse epidermis. *Molecular nutrition & food research* 52 *Suppl 1*, S62-70.

Codogno, P., Mehrpour, M., and Proikas-Cezanne, T. (2012). Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 7-12.

Coimbra, M., Isacchi, B., van Bloois, L., Torano, J. S., Ket, A., Wu, X., Broere, F., Metselaar, J. M., Rijcken, C. J., Storm, G., *et al.* (2011). Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. *International journal of pharmaceutics* 416, 433-442.

- Colin, D., Gimazane, A., Lizard, G., Izard, J. C., Solary, E., Latruffe, N., and Delmas, D. (2009). Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5fluoro-uracil sensitivity in human derived colon cancer cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* 124, 2780-2788.
- Commenges, D., Scotet, V., Renaud, S., Jacqmin-Gadda, H., Barberger-Gateau, P., and Dartigues, J. F. (2000). Intake of flavonoids and risk of dementia. *European journal of epidemiology* 16, 357-363.
- Cregan, S. P., Dawson, V. L., and Slack, R. S. (2004). Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 23, 2785-2796.
- Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigne, C., and Remesy, C. (2002). Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 618-621.
- Criqui, M. H., and Ringel, B. L. (1994). Does diet or alcohol explain the French paradox? *Lancet* 344, 1719-1723.
- Croce, C. M. (2008). Oncogenes and cancer. *The New England journal of medicine* 358, 502-511.
- Cui, J., Sun, R., Yu, Y., Gou, S., Zhao, G., and Wang, C. (2010). Antiproliferative effect of resveratrol in pancreatic cancer cells. *Phytotherapy research : PTR* 24, 1637-1644.
- Cummins, D. L., Cummins, J. M., Pantle, H., Silverman, M. A., Leonard, A. L., and Chanmugam, A. (2006). Cutaneous malignant melanoma. *Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic* 81, 500-507.
- Chakraborty, A., Gupta, N., Ghosh, K., and Roy, P. (2010). In vitro evaluation of the cytotoxic, anti-proliferative and anti-oxidant properties of pterostilbene isolated from *Pterocarpus marsupium*. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 24, 1215-1228.
- Chalopin, M., Tesse, A., Martinez, M. C., Rognan, D., Arnal, J. F., and Andriantsitohaina, R. (2010). Estrogen receptor alpha as a key target of red wine polyphenols action on the endothelium. *PloS one* 5, e8554.
- Chanet, A., Milenkovic, D., Manach, C., Mazur, A., and Morand, C. (2012). Citrus flavanones: what is their role in cardiovascular protection? *Journal of agricultural and food chemistry* 60, 8809-8822.
- Chen, C., Zhou, J., and Ji, C. (2010a). Quercetin: a potential drug to reverse multidrug resistance. *Life sciences* 87, 333-338.

Chen, R. J., Ho, C. T., and Wang, Y. J. (2010b). Pterostilbene induces autophagy and apoptosis in sensitive and chemoresistant human bladder cancer cells. *Molecular nutrition & food research* *54*, 1819-1832.

Choi, K. S. (2012). Autophagy and cancer. *Experimental & molecular medicine* *44*, 109-120.

Chung, S. Y., Sung, M. K., Kim, N. H., Jang, J. O., Go, E. J., and Lee, H. J. (2005). Inhibition of P-glycoprotein by natural products in human breast cancer cells. *Archives of pharmacal research* *28*, 823-828.

D'Archivio, M., Filesì, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., and Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto superiore di sanita* *43*, 348-361.

Dai, J., and Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* *15*, 7313-7352.

Dai, Q., Borenstein, A. R., Wu, Y., Jackson, J. C., and Larson, E. B. (2006). Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: the Kame Project. *The American journal of medicine* *119*, 751-759.

Damianaki, A., Bakogeorgou, E., Kampa, M., Notas, G., Hatzoglou, A., Panagiotou, S., Gemetzi, C., Kouroumalis, E., Martin, P. M., and Castanas, E. (2000). Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *Journal of cellular biochemistry* *78*, 429-441.

Darvesh, A. S., and Bishayee, A. (2013). Chemopreventive and therapeutic potential of tea polyphenols in hepatocellular cancer. *Nutrition and cancer* *65*, 329-344.

Davalli, P., Rizzi, F., Caporali, A., Pellacani, D., Davoli, S., Bettuzzi, S., Brausi, M., and D'Arca, D. (2012). Anticancer activity of green tea polyphenols in prostate gland. *Oxidative medicine and cellular longevity* *2012*, 984219.

Dawson, M. A., and Kouzarides, T. (2012). Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* *150*, 12-27.

de Bruin, E. C., and Medema, J. P. (2008). Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer treatment reviews* *34*, 737-749.

de Lau, L. M., and Breteler, M. M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet neurology* *5*, 525-535.

de Santi, C., Pietrabissa, A., Mosca, F., and Pacifici, G. M. (2000). Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* *30*, 1047-1054.

- Decker, T., and Lohmann-Matthes, M. L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of immunological methods* *115*, 61-69.
- Deeb, D., Xu, Y. X., Jiang, H., Gao, X., Janakiraman, N., Chapman, R. A., and Gautam, S. C. (2003). Curcumin (diferuloyl-methane) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* *2*, 95-103.
- Degterev, A., Hitomi, J., Gemscheid, M., Ch'en, I. L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G. D., Yuan, C., Wagner, G., *et al.* (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nature chemical biology* *4*, 313-321.
- Delmas, D., Passilly-Degrace, P., Jannin, B., Cherkaoui Malki, M., and Latruffe, N. (2002). Resveratrol, a chemopreventive agent, disrupts the cell cycle control of human SW480 colorectal tumor cells. *International journal of molecular medicine* *10*, 193-199.
- Delmas, D., Rebe, C., Micheau, O., Athias, A., Gambert, P., Grazide, S., Laurent, G., Latruffe, N., and Solary, E. (2004). Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells. *Oncogene* *23*, 8979-8986.
- Delmas, D., Solary, E., and Latruffe, N. (2011). Resveratrol, a phytochemical inducer of multiple cell death pathways: apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe. *Current medicinal chemistry* *18*, 1100-1121.
- Dellinger, R. W., Garcia, A. M., and Meyskens Jr, F. L. (2013). Differences in the glucuronidation of resveratrol and pterostilbene; altered enzyme specificity and potential gender differences. *Drug metabolism and pharmacokinetics*.
- Denamur, S., Tyteca, D., Marchand-Brynaert, J., Van Bambeke, F., Tulkens, P. M., Courtoy, P. J., and Mingeot-Leclercq, M. P. (2011). Role of oxidative stress in lysosomal membrane permeabilization and apoptosis induced by gentamicin, an aminoglycoside antibiotic. *Free radical biology & medicine* *51*, 1656-1665.
- Desch, S., Schmidt, J., Kobler, D., Sonnabend, M., Eitel, I., Sareban, M., Rahimi, K., Schuler, G., and Thiele, H. (2010). Effect of cocoa products on blood pressure: systematic review and meta-analysis. *American journal of hypertension* *23*, 97-103.
- Diaz-Moralli, S., Tarrado-Castellarnau, M., Miranda, A., and Cascante, M. (2013). Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacology & therapeutics* *138*, 255-271.

Dohadwala, M. M., and Vita, J. A. (2009). Grapes and cardiovascular disease. *The Journal of nutrition* 139, 1788S-1793S.

Dou, Q. P. (2009). Molecular mechanisms of green tea polyphenols. *Nutrition and cancer* 61, 827-835.

Duriez, P. J., and Shah, G. M. (1997). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 75, 337-349.

Elbling, L., Weiss, R. M., Teufelhofer, O., Uhl, M., Knasmueller, S., Schulte-Hermann, R., Berger, W., and Micksche, M. (2005). Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 807-809.

Engler, M. B., Engler, M. M., Chen, C. Y., Malloy, M. J., Browne, A., Chiu, E. Y., Kwak, H. K., Milbury, P., Paul, S. M., Blumberg, J., and Mietus-Snyder, M. L. (2004). Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *Journal of the American College of Nutrition* 23, 197-204.

Erlund, I., Koli, R., Alfthan, G., Marniemi, J., Puukka, P., Mustonen, P., Mattila, P., and Jula, A. (2008). Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *The American journal of clinical nutrition* 87, 323-331.

Estrela, J. M., Ortega, A., Mena, S., Rodriguez, M. L., and Asensi, M. (2013). Pterostilbene: Biomedical applications. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*.

Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., and De Laurenzi, V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging* 4, 330-349.

Fehrenbacher, N., and Jaattela, M. (2005). Lysosomes as targets for cancer therapy. *Cancer research* 65, 2993-2995.

Ferrer, P., Asensi, M., Priego, S., Benlloch, M., Mena, S., Ortega, A., Obrador, E., Esteve, J. M., and Estrela, J. M. (2007). Nitric oxide mediates natural polyphenol-induced Bcl-2 down-regulation and activation of cell death in metastatic B16 melanoma. *The Journal of biological chemistry* 282, 2880-2890.

Ferrer, P., Asensi, M., Segarra, R., Ortega, A., Benlloch, M., Obrador, E., Varea, M. T., Asensio, G., Jorda, L., and Estrela, J. M. (2005). Association between pterostilbene and quercetin inhibits metastatic activity of B16 melanoma. *Neoplasia* 7, 37-47.

- Filippi-Chiela, E. C., Villodre, E. S., Zamin, L. L., and Lenz, G. (2011). Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells. *PLoS one* *6*, e20849.
- Flórez, J., Arnijo, J. A., and Mediavilla, A. (2008). *Farmacología humana*, 5th edn: MASSON, S.A.).
- Fraga, C. G., Galleano, M., Verstraeten, S. V., and Oteiza, P. I. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular aspects of medicine* *31*, 435-445.
- Fresco, P., Borges, F., Diniz, C., and Marques, M. P. (2006). New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal research reviews* *26*, 747-766.
- Freshney, R. (1987). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, (New York).
- Fuendjiep, V., Wandji, J., Tillequin, F., Mulholland, D. A., Budzikiewicz, H., Fomum, Z. T., Nyemba, A. M., and Koch, M. (2002). Chalconoid and stilbenoid glycosides from *Guibourtia tessmanii*. *Phytochemistry* *60*, 803-806.
- Fulda, S., and Debatin, K. M. (2004). Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Oncogene* *23*, 6702-6711.
- Fulda, S., and Debatin, K. M. (2005). Resveratrol-mediated sensitisation to TRAIL-induced apoptosis depends on death receptor and mitochondrial signalling. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* *41*, 786-798.
- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell death and differentiation* *14*, 1237-1243.
- Gao, S., and Hu, M. (2010). Bioavailability challenges associated with development of anti-cancer phenolics. *Mini reviews in medicinal chemistry* *10*, 550-567.
- Garg, A. K., Buchholz, T. A., and Aggarwal, B. B. (2005). Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols. *Antioxidants & redox signaling* *7*, 1630-1647.
- Gastaminza, P., Whitten-Bauer, C., and Chisari, F. V. (2010). Unbiased probing of the entire hepatitis C virus life cycle identifies clinical compounds that target multiple aspects of the infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 291-296.
- Germain, M., Affar, E. B., D'Amours, D., Dixit, V. M., Salvesen, G. S., and Poirier, G. G. (1999). Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *The Journal of biological chemistry* *274*, 28379-28384.

- Gil, J., Stembalska, A., Pesz, K. A., and Sasiadek, M. M. (2008). Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *Journal of applied genetics* 49, 193-199.
- Gillet, J. P., and Gottesman, M. M. (2010). Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 596, 47-76.
- Goel, A., and Aggarwal, B. B. (2010). Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. *Nutrition and cancer* 62, 919-930.
- Goh, A. M., Coffill, C. R., and Lane, D. P. (2011). The role of mutant p53 in human cancer. *The Journal of pathology* 223, 116-126.
- Gokbulut, A. A., Apohan, E., and Baran, Y. (2013). Resveratrol and quercetin-induced apoptosis of human 232B4 chronic lymphocytic leukemia cells by activation of caspase-3 and cell cycle arrest. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 18, 144-150.
- Goldberg, A. L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426, 895-899.
- Goloudina, A. R., Demidov, O. N., and Garrido, C. (2012). Inhibition of HSP70: a challenging anti-cancer strategy. *Cancer letters* 325, 117-124.
- Gonthier, M. P., Remesy, C., Scalbert, A., Cheynier, V., Souquet, J. M., Poutanen, K., and Aura, A. M. (2006). Microbial metabolism of caffeic acid and its esters chlorogenic and caftaric acids by human faecal microbiota in vitro. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 60, 536-540.
- Grassi, D., Necozone, S., Lippi, C., Croce, G., Valeri, L., Pasqualetti, P., Desideri, G., Blumberg, J. B., and Ferri, C. (2005). Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. *Hypertension* 46, 398-405.
- Greaves, M., and Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306-313.
- Groth-Pedersen, L., Aits, S., Corcelle-Termeau, E., Petersen, N. H., Nylandsted, J., and Jaattela, M. (2012). Identification of cytoskeleton-associated proteins essential for lysosomal stability and survival of human cancer cells. *PLoS one* 7, e45381.
- Groth-Pedersen, L., Ostensfeld, M. S., Hoyer-Hansen, M., Nylandsted, J., and Jaattela, M. (2007). Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine. *Cancer research* 67, 2217-2225.

- Gupta, S. C., Kannappan, R., Reuter, S., Kim, J. H., and Aggarwal, B. B. (2011). Chemosensitization of tumors by resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1215, 150-160.
- Halliwell, B., Zhao, K., and Whiteman, M. (2000). The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free radical research* 33, 819-830.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Harborne, J. B. (1989). I: plant phenolics. In *Methods in plant biochemistry*, (London: Academic press).
- Harbour, J. W., and Dean, D. C. (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes & development* 14, 2393-2409.
- Hartl, M., and Bister, K. (2013). Oncogenes. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, M. Editors-in-Chief: Stanley, and H. Kelly, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 164-166.
- Hasiah, A. H., Ghazali, A. R., Weber, J. F., Velu, S., Thomas, N. F., and Inayat Hussain, S. H. (2011). Cytotoxic and antioxidant effects of methoxylated stilbene analogues on HepG2 hepatoma and Chang liver cells: Implications for structure activity relationship. *Human & experimental toxicology* 30, 138-144.
- Hatzia Apostolou, M., and Iliopoulos, D. (2011). Epigenetic aberrations during oncogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68, 1681-1702.
- Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* 25, 585-621.
- Healthcare, G. (2006). High-content cell viability and apoptosis assays using fluorescent annexin V conjugates on the IN Cel analyzer 3000. In.
- Heiss, C., Kleinbongard, P., Dejam, A., Perre, S., Schroeter, H., Sies, H., and Kelm, M. (2005). Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. *Journal of the American College of Cardiology* 46, 1276-1283.
- Hertzberg, R. P., Caranfa, M. J., and Hecht, S. M. (1989). On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex. *Biochemistry* 28, 4629-4638.
- Hong, Y. B., Kang, H. J., Kim, H. J., Rosen, E. M., Dakshanamurthy, S., Rondanin, R., Baruchello, R., Grisolia, G., Daniele, S., and Bae, I. (2009). Inhibition of cell proliferation by a resveratrol analog in human pancreatic and breast cancer cells. *Experimental & molecular medicine* 41, 151-160.

Hou, Z., Lambert, J. D., Chin, K. V., and Yang, C. S. (2004). Effects of tea polyphenols on signal transduction pathways related to cancer chemoprevention. *Mutation research* 555, 3-19.

Hougee, S., Faber, J., Sanders, A., de Jong, R. B., van den Berg, W. B., Garszen, J., Hoijer, M. A., and Smit, H. F. (2005). Selective COX-2 inhibition by a *Pterocarpus marsupium* extract characterized by pterostilbene, and its activity in healthy human volunteers. *Planta medica* 71, 387-392.

Howells, L. M., Berry, D. P., Elliott, P. J., Jacobson, E. W., Hoffmann, E., Hegarty, B., Brown, K., Steward, W. P., and Gescher, A. J. (2011). Phase I randomized, double-blind pilot study of micronized resveratrol (SRT501) in patients with hepatic metastases--safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Cancer prevention research* 4, 1419-1425.

Hoyer-Hansen, M., and Jaattela, M. (2008). Autophagy: an emerging target for cancer therapy. *Autophagy* 4, 574-580.

Hsu, K. F., Wu, C. L., Huang, S. C., Wu, C. M., Hsiao, J. R., Yo, Y. T., Chen, Y. H., Shiau, A. L., and Chou, C. Y. (2009). Cathepsin L mediates resveratrol-induced autophagy and apoptotic cell death in cervical cancer cells. *Autophagy* 5, 451-460.

Hussain, T., Gupta, S., Adhami, V. M., and Mukhtar, H. (2005). Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* 113, 660-669.

Iqbal, J., Kucuk, C., Deleeuw, R. J., Srivastava, G., Tam, W., Geng, H., Klinkebiel, D., Christman, J. K., Patel, K., Cao, K., *et al.* (2009). Genomic analyses reveal global functional alterations that promote tumor growth and novel tumor suppressor genes in natural killer-cell malignancies. *Leukemia* 23, 1139-1151.

Iqbal, R., Anand, S., Ounpuu, S., Islam, S., Zhang, X., Rangarajan, S., Chifamba, J., Al-Hinai, A., Keltai, M., Yusuf, S., and Investigators, I. S. (2008). Dietary patterns and the risk of acute myocardial infarction in 52 countries: results of the INTERHEART study. *Circulation* 118, 1929-1937.

Jacquemin, G., Shirley, S., and Micheau, O. (2010). Combining naturally occurring polyphenols with TNF-related apoptosis-inducing ligand: a promising approach to kill resistant cancer cells? *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67, 3115-3130.

Jain, M. V., Paczulla, A. M., Klonisch, T., Dimgba, F. N., Rao, S. B., Roberg, K., Schweizer, F., Lengerke, C., Davoodpour, P., Palicharla, V. R., *et al.* (2013). Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *Journal of cellular and molecular medicine* 17, 12-29.

- Jakobisiak, M., Lasek, W., and Golab, J. (2003). Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunology letters* 90, 103-122.
- Janicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., and Porter, A. G. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 273, 9357-9360.
- Javvadi, P., Hertan, L., Kosoff, R., Datta, T., Kolev, J., Mick, R., Tuttle, S. W., and Koumenis, C. (2010). Thioredoxin reductase-1 mediates curcumin-induced radiosensitization of squamous carcinoma cells. *Cancer research* 70, 1941-1950.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A. C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., and Adrian, M. (2002). Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 2731-2741.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 61, 69-90.
- Jensen, J. D., Wing, G. J., and Dellavalle, R. P. (2010). Nutrition and melanoma prevention. *Clinics in dermatology* 28, 644-649.
- Johansen, T., and Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 7, 279-296.
- Johansson, A. C., Appelqvist, H., Nilsson, C., Kagedal, K., Roberg, K., and Ollinger, K. (2010). Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 15, 527-540.
- Johnson, G. E., Ivanov, V. N., and Hei, T. K. (2008). Radiosensitization of melanoma cells through combined inhibition of protein regulators of cell survival. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 13, 790-802.
- Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K. L., Brown, D., and Slack, F. J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120, 635-647.
- Jones, S. B. (1999). Cancer in the developing world: a call to action. *Bmj* 319, 505-508.
- Joseph, J. A., Fisher, D. R., Cheng, V., Rimando, A. M., and Shukitt-Hale, B. (2008). Cellular and behavioral effects of stilbene resveratrol analogues: implications for reducing the deleterious effects of aging. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 10544-10551.
- Joshiyura, K. J., Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Rimm, E. B., Speizer, F. E., Colditz, G., Ascherio, A., Rosner, B., Spiegelman, D., and Willett, W. C. (2001).

The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Annals of internal medicine* 134, 1106-1114.

Joyce, J. A., Baruch, A., Chehade, K., Meyer-Morse, N., Giraudo, E., Tsai, F. Y., Greenbaum, D. C., Hager, J. H., Bogyo, M., and Hanahan, D. (2004). Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer cell* 5, 443-453.

Kairisalo, M., Bonomo, A., Hyrskyluoto, A., Mudo, G., Belluardo, N., Korhonen, L., and Lindholm, D. (2011). Resveratrol reduces oxidative stress and cell death and increases mitochondrial antioxidants and XIAP in PC6.3-cells. *Neuroscience letters* 488, 263-266.

Kampa, M., Hatzoglou, A., Notas, G., Damianaki, A., Bakogeorgou, E., Gemetzi, C., Kouroumalis, E., Martin, P. M., and Castanas, E. (2000). Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutrition and cancer* 37, 223-233.

Kandaswami, C., Lee, L. T., Lee, P. P., Hwang, J. J., Ke, F. C., Huang, Y. T., and Lee, M. T. (2005). The antitumor activities of flavonoids. *In vivo* 19, 895-909.

Kanwal, R., and Gupta, S. (2012). Epigenetic modifications in cancer. *Clinical genetics* 81, 303-311.

Kapetanovic, I. M., Muzzio, M., Huang, Z., Thompson, T. N., and McCormick, D. L. (2011). Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 68, 593-601.

Kastan, M. B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323.

Katiyar, S. K., Agarwal, R., and Mukhtar, H. (1993). Protective effects of green tea polyphenols administered by oral intubation against chemical carcinogen-induced forestomach and pulmonary neoplasia in A/J mice. *Cancer letters* 73, 167-172.

Kaufmann, T., Strasser, A., and Jost, P. J. (2012). Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell death and differentiation* 19, 42-50.

Keepers, Y. P., Pizao, P. E., Peters, G. J., van Ark-Otte, J., Winograd, B., and Pinedo, H. M. (1991). Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 27, 897-900.

Keevil, J. G., Osman, H. E., Reed, J. D., and Folts, J. D. (2000). Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *The Journal of nutrition* 130, 53-56.

- Kendig, D. M., and Tarloff, J. B. (2007). Inactivation of lactate dehydrogenase by several chemicals: implications for in vitro toxicology studies. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 21, 125-132.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257.
- Khushnud, T., and Mousa, S. A. (2013). Potential Role of Naturally Derived Polyphenols and Their Nanotechnology Delivery in Cancer. *Molecular biotechnology*.
- Kim, D. H., Jung, E. A., Sohng, I. S., Han, J. A., Kim, T. H., and Han, M. J. (1998). Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Archives of pharmacal research* 21, 17-23.
- Kimmelman, A. C. (2011). The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes & development* 25, 1999-2010.
- Kingsbury, J. M., Heitman, J., and Pinnell, S. R. (2012). Calcofluor white combination antifungal treatments for *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans*. *PLoS one* 7, e39405.
- Kirkegaard, T., and Jaattela, M. (2009). Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1793, 746-754.
- Kirkegaard, T., Roth, A. G., Petersen, N. H., Mahalka, A. K., Olsen, O. D., Moilanen, I., Zylicz, A., Knudsen, J., Sandhoff, K., Arenz, C., *et al.* (2010). Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology. *Nature* 463, 549-553.
- Klionsky, D. J., Abdalla, F. C., Abeliovich, H., Abraham, R. T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J. A., *et al.* (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445-544.
- Klionsky, D. J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., Askew, D. S., Baba, M., Baehrecke, E. H., Bahr, B. A., Ballabio, A., *et al.* (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4, 151-175.
- Kochl, R., Hu, X. W., Chan, E. Y., and Tooze, S. A. (2006). Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic* 7, 129-145.
- Kong, Y. W., Ferland-McCollough, D., Jackson, T. J., and Bushell, M. (2012). microRNAs in cancer management. *The lancet oncology* 13, e249-258.

Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., and van Oers, M. H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* *84*, 1415-1420.

Korkina, L. G., De Luca, C., Kostyuk, V. A., and Pastore, S. (2009). Plant polyphenols and tumors: from mechanisms to therapies, prevention, and protection against toxicity of anti-cancer treatments. *Current medicinal chemistry* *16*, 3943-3965.

Kreuzaler, P., and Watson, C. J. (2012). Killing a cancer: what are the alternatives? *Nature reviews Cancer* *12*, 411-424.

Krishan, A. (1975). Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *The Journal of cell biology* *66*, 188-193.

Kroemer, G., and Jaattela, M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature reviews Cancer* *5*, 886-897.

Kroemer, G., Marino, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell* *40*, 280-293.

Kuhnle, G., Spencer, J. P., Chowrimootoo, G., Schroeter, H., Debnam, E. S., Srai, S. K., Rice-Evans, C., and Hahn, U. (2000). Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochemical and biophysical research communications* *272*, 212-217.

Kunnumakkara, A. B., Diagaradjane, P., Anand, P., Harikumar, K. B., Deorukhkar, A., Gelovani, J., Guha, S., Krishnan, S., and Aggarwal, B. B. (2009). Curcumin sensitizes human colorectal cancer to capecitabine by modulation of cyclin D1, COX-2, MMP-9, VEGF and CXCR4 expression in an orthotopic mouse model. *International journal of cancer Journal international du cancer* *125*, 2187-2197.

Kushi, L. H., Doyle, C., McCullough, M., Rock, C. L., Demark-Wahnefried, W., Bandera, E. V., Gapstur, S., Patel, A. V., Andrews, K., Gansler, T., *et al.* (2012). American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA: a cancer journal for clinicians* *62*, 30-67.

Kuwajerwala, N., Cifuentes, E., Gautam, S., Menon, M., Barrack, E. R., and Reddy, G. P. (2002). Resveratrol induces prostate cancer cell entry into s phase and inhibits DNA synthesis. *Cancer research* *62*, 2488-2492.

Kweon, S. H., Song, J. H., and Kim, T. S. (2010). Resveratrol-mediated reversal of doxorubicin resistance in acute myeloid leukemia cells via downregulation of MRP1 expression. *Biochemical and biophysical research communications* *395*, 104-110.

- Lafay, S., Gil-Izquierdo, A., Manach, C., Morand, C., Besson, C., and Scalbert, A. (2006). Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. *The Journal of nutrition* *136*, 1192-1197.
- Lambert, J. D., Hong, J., Kim, D. H., Mishin, V. M., and Yang, C. S. (2004). Piperine enhances the bioavailability of the tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice. *The Journal of nutrition* *134*, 1948-1952.
- Lambert, J. D., Hong, J., Yang, G. Y., Liao, J., and Yang, C. S. (2005). Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *The American journal of clinical nutrition* *81*, 284S-291S.
- Lambert, J. D., and Yang, C. S. (2003). Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutation research* *523-524*, 201-208.
- Landete, J. M. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International* *44*, 1150-1160.
- Landis-Piwowar, K. R., and Dou, Q. P. (2008). Polyphenols: biological activities, molecular targets, and the effect of methylation. *Current molecular pharmacology* *1*, 233-243.
- Landis-Piwowar, K. R., Wan, S. B., Wiegand, R. A., Kuhn, D. J., Chan, T. H., and Dou, Q. P. (2007). Methylation suppresses the proteasome-inhibitory function of green tea polyphenols. *Journal of cellular physiology* *213*, 252-260.
- Langcake, P., Cornford, C. A., and Pryce, R. J. (1979). Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. *Phytochemistry* *18*, 1025-1027.
- Larrosa, M., Garcia-Conesa, M. T., Espin, J. C., and Tomas-Barberan, F. A. (2010). Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Molecular aspects of medicine* *31*, 513-539.
- Larsen, A. K., Escargueil, A. E., and Skladanowski, A. (2000). Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacology & therapeutics* *85*, 217-229.
- Lavrik, I. N., and Krammer, P. H. (2012). Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell death and differentiation* *19*, 36-41.
- Lefort, E. C., and Blay, J. (2013). Apigenin and its impact on gastrointestinal cancers. *Molecular nutrition & food research* *57*, 126-144.
- Letenneur, L., Proust-Lima, C., Le Gouge, A., Dartigues, J. F., and Barberger-Gateau, P. (2007). Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *American journal of epidemiology* *165*, 1364-1371.

Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323-331.

Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**, 27-42.

Lichtenstein, A. H., Appel, L. J., Brands, M., Carnethon, M., Daniels, S., Franch, H. A., Franklin, B., Kris-Etherton, P., Harris, W. S., Howard, B., *et al.* (2006). Summary of American Heart Association Diet and Lifestyle Recommendations revision 2006. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **26**, 2186-2191.

Liebermann, D. A., Hoffman, B., and Steinman, R. A. (1995). Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways. *Oncogene* **11**, 199-210.

Lin, H. S., Yue, B. D., and Ho, P. C. (2009). Determination of pterostilbene in rat plasma by a simple HPLC-UV method and its application in pre-clinical pharmacokinetic study. *Biomedical chromatography : BMC* **23**, 1308-1315.

Lin, V. C., Tsai, Y. C., Lin, J. N., Fan, L. L., Pan, M. H., Ho, C. T., Wu, J. Y., and Way, T. D. (2012). Activation of AMPK by pterostilbene suppresses lipogenesis and cell-cycle progression in p53 positive and negative human prostate cancer cells. *Journal of agricultural and food chemistry* **60**, 6399-6407.

Lin, Y., Shi, R., Wang, X., and Shen, H. M. (2008). Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Current cancer drug targets* **8**, 634-646.

Liu, J. D., Chen, S. H., Lin, C. L., Tsai, S. H., and Liang, Y. C. (2001). Inhibition of melanoma growth and metastasis by combination with (-)-epigallocatechin-3-gallate and dacarbazine in mice. *Journal of cellular biochemistry* **83**, 631-642.

Liu, Z. L., Wang, H., Liu, J., and Wang, Z. X. (2013). MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo- or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN. *Molecular and cellular biochemistry* **372**, 35-45.

Locatelli, G. A., Savio, M., Forti, L., Shevelev, I., Ramadan, K., Stivala, L. A., Vannini, V., Hubscher, U., Spadari, S., and Maga, G. (2005). Inhibition of mammalian DNA polymerases by resveratrol: mechanism and structural determinants. *The Biochemical journal* **389**, 259-268.

Lu, G., Xiao, H., You, H., Lin, Y., Jin, H., Snagaski, B., and Yang, C. S. (2008). Synergistic inhibition of lung tumorigenesis by a combination of green tea polyphenols and atorvastatin. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**, 4981-4988.

Mackeh, R., Perdiz, D., Lorin, S., Codogno, P., and Pous, C. (2013). Autophagy and microtubules - new story, old players. *Journal of cell science* **126**, 1071-1080.

- Macleod, K. (2000). Tumor suppressor genes. *Current opinion in genetics & development* 10, 81-93.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews Cancer* 9, 153-166.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* 79, 727-747.
- Manickam, M., Ramanathan, M., Jahromi, M. A., Chansouria, J. P., and Ray, A. B. (1997). Antihyperglycemic activity of phenolics from *Pterocarpus marsupium*. *Journal of natural products* 60, 609-610.
- Mao, T. K., van de Water, J., Keen, C. L., Schmitz, H. H., and Gershwin, M. E. (2002). Modulation of TNF-alpha secretion in peripheral blood mononuclear cells by cocoa flavanols and procyanidins. *Developmental immunology* 9, 135-141.
- Martinez Conesa, C., Vicente Ortega, V., Yanez Gascon, M. J., Alcaraz Banos, M., Canteras Jordana, M., Benavente-Garcia, O., and Castillo, J. (2005). Treatment of metastatic melanoma B16F10 by the flavonoids tangeretin, rutin, and diosmin. *Journal of agricultural and food chemistry* 53, 6791-6797.
- Mathur, S., Devaraj, S., Grundy, S. M., and Jialal, I. (2002). Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans. *The Journal of nutrition* 132, 3663-3667.
- Matic, I., Zizak, Z., Simonovic, M., Simonovic, B., Godevac, D., Savikin, K., and Juranic, Z. (2010). Cytotoxic effect of wine polyphenolic extracts and resveratrol against human carcinoma cells and normal peripheral blood mononuclear cells. *Journal of medicinal food* 13, 851-862.
- Maurya, R., Singh, R., Deepak, M., Handa, S. S., Yadav, P. P., and Mishra, P. K. (2004). Constituents of *Pterocarpus marsupium*: an ayurvedic crude drug. *Phytochemistry* 65, 915-920.
- McCormack, D., and McFadden, D. (2012). Pterostilbene and cancer: current review. *The Journal of surgical research* 173, e53-61.
- McCormack, D., Schneider, J., McDonald, D., and McFadden, D. (2011). The antiproliferative effects of pterostilbene on breast cancer in vitro are via inhibition of constitutive and leptin-induced Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation. *American journal of surgery* 202, 541-544.
- McCormack, D. E., Manna, P., McDonald, D., Tighe, S., Hanson, J., and McFadden, D. (2012). Genomic analysis of pterostilbene predicts its antiproliferative effects against pancreatic cancer in vitro and in vivo. *Journal of*

gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract *16*, 1136-1143.

Medina, P. P., Nolde, M., and Slack, F. J. (2010). OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* *467*, 86-90.

Meng, X. L., Yang, J. Y., Chen, G. L., Wang, L. H., Zhang, L. J., Wang, S., Li, J., and Wu, C. F. (2008). Effects of resveratrol and its derivatives on lipopolysaccharide-induced microglial activation and their structure-activity relationships. *Chemico-biological interactions* *174*, 51-59.

Menon, L. G., Kuttan, R., and Kuttan, G. (1995). Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds. *Cancer letters* *95*, 221-225.

Mikstacka, R., Przybylska, D., Rimando, A. M., and Baer-Dubowska, W. (2007). Inhibition of human recombinant cytochromes P450 CYP1A1 and CYP1B1 by trans-resveratrol methyl ethers. *Molecular nutrition & food research* *51*, 517-524.

Mitsiades, C. S., Davies, F. E., Laubach, J. P., Joshua, D., San Miguel, J., Anderson, K. C., and Richardson, P. G. (2011). Future directions of next-generation novel therapies, combination approaches, and the development of personalized medicine in myeloma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *29*, 1916-1923.

Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* *3*, 542-545.

Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell* *140*, 313-326.

Mocellin, S., Pooley, K. A., and Nitti, D. (2013). Telomerase and the search for the end of cancer. *Trends in molecular medicine* *19*, 125-133.

Moon, D., McCormack, D., McDonald, D., and McFadden, D. (2013). Pterostilbene induces mitochondrially derived apoptosis in breast cancer cells in vitro. *The Journal of surgical research* *180*, 208-215.

Morris, M. C., Evans, D. A., Tangney, C. C., Bienias, J. L., and Wilson, R. S. (2006). Associations of vegetable and fruit consumption with age-related cognitive change. *Neurology* *67*, 1370-1376.

Murota, K., and Terao, J. (2003). Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of biochemistry and biophysics* *417*, 12-17.

Murphy, K. J., Chronopoulos, A. K., Singh, I., Francis, M. A., Moriarty, H., Pike, M. J., Turner, A. H., Mann, N. J., and Sinclair, A. J. (2003). Dietary flavanols and

- procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *The American journal of clinical nutrition* *77*, 1466-1473.
- Murphy, M. E. (2013). The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis* *34*, 1181-1188.
- Mursu, J., Voutilainen, S., Nurmi, T., Tuomainen, T. P., Kurl, S., and Salonen, J. T. (2008). Flavonoid intake and the risk of ischaemic stroke and CVD mortality in middle-aged Finnish men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *The British journal of nutrition* *100*, 890-895.
- Naasani, I., Oh-Hashi, F., Oh-Hara, T., Feng, W. Y., Johnston, J., Chan, K., and Tsuruo, T. (2003). Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer research* *63*, 824-830.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature reviews Molecular cell biology* *10*, 458-467.
- Narisawa, T., and Fukaura, Y. (1993). A very low dose of green tea polyphenols in drinking water prevents N-methyl-N-nitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Japanese journal of cancer research : Gann* *84*, 1007-1009.
- Nautiyal, J., Banerjee, S., Kanwar, S. S., Yu, Y., Patel, B. B., Sarkar, F. H., and Majumdar, A. P. (2011). Curcumin enhances dasatinib-induced inhibition of growth and transformation of colon cancer cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* *128*, 951-961.
- Neuhouser, M. L. (2004). Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutrition and cancer* *50*, 1-7.
- Nichols, J. A., and Katiyar, S. K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of dermatological research* *302*, 71-83.
- Nihal, M., Ahsan, H., Siddiqui, I. A., Mukhtar, H., Ahmad, N., and Wood, G. S. (2009). (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) sensitizes melanoma cells to interferon induced growth inhibition in a mouse model of human melanoma. *Cell cycle* *8*, 2057-2063.
- Nurmi, T., Mursu, J., Heinonen, M., Nurmi, A., Hiltunen, R., and Voutilainen, S. (2009). Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans. *Journal of agricultural and food chemistry* *57*, 2274-2281.
- Nutakul, W., Sobers, H. S., Qiu, P., Dong, P., Decker, E. A., McClements, D. J., and Xiao, H. (2011). Inhibitory effects of resveratrol and pterostilbene on human colon cancer cells: a side-by-side comparison. *Journal of agricultural and food chemistry* *59*, 10964-10970.

- Nylandsted, J., Gyrd-Hansen, M., Danielewicz, A., Fehrenbacher, N., Lademann, U., Hoyer-Hansen, M., Weber, E., Multhoff, G., Rohde, M., and Jaattela, M. (2004). Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *The Journal of experimental medicine* 200, 425-435.
- O'Leary, K. A., de Pascual-Tereasa, S., Needs, P. W., Bao, Y. P., O'Brien, N. M., and Williamson, G. (2004). Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutation research* 551, 245-254.
- Ocker, M., and Hopfner, M. (2012). Apoptosis-modulating drugs for improved cancer therapy. *European surgical research Europäische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes* 48, 111-120.
- Ogasawara, M., Matsunaga, T., and Suzuki, H. (2007). Differential effects of antioxidants on the in vitro invasion, growth and lung metastasis of murine colon cancer cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* 30, 200-204.
- OMS (2013). Cardiovascular diseases (CVD`s). Fact sheet N°317. . In.
- Ono, K., Kim, S. O., and Han, J. (2003). Susceptibility of lysosomes to rupture is a determinant for plasma membrane disruption in tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Molecular and cellular biology* 23, 665-676.
- Opirari, A. W., Jr., Tan, L., Boitano, A. E., Sorenson, D. R., Aurora, A., and Liu, J. R. (2004). Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer research* 64, 696-703.
- Ortega, S., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1602, 73-87.
- Osawa, T. (2007). Nephroprotective and hepatoprotective effects of curcuminoids. *Advances in experimental medicine and biology* 595, 407-423.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B., and Bao, J. K. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* 45, 487-498.
- Pan, M. H., Chang, Y. H., Badmaev, V., Nagabhusanam, K., and Ho, C. T. (2007). Pterostilbene induces apoptosis and cell cycle arrest in human gastric carcinoma cells. *Journal of agricultural and food chemistry* 55, 7777-7785.
- Pan, M. H., Chang, Y. H., Tsai, M. L., Lai, C. S., Ho, S. Y., Badmaev, V., and Ho, C. T. (2008). Pterostilbene suppressed lipopolysaccharide-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 7502-7509.
- Pan, M. H., Chiou, Y. S., Chen, W. J., Wang, J. M., Badmaev, V., and Ho, C. T. (2009). Pterostilbene inhibited tumor invasion via suppressing multiple signal

transduction pathways in human hepatocellular carcinoma cells. *Carcinogenesis* 30, 1234-1242.

Pan, M. H., Lai, C. S., Wu, J. C., and Ho, C. T. (2011a). Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. *Molecular nutrition & food research* 55, 32-45.

Pan, M. H., Lin, Y. T., Lin, C. L., Wei, C. S., Ho, C. T., and Chen, W. J. (2011b). Suppression of Heregulin-beta1/HER2-Modulated Invasive and Aggressive Phenotype of Breast Carcinoma by Pterostilbene via Inhibition of Matrix Metalloproteinase-9, p38 Kinase Cascade and Akt Activation. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2011, 562187.

Pandey, K. B., and Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2, 270-278.

Papamichael, C., Karatzis, E., Karatzi, K., Aznaouridis, K., Papaioannou, T., Protogerou, A., Stamatiopoulos, K., Zampelas, A., Lekakis, J., and Mavrikakis, M. (2004). Red wine's antioxidants counteract acute endothelial dysfunction caused by cigarette smoking in healthy nonsmokers. *American heart journal* 147, E5.

Park, Y. K., Kim, J. S., and Kang, M. H. (2004). Concord grape juice supplementation reduces blood pressure in Korean hypertensive men: double-blind, placebo controlled intervention trial. *BioFactors* 22, 145-147.

Pasqualini, J. R. (2009). Estrogen sulfotransferases in breast and endometrial cancers. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1155, 88-98.

Pastore, S., Lulli, D., Fidanza, P., Potapovich, A. I., Kostyuk, V. A., De Luca, C., Mikhal'chik, E., and Korkina, L. G. (2012). Plant polyphenols regulate chemokine expression and tissue repair in human keratinocytes through interaction with cytoplasmic and nuclear components of epidermal growth factor receptor system. *Antioxidants & redox signaling* 16, 314-328.

Pastorkova, E., Zakova, T., Landa, P., Novakova, J., Vadlejch, J., and Kokoska, L. (2013). Growth inhibitory effect of grape phenolics against wine spoilage yeasts and acetic acid bacteria. *International journal of food microbiology* 161, 209-213.

Paul, B., Masih, I., Deopujari, J., and Charpentier, C. (1999). Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakhasava, an ayurvedic medicine from India. *Journal of ethnopharmacology* 68, 71-76.

Paul, S., Mizuno, C. S., Lee, H. J., Zheng, X., Chajkowisk, S., Rimoldi, J. M., Conney, A., Suh, N., and Rimando, A. M. (2010). In vitro and in vivo studies on stilbene analogs as potential treatment agents for colon cancer. *European journal of medicinal chemistry* 45, 3702-3708.

Pearson, D. A., Paglieroni, T. G., Rein, D., Wun, T., Schramm, D. D., Wang, J. F., Holt, R. R., Gosselin, R., Schmitz, H. H., and Keen, C. L. (2002). The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on ex vivo platelet function. *Thrombosis research* 106, 191-197.

Peltomaki, P. (2012). Mutations and epimutations in the origin of cancer. *Experimental cell research* 318, 299-310.

Perecko, T., Jancinova, V., Drabikova, K., Nosal, R., and Harmatha, J. (2008). Structure-efficiency relationship in derivatives of stilbene. Comparison of resveratrol, pinosylvin and pterostilbene. *Neuro endocrinology letters* 29, 802-805.

Pereira, M., Peleteiro, B., Capewell, S., Bennett, K., Azevedo, A., and Lunet, N. (2012). Changing patterns of cardiovascular diseases and cancer mortality in Portugal, 1980-2010. *BMC public health* 12, 1126.

Pérez de Castro, I., de Cárcer, G., Montoya, G., and Malumbres, M. (2008). Emerging cancer therapeutic opportunities by inhibiting mitotic kinases. *Current Opinion in Pharmacology* 8, 375-383.

Petersen, N. H., Kirkegaard, T., Olsen, O. D., and Jaattela, M. (2010). Connecting Hsp70, sphingolipid metabolism and lysosomal stability. *Cell cycle* 9, 2305-2309.

Peterson, J., Dwyer, J., Adlercreutz, H., Scalbert, A., Jacques, P., and McCullough, M. L. (2010). Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutrition reviews* 68, 571-603.

Pezet, R., and Pont, V. (1988). Identification of Pterostilbene in grape berries of *vitis vinifera*. *Plant physiology and biochemistry (Paris)* 26, 603-607.

Piskula, M. K., Yamakoshi, J., and Iwai, Y. (1999). Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS letters* 447, 287-291.

Polsky, D., and Cordon-Cardo, C. (2003). Oncogenes in melanoma. *Oncogene* 22, 3087-3091.

Popat, R., Plesner, T., Davies, F., Cook, G., Cook, M., Elliott, P., Jacobson, E., Gumbleton, T., Oakervee, H., and Cavenagh, J. (2013). A phase 2 study of SRT501 (resveratrol) with bortezomib for patients with relapsed and or refractory multiple myeloma. *British journal of haematology* 160, 714-717.

Porstmann, T., Ternynck, T., and Avrameas, S. (1985). Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *Journal of immunological methods* 82, 169-179.

Prakobwong, S., Gupta, S. C., Kim, J. H., Sung, B., Pinlaor, P., Hiraku, Y., Wongkham, S., Sripa, B., Pinlaor, S., and Aggarwal, B. B. (2011). Curcumin

suppresses proliferation and induces apoptosis in human biliary cancer cells through modulation of multiple cell signaling pathways. *Carcinogenesis* 32, 1372-1380.

Priego, S., Feddi, F., Ferrer, P., Mena, S., Benlloch, M., Ortega, A., Carretero, J., Obrador, E., Asensi, M., and Estrela, J. M. (2008). Natural polyphenols facilitate elimination of HT-29 colorectal cancer xenografts by chemoradiotherapy: a Bcl-2- and superoxide dismutase 2-dependent mechanism. *Molecular cancer therapeutics* 7, 3330-3342.

Pshoulia, F. H., Drosopoulos, K. G., Doubravska, L., Andera, L., and Pintzas, A. (2007). Quercetin enhances TRAIL-mediated apoptosis in colon cancer cells by inducing the accumulation of death receptors in lipid rafts. *Molecular cancer therapeutics* 6, 2591-2599.

Puppa, G., Sonzogni, A., Colombari, R., and Pelosi, G. (2010). TNM staging system of colorectal carcinoma: a critical appraisal of challenging issues. *Archives of pathology & laboratory medicine* 134, 837-852.

Qian, F., Wei, D., Zhang, Q., and Yang, S. (2005). Modulation of P-glycoprotein function and reversal of multidrug resistance by (-)-epigallocatechin gallate in human cancer cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 59, 64-69.

Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E. L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., *et al.* (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *The Journal of clinical investigation* 112, 1809-1820.

Raben, N., Shea, L., Hill, V., and Plotz, P. (2009). Monitoring autophagy in lysosomal storage disorders. *Methods in enzymology* 453, 417-449.

Rabbitnovich, P. (1993). Practical Considerations for DNA Content Cell Cycle Analysis. In *Clinical Flow Cytometry: Principles and Applications*, (Baltimore: W and W), pp. 292-296.

Rammer, P., Groth-Pedersen, L., Kirkegaard, T., Daugaard, M., Rytter, A., Szyniarowski, P., Hoyer-Hansen, M., Povlsen, L. K., Nylandsted, J., Larsen, J. E., and Jaattela, M. (2010). BAMLET activates a lysosomal cell death program in cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* 9, 24-32.

Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular nutrition & food research* 52, 507-526.

Rechner, A. R., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G. P., Moore, K. P., and Rice-Evans, C. A. (2002). The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free radical biology & medicine* 33, 220-235.

- Rein, D., Lotito, S., Holt, R. R., Keen, C. L., Schmitz, H. H., and Fraga, C. G. (2000a). Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *The Journal of nutrition* *130*, 2109S-2114S.
- Rein, D., Paglieroni, T. G., Wun, T., Pearson, D. A., Schmitz, H. H., Gosselin, R., and Keen, C. L. (2000b). Cocoa inhibits platelet activation and function. *The American journal of clinical nutrition* *72*, 30-35.
- Remsberg, C. M., Yanez, J. A., Ohgami, Y., Vega-Villa, K. R., Rimando, A. M., and Davies, N. M. (2008). Pharmacometrics of pterostilbene: preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity. *Phytotherapy research : PTR* *22*, 169-179.
- Renaud, S., and de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* *339*, 1523-1526.
- Repnik, U., Stoka, V., Turk, V., and Turk, B. (2012). Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochimica et biophysica acta* *1824*, 22-33.
- Riche, D. M., McEwen, C. L., Riche, K. D., Sherman, J. J., Wofford, M. R., Deschamp, D., and Griswold, M. (2013). Analysis of safety from a human clinical trial with pterostilbene. *Journal of toxicology* *2013*, 463595.
- Rimando, A. M., Cuendet, M., Desmarchelier, C., Mehta, R. G., Pezzuto, J. M., and Duke, S. O. (2002). Cancer chemopreventive and antioxidant activities of pterostilbene, a naturally occurring analogue of resveratrol. *Journal of agricultural and food chemistry* *50*, 3453-3457.
- Rimando, A. M., Kalt, W., Magee, J. B., Dewey, J., and Ballington, J. R. (2004). Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in vaccinium berries. *Journal of agricultural and food chemistry* *52*, 4713-4719.
- Rimando, A. M., Nagmani, R., Feller, D. R., and Yokoyama, W. (2005). Pterostilbene, a new agonist for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform, lowers plasma lipoproteins and cholesterol in hypercholesterolemic hamsters. *Journal of agricultural and food chemistry* *53*, 3403-3407.
- Rimando, A. M., and Suh, N. (2008). Biological/chemopreventive activity of stilbenes and their effect on colon cancer. *Planta medica* *74*, 1635-1643.
- Riviere, C., Pawlus, A. D., and Merillon, J. M. (2012). Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Natural product reports* *29*, 1317-1333.
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of agricultural and food chemistry* *51*, 2866-2887.

- Rohde, M., Daugaard, M., Jensen, M. H., Helin, K., Nylandsted, J., and Jaattela, M. (2005). Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes & development* 19, 570-582.
- Roset, R., Ortet, L., and Gil-Gomez, G. (2007). Role of Bcl-2 family members on apoptosis: what we have learned from knock-out mice. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 12, 4722-4730.
- Ruan, B.-F., Lu, X., Li, T.-T., Tang, J.-F., Wei, Y., Wang, X.-L., Zheng, S.-L., Yao, R.-S., and Zhu, H.-L. (2012). Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of resveratrol derivatives possessing curcumin moiety as potent antitubulin agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20, 1113-1121.
- Rubinsztein, D. C., Gestwicki, J. E., Murphy, L. O., and Klionsky, D. J. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nature reviews Drug discovery* 6, 304-312.
- Rudolf, E., Andelova, H., and Cervinka, M. (2007). Polyphenolic compounds in chemoprevention of colon cancer - targets and signaling pathways. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 7, 559-575.
- Ruiz, M. J., Fernandez, M., Pico, Y., Manes, J., Asensi, M., Carda, C., Asensio, G., and Estrela, J. M. (2009). Dietary administration of high doses of pterostilbene and quercetin to mice is not toxic. *Journal of agricultural and food chemistry* 57, 3180-3186.
- Sadik, C. D., Sies, H., and Schewe, T. (2003). Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochemical pharmacology* 65, 773-781.
- Saha, A., Kuzuhara, T., Echigo, N., Suganuma, M., and Fujiki, H. (2010). New role of (-)-epicatechin in enhancing the induction of growth inhibition and apoptosis in human lung cancer cells by curcumin. *Cancer prevention research* 3, 953-962.
- Saleem, M., Kim, H. J., Ali, M. S., and Lee, Y. S. (2005). An update on bioactive plant lignans. *Natural product reports* 22, 696-716.
- Sanchez-Cespedes, M. (2011). The role of LKB1 in lung cancer. *Familial cancer* 10, 447-453.
- Sarkar, F. H., and Li, Y. (2002). Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer metastasis reviews* 21, 265-280.
- Sawai, H., and Domae, N. (2011). Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells. *Biochemical and biophysical research communications* 411, 569-573.
- Sawyers, C. L. (2007). Cancer: mixing cocktails. *Nature* 449, 993-996.

- Sazuka, M., Murakami, S., Isemura, M., Satoh, K., and Nukiwa, T. (1995). Inhibitory effects of green tea infusion on in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse lung carcinoma cells. *Cancer letters* 98, 27-31.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition* 45, 287-306.
- Scalbert, A., and Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition* 130, 2073S-2085S.
- Schewe, T., Sadik, C., Klotz, L. O., Yoshimoto, T., Kuhn, H., and Sies, H. (2001). Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biological chemistry* 382, 1687-1696.
- Schneider, J. G., Alosi, J. A., McDonald, D. E., and McFadden, D. W. (2010). Pterostilbene inhibits lung cancer through induction of apoptosis. *The Journal of surgical research* 161, 18-22.
- Schneider, Y., Chabert, P., Stutzmann, J., Coelho, D., Fougerousse, A., Gosse, F., Launay, J. F., Brouillard, R., and Raul, F. (2003). Resveratrol analog (Z)-3,5,4'-trimethoxystilbene is a potent anti-mitotic drug inhibiting tubulin polymerization. *International journal of cancer Journal international du cancer* 107, 189-196.
- Schneppenheim, R., Budde, U., Dahlmann, N., Rautenberg, P. (1991). Luminography--a new, highly sensitive visualization method for electrophoresis. *Electrophoresis* 12, 367-372.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H. S., and Heber, D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry* 54, 9329-9339.
- Senthilkumar, K., Arunkumar, R., Elumalai, P., Sharmila, G., Gunadharini, D. N., Banudevi, S., Krishnamoorthy, G., Benson, C. S., and Arunakaran, J. (2011). Quercetin inhibits invasion, migration and signalling molecules involved in cell survival and proliferation of prostate cancer cell line (PC-3). *Cell biochemistry and function* 29, 87-95.
- Serrano, J., Puupponen-Pimia, R., Dauer, A., Aura, A. M., and Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular nutrition & food research* 53 Suppl 2, S310-329.
- Setchell, K. D., Brown, N. M., and Lydeking-Olsen, E. (2002). The clinical importance of the metabolite equol--a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *The Journal of nutrition* 132, 3577-3584.

- Setchell, K. D., Lawson, A. M., Borriello, S. P., Harkness, R., Gordon, H., Morgan, D. M., Kirk, D. N., Adlercreutz, H., Anderson, L. C., and Axelson, M. (1981). Lignan formation in man--microbial involvement and possible roles in relation to cancer. *Lancet* 2, 4-7.
- Shankar, S., Ganapathy, S., Chen, Q., and Srivastava, R. K. (2008). Curcumin sensitizes TRAIL-resistant xenografts: molecular mechanisms of apoptosis, metastasis and angiogenesis. *Molecular cancer* 7, 16.
- Shankar, S., Ganapathy, S., and Srivastava, R. K. (2007a). Green tea polyphenols: biology and therapeutic implications in cancer. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 12, 4881-4899.
- Shankar, S., Siddiqui, I., and Srivastava, R. K. (2007b). Molecular mechanisms of resveratrol (3,4,5-trihydroxy-trans-stilbene) and its interaction with TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in androgen-insensitive prostate cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry* 304, 273-285.
- Shao, X., Chen, X., Badmaev, V., Ho, C. T., and Sang, S. (2010). Structural identification of mouse urinary metabolites of pterostilbene using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 24, 1770-1778.
- Shay, J. W., and Roninson, I. B. (2004). Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* 23, 2919-2933.
- Shehzad, A., Wahid, F., and Lee, Y. S. (2010). Curcumin in cancer chemoprevention: molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials. *Archiv der Pharmazie* 343, 489-499.
- Shenouda, S. K., and Alahari, S. K. (2009). MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer metastasis reviews* 28, 369-378.
- Sherr, C. J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235-246.
- Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R., and Srinivas, P. S. (1998). Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta medica* 64, 353-356.
- Siddiqui, I. A., Malik, A., Adhami, V. M., Asim, M., Hafeez, B. B., Sarfaraz, S., and Mukhtar, H. (2008). Green tea polyphenol EGCG sensitizes human prostate carcinoma LNCaP cells to TRAIL-mediated apoptosis and synergistically inhibits biomarkers associated with angiogenesis and metastasis. *Oncogene* 27, 2055-2063.
- Siedlecka-Kroplewska, K., Jozwik, A., Kaszubowska, L., Kowalczyk, A., and Boguslawski, W. (2012). Pterostilbene induces cell cycle arrest and apoptosis in MOLT4 human leukemia cells. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish*

Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society 50, 574-580.

Sies, H. (2010). Polyphenols and health: update and perspectives. Archives of biochemistry and biophysics 501, 2-5.

Singh, M., Arseneault, M., Sanderson, T., Murthy, V., and Ramassamy, C. (2008). Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. Journal of agricultural and food chemistry 56, 4855-4873.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., and Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. Journal of the National Cancer Institute 82, 1107-1112.

Sliva, D. (2008). Suppression of cancer invasiveness by dietary compounds. Mini reviews in medicinal chemistry 8, 677-688.

Sok, D. E., Cui, H. S., and Kim, M. R. (2009). Isolation and bioactivities of furfuran type lignan compounds from edible plants. Recent patents on food, nutrition & agriculture 1, 87-95.

Sondak, V. K., Smalley, K. S., Kudchadkar, R., Gripon, S., and Kirkpatrick, P. (2011). Ipilimumab. Nature reviews Drug discovery 10, 411-412.

Sosa-Ortiz, A. L., Acosta-Castillo, I., and Prince, M. J. (2012). Epidemiology of dementias and Alzheimer's disease. Archives of medical research 43, 600-608.

Spath, E., and Schlager, J. (1940). Constituents of red sandalwood. II. Constitution of pterostilbene. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 73, 881-884.

Srivastava, S., and Grizzle, W. E. (2010). Biomarkers and the genetics of early neoplastic lesions. Cancer biomarkers : section A of Disease markers 9, 41-64.

Stein, J. H., Keevil, J. G., Wiebe, D. A., Aeschlimann, S., and Folts, J. D. (1999). Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. Circulation 100, 1050-1055.

Stevenson, D. E., and Hurst, R. D. (2007). Polyphenolic phytochemicals--just antioxidants or much more? Cellular and molecular life sciences : CMLS 64, 2900-2916.

Stivala, L. A., Savio, M., Carafoli, F., Perucca, P., Bianchi, L., Maga, G., Forti, L., Pagnoni, U. M., Albini, A., Prosperi, E., and Vannini, V. (2001). Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. The Journal of biological chemistry 276, 22586-22594.

- Stratton, M. R. (2011). Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science* 331, 1553-1558.
- Suh, N., Paul, S., Hao, X., Simi, B., Xiao, H., Rimando, A. M., and Reddy, B. S. (2007). Pterostilbene, an active constituent of blueberries, suppresses aberrant crypt foci formation in the azoxymethane-induced colon carcinogenesis model in rats. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 350-355.
- Sun, T., Chen, Q. Y., Wu, L. J., Yao, X. M., and Sun, X. J. (2012). Antitumor and antimetastatic activities of grape skin polyphenols in a murine model of breast cancer. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 50, 3462-3467.
- Talavera, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Lamaison, J. L., and Remesy, C. (2003). Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *The Journal of nutrition* 133, 4178-4182.
- Tanida, I. (2011). Autophagy basics. *Microbiology and immunology* 55, 1-11.
- Taubert, D., Roesen, R., Lehmann, C., Jung, N., and Schomig, E. (2007a). Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 298, 49-60.
- Taubert, D., Roesen, R., and Schomig, E. (2007b). Effect of cocoa and tea intake on blood pressure: a meta-analysis. *Archives of internal medicine* 167, 626-634.
- Tchoupe, J. R., Moreau, T., Gauthier, F., and Bieth, J. G. (1991). Photometric or fluorometric assay of cathepsin B, L and H and papain using substrates with an aminotrifluoromethylcoumarin leaving group. *Biochimica et biophysica acta* 1076, 149-151.
- Thomas, C. J., Rahier, N. J., and Hecht, S. M. (2004). Camptothecin: current perspectives. *Bioorg Med Chem* 12, 1585-1604.
- Tolomeo, M., Grimaudo, S., Di Cristina, A., Roberti, M., Pizzirani, D., Meli, M., Dusonchet, L., Gebbia, N., Abbadessa, V., Crosta, L., *et al.* (2005). Pterostilbene and 3'-hydroxypterostilbene are effective apoptosis-inducing agents in MDR and BCR-ABL-expressing leukemia cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 1709-1726.
- Tome-Carneiro, J., Gonzalvez, M., Larrosa, M., Yanez-Gascon, M. J., Garcia-Almagro, F. J., Ruiz-Ros, J. A., Tomas-Barberan, F. A., Garcia-Conesa, M. T., and Espin, J. C. (2013). Resveratrol in primary and secondary prevention of cardiovascular disease: a dietary and clinical perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1290, 37-51.

- Trincheri, N. F., Nicotra, G., Follo, C., Castino, R., and Isidoro, C. (2007). Resveratrol induces cell death in colorectal cancer cells by a novel pathway involving lysosomal cathepsin D. *Carcinogenesis* 28, 922-931.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2, 1231-1246.
- Ullah, M. F., and Khan, M. W. (2008). Food as medicine: potential therapeutic tendencies of plant derived polyphenolic compounds. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 9, 187-195.
- Upadhyay, M., Samal, J., Kandpal, M., Singh, O. V., and Vivekanandan, P. (2013). The Warburg effect: insights from the past decade. *Pharmacology & therapeutics* 137, 318-330.
- Vacek, J., Klejdus, B., Lojkova, L., and Kuban, V. (2008). Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones: a review. *Journal of separation science* 31, 2054-2067.
- Vaidyanathan, J. B., and Walle, T. (2003). Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-)epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 307, 745-752.
- Valls, J., Millan, S., Marti, M. P., Borrás, E., and Arola, L. (2009). Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of chromatography A* 1216, 7143-7172.
- van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., and Reutelingsperger, C. P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1-9.
- van Heemst, D., den Reijer, P. M., and Westendorp, R. G. (2007). Ageing or cancer: a review on the role of caretakers and gatekeepers. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 43, 2144-2152.
- Vanden Berghe, T., Grootjans, S., Goossens, V., Dondelinger, Y., Krysko, D. V., Takahashi, N., and Vandenebee, P. (2013). Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods* 61, 117-129.
- Vanden Berghe, T., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., Guerin, C. J., Brunk, U. T., Declercq, W., and Vandenebee, P. (2010). Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell death and differentiation* 17, 922-930.
- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J., and Spencer, J. P. (2010). Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients* 2, 1106-1131.

- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., and Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36, 131-149.
- Vichai, V., and Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols* 1, 1112-1116.
- Visioli, F., De La Lastra, C. A., Andres-Lacueva, C., Aviram, M., Calhau, C., Cassano, A., D'Archivio, M., Faria, A., Fave, G., Fogliano, V., *et al.* (2011). Polyphenols and human health: a prospectus. *Critical reviews in food science and nutrition* 51, 524-546.
- Voigt, W. (2005). Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods in molecular medicine* 110, 39-48.
- Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambros, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., *et al.* (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2257-2261.
- Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free radical biology & medicine* 36, 829-837.
- Wan, Y., Vinson, J. A., Etherton, T. D., Proch, J., Lazarus, S. A., and Kris-Etherton, P. M. (2001). Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *The American journal of clinical nutrition* 74, 596-602.
- Wang-Polagruto, J. F., Villablanca, A. C., Polagruto, J. A., Lee, L., Holt, R. R., Schrader, H. R., Ensunsa, J. L., Steinberg, F. M., Schmitz, H. H., and Keen, C. L. (2006). Chronic consumption of flavanol-rich cocoa improves endothelial function and decreases vascular cell adhesion molecule in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Journal of cardiovascular pharmacology* 47 Suppl 2, S177-186; discussion S206-179.
- Wang, L. X., Heredia, A., Song, H., Zhang, Z., Yu, B., Davis, C., and Redfield, R. (2004). Resveratrol glucuronides as the metabolites of resveratrol in humans: characterization, synthesis, and anti-HIV activity. *Journal of pharmaceutical sciences* 93, 2448-2457.
- Wang, Y., Ding, L., Wang, X., Zhang, J., Han, W., Feng, L., Sun, J., Jin, H., and Wang, X. J. (2012). Pterostilbene simultaneously induces apoptosis, cell cycle arrest and cyto-protective autophagy in breast cancer cells. *American journal of translational research* 4, 44-51.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.
- Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of general physiology* 8, 519-530.

Watson, J. D., and Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* *171*, 737-738.

Weinberg, R. A. (2007). *The biology of cancer: Garland science*, Taylor and Francis group, LLC).

Weisburg, J. H., Weissman, D. B., Sedaghat, T., and Babich, H. (2004). In vitro cytotoxicity of epigallocatechin gallate and tea extracts to cancerous and normal cells from the human oral cavity. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* *95*, 191-200.

Wesolowska, O., Wisniewski, J., Bielawska-Pohl, A., Paprocka, M., Duarte, N., Ferreira, M. J., Dus, D., and Michalak, K. (2010). Stilbenes as multidrug resistance modulators and apoptosis inducers in human adenocarcinoma cells. *Anticancer research* *30*, 4587-4593.

Widlansky, M. E., Hamburg, N. M., Anter, E., Holbrook, M., Kahn, D. F., Elliott, J. G., Keaney, J. F., Jr., and Vita, J. A. (2007). Acute EGCG supplementation reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Journal of the American College of Nutrition* *26*, 95-102.

Wietrzyk, J., Boratynski, J., Gryniewicz, G., Ryczynski, A., Radzikowski, C., and Opolski, A. (2001). Antiangiogenic and antitumour effects in vivo of genistein applied alone or combined with cyclophosphamide. *Anticancer research* *21*, 3893-3896.

Wortelboer, H. M., Usta, M., van der Velde, A. E., Boersma, M. G., Spenkelink, B., van Zanden, J. J., Rietjens, I. M., van Bladeren, P. J., and Cnubben, N. H. (2003). Interplay between MRP inhibition and metabolism of MRP inhibitors: the case of curcumin. *Chemical research in toxicology* *16*, 1642-1651.

Wu, B., Kulkarni, K., Basu, S., Zhang, S., and Hu, M. (2011). First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics. *Journal of pharmaceutical sciences* *100*, 3655-3681.

Wu, C. P., Calcagno, A. M., Hladky, S. B., Ambudkar, S. V., and Barrand, M. A. (2005). Modulatory effects of plant phenols on human multidrug-resistance proteins 1, 4 and 5 (ABCC1, 4 and 5). *The FEBS journal* *272*, 4725-4740.

Wu, W., and Zhao, S. (2013). Metabolic changes in cancer: beyond the Warburg effect. *Acta biochimica et biophysica Sinica* *45*, 18-26.

Yamane, T., Hagiwara, N., Tateishi, M., Akachi, S., Kim, M., Okuzumi, J., Kitao, Y., Inagake, M., Kuwata, K., and Takahashi, T. (1991). Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rat by green tea polyphenol fraction. *Japanese journal of cancer research : Gann* *82*, 1336-1339.

Yan, C., and Han, R. (1997). Suppression of adhesion-induced protein tyrosine phosphorylation decreases invasive and metastatic potentials of B16-BL6

melanoma cells by protein tyrosine kinase inhibitor genistein. *Invasion & metastasis* 17, 189-198.

Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T., and Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual review of nutrition* 21, 381-406.

Yang, C. S., Maliakal, P., and Meng, X. (2002). Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annual review of pharmacology and toxicology* 42, 25-54.

Yang, C. S., Yang, G. Y., Landau, J. M., Kim, S., and Liao, J. (1998). Tea and tea polyphenols inhibit cell hyperproliferation, lung tumorigenesis, and tumor progression. *Experimental lung research* 24, 629-639.

Yang, G., Wang, Z. Y., Kim, S., Liao, J., Seril, D. N., Chen, X., Smith, T. J., and Yang, C. S. (1997). Characterization of early pulmonary hyperproliferation and tumor progression and their inhibition by black tea in a 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis model with A/J mice. *Cancer research* 57, 1889-1894.

Yang, H., Landis-Piowar, K. R., Chen, D., Milacic, V., and Dou, Q. P. (2008). Natural compounds with proteasome inhibitory activity for cancer prevention and treatment. *Current protein & peptide science* 9, 227-239.

Yang, Y. P., Chang, Y. L., Huang, P. I., Chiou, G. Y., Tseng, L. M., Chiou, S. H., Chen, M. H., Chen, M. T., Shih, Y. H., Chang, C. H., *et al.* (2012). Resveratrol suppresses tumorigenicity and enhances radiosensitivity in primary glioblastoma tumor initiating cells by inhibiting the STAT3 axis. *Journal of cellular physiology* 227, 976-993.

Yang, Z. J., Chee, C. E., Huang, S., and Sinicrope, F. (2011a). Autophagy modulation for cancer therapy. *Cancer biology & therapy* 11, 169-176.

Yang, Z. J., Chee, C. E., Huang, S., and Sinicrope, F. A. (2011b). The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Molecular cancer therapeutics* 10, 1533-1541.

Yasuda, Y., Kageyama, T., Akamine, A., Shibata, M., Kominami, E., Uchiyama, Y., and Yamamoto, K. (1999). Characterization of new fluorogenic substrates for the rapid and sensitive assay of cathepsin E and cathepsin D. *Journal of biochemistry* 125, 1137-1143.

Yoshizumi, M., Tsuchiya, K., Suzaki, Y., Kirima, K., Kyaw, M., Moon, J. H., Terao, J., and Tamaki, T. (2002). Quercetin glucuronide prevents VSMC hypertrophy by angiotensin II via the inhibition of JNK and AP-1 signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 293, 1458-1465.

Yuan, J. H., Li, Y. Q., and Yang, X. Y. (2007). Inhibition of epigallocatechin gallate on orthotopic colon cancer by upregulating the Nrf2-UGT1A signal pathway in nude mice. *Pharmacology* 80, 269-278.

Yuan, Z. P., Chen, L. J., Fan, L. Y., Tang, M. H., Yang, G. L., Yang, H. S., Du, X. B., Wang, G. Q., Yao, W. X., Zhao, Q. M., *et al.* (2006). Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 3193-3199.

Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., and Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology* 302, 1-12.

Zhang, S. F., Rolfe, P., and Wickramasinghe, Y. A. (1994). Evaluation of fluorescent dyes for in vivo pH measurement. *Medical & biological engineering & computing* 32, 224-227.

Zhang, Y., Seeram, N. P., Lee, R., Feng, L., and Heber, D. (2008). Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 670-675.

Zhou, S., Zhao, L., Kuang, M., Zhang, B., Liang, Z., Yi, T., Wei, Y., and Zhao, X. (2012). Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Cancer letters* 323, 115-127.

