

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**



**INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR LOS AGENTES
ANTITUMORALES MITOCONDRIOTÓXICOS
TRIÓXIDO DE ARSÉNICO Y LONIDAMINA Y SU
MODULACIÓN POR AGENTES FENÓLICOS
NATURALES**

Memoria para optar al grado de doctor en Biología

**Director: Patricio Aller Tresguerres
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)**



**GLORIA PILAR SIMÓN GARCÍA DE MORA
2013**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Genética



**INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR LOS AGENTES
ANTITUMORALES MITOCONDRIOTÓXICOS
TRIÓXIDO DE ARSÉNICO Y LONIDAMINA Y SU
MODULACIÓN POR AGENTES FENÓLICOS
NATURALES**

Memoria presentada por

GLORIA PILAR SIMÓN GARCÍA DE MORA

Para optar al grado de doctor en Biología

Realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas
Bajo la dirección del Dr. Patricio Aller Tresguerres



VºBº del Director de Tesis

VºBº de la Doctoranda

Patricio Aller Tresguerres

Gloria Pilar Simón García de Mora



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

D. Patricio Aller Tresguerres, Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en el Departamento de Medicina Celular y Molecular, del Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC (Madrid).

CERTIFICA

Que **Dña. Gloria Pilar Simón García de Mora**, Licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el proyecto correspondiente a su Tesis Doctoral que lleva por título "**Inducción de apoptosis por los agentes antitumorales mitocondriotóxicos trióxido de arsénico y Ionidamina y su modulación por agentes fenólicos naturales**", y que reúne los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Genética de la Universidad Complutense de Madrid.

El Director de la Tesis

Patricio Aller Tresguerres

Esta Tesis Doctoral se ha podido realizar gracias a la financiación concedida por Dirección General de Investigación, Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica, Ministerio de Economía y Competitividad, Proyecto SAF2010-20256, así como el contrato de personal investigador de apoyo concedido por la Comunidad de Madrid (2008-2012).

A mi madre

“La experiencia más bella que podemos tener es sentir el misterio. En esa emoción fundamental se han basado el verdadero arte y la verdadera ciencia. Esa experiencia engendró también la religión, percibir que tras lo que podemos experimentar se oculta algo inalcanzable a nuestro espíritu, la razón más profunda y la belleza más radical, que sólo nos son accesibles de modo indirecto”

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer al Dr. Patricio Aller por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su laboratorio del CIB. Gracias por tus enseñanzas y apoyo. Agradecer a todas las personas del laboratorio 148 que han compartido conmigo estos años. A Elena, gracias por enseñarme tantas técnicas y estar a mi lado. Gracias Consuelo por compartir tantas charlas interesantes sobre la ciencia y la vida. Gracias a mis compañeros de laboratorio Yolanda, Donna y Gonzalo.

En estos momentos me acuerdo de todas aquellas personas y amig@s que he hecho a lo largo de estos 6 años en el CIB.

Gracias a Clara, Lola, Ruth, Daniel y Adriana por vuestra compañía y conversaciones agradables en los ratos de la comida.

Mi amiga Felicia, por los buenos momentos compartidos en el CIB y fuera de él.

Inma, que nos conocemos desde la Facultad.

Mariano, muchísimas gracias por las ayudas "informáticas" sobre mi tesis, me allanaste el camino de maquetado final de la tesis.

Nuria, Rocío, Pilar y Marga, sois todas extraordinarias.

Chiara, Santi y Peter, del laboratorio contigo.

Virginia, Ana Cris, Elisa y Lu de los "Carmelos". Benet, Eli, Cristina y María, que nos lo pasamos muy bien en un congreso de la SEBBM de Barcelona.

Gracias Begoña por las clases tan relajantes de yoga.

Gracias Davinia.

No quiero olvidarme de todo el personal de los servicios del CIB que me han ayudado. Me acuerdo especialmente de Olvido de la Biblioteca, eres fantástica como persona y como trabajadora. Gracias María Jesús. Pedro y Fernando de citometría, Blanca y Virginia de cultivos celulares, Mario de Informática.

Han sido años fantásticos en el CIB, con un recuerdo imborrable de un viaje a EE.UU en 2010 que realicé con un grupo del CSIC, o un curso muy aprovechado de Astronomía en Santander. Y las divertidísimas fiestas del CIB de junio...cuántos bailes y juegos compartidos.

En estos años ha sido fundamental el apoyo de amigas. En especial a mis amigas de la parroquia Buen Suceso: María, Marisol, Ana, Irene, Vanessa, Adriana, Montse, Mari Carmen, Sofía. Gracias por vuestra compañía y por hacer de los miércoles un soplo de energía en la travesía de la semana.

Otras personas también han puesto su granito de arena ayudándome: Laura, Amaya, Eva, María...

Por último, mi familia ha sido un gran apoyo en mi tesis, en especial mi madre (que cuando empecé la tesis aún vivías pero sé que sigues conmigo y me cuidas desde el cielo), mi padre, mi tía Gloria, mi abuela Pilar, mi abuelo Miguel...

A TOD@S VOSOTR@S: ¡MUCHAS GRACIAS!

ABSTRACT

Abstract

Introduction

Mitochondria-targeting drugs (“mitochondriotoxics”, or “mitocans”) represent a family of anticancer agents the toxicity of which is caused by direct interaction with mitochondrial structures (e.g., permeability transition pore (mPTP), respiratory chain complexes, mtDNA...etc). This enables these agents to overcome certain forms of drug resistance arising when other chemotherapeutic agents (e.g., DNA-targeting drugs) are used. In the present work we have employed arsenic trioxide (ATO, Trisenox) and lonidamine, the main (but not only) target of them being some proteins which form part or are associated to the mPTP – adenine nucleotide translocator and/or hexokinase II-. ATO is clinically used against acute promyelocytic leukaemia, where it promotes growth arrest and terminal differentiation due to disruption of the oncogenic fusion protein PML-RAR α , but is also potentially useful against other haematologic diseases *via* apoptosis induction. Lonidamine, formerly used as anti-spermiogenic agent, is a safe, non toxic agent incorporated in clinical protocols against solid tumours, but also potentially useful in leukaemia. Nevertheless the efficacy of these agents is normally low in monotherapy, and hence the generation of sensitizing strategies is required.

Natural polyphenols represent a family of hundreds of compounds present in the vegetal kingdom. Upon long-term administration at low doses (e.g., in the diet) polyphenols are antioxidants and protective agents, preventing inflammation, aging, and cancer initiation and progression. On the other hand, at high but still pharmacologically achievable concentrations, polyphenols may in some circumstance behave as pro-oxidants, causing cell cycle impairment, cell death, and elimination of mature tumours. Nonetheless, because of limitations in dose availability, rather than used as single agents polyphenols are better valuable as radio-or chemosensitizers in combination with other chemotherapeutic agents. The utility has been mainly demonstrated in solid tumour-derived cell models and in combination with classic DNA-damaging agents, but there is less information in leukaemia cell models, and almost no information in combination with the above-mentioned mitochondriotoxic drugs.

Apoptosis and necrosis are the two classic forms of cell death. Necrosis is a non-regulated form of death derived from the rapid loss of cell homeostasis, upon severe cell injury. Apoptosis, is a regulated form of death, which may be executed following two

Abstract

pathways, namely the death-receptor (“extrinsic”) pathway, and the mitochondrial (“intrinsic”) pathway. The later one is normally produced by most anti-cancer agents, and likely by mitochondria-targeting drugs. The intrinsic pathway is initiated by the permeabilization of the outer mitochondria membrane (mOMP), the release of mitochondria-located apoptogenic factors, ending in the activation of the caspase-9/caspase-3 pathway. It is normally associated to pore opening at the mitochondrial inner membrane (mIMP), and hence to dissipation of intermembrane potential ($\Delta\Psi_m$). In addition, it is regulated by multiple signalling factors, including: (a) Oxidative stress, which, depending on the intensity, may cause apoptosis or necrosis, and either produce cell death *per se* or facilitate the generation of cell death by other agents. Oxidative stress may be evidenced by the over-accumulation of reactive oxygen species (ROS), and/or the loss of anti-oxidant factors (e.g., reduced glutathione, GSH). (b) Alterations in protein kinase signalling pathways, such as the oxidant-sensitive, normally pro-apoptotic, p38-MAPK and JNK kinases, or the normally defensive MEK/ERK and PI3K/Akt pathways. (c) Alterations in the activity of the NF- κ B transcription factor, which in general operates as a defensive factor. (d) Alterations in the expression heat-shock proteins (HSPs), a complex family of chaperones, some of which (as Hsp-70) functioning as an anti-apoptotic factors.

Objectives

The general purpose of this thesis was to investigate the capacity of selected polyphenols, with particular interest on curcumin and resveratrol, to potentiate the cyto-reductive capacity of ATO and lonidamine. For this purpose we analyze cell cycle, cell death (necrosis and apoptosis), mitochondrial dysfunction (mIMP, apoptogenic protein release) and some regulatory factors (oxidative stress, protein kinases, NF- κ B, Hsp-70) which might explain the apoptotic response. Both the mitochondriotoxic drugs and phenolic agents will be normally used at sub-cytotoxic concentrations, within or close to the range of pharmacologically useful doses. As cell models we use the human acute myeloid (promonocytic) leukaemia U-937 cell line, and for comparison other myeloid and lymphoid leukemia cells. Also for comparison, some DNA-targeting drugs will be used instead of the mitochondriotoxic drugs.

Abstract

Results and Discussion

The obtained results indicate that:

1.- Co-treatment for 24 h with curcumin (7,5 μM), resveratrol (25-50 μM), genistein (50 μM), quercetin (25 μM), naringenin (100 μM), gallic acid (20 μM) and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (50 μM), potentiate in more than additive manner the apoptosis-inducing capacity of ATO (2 μM) and lonidamine (50-100 μM) in U-937 cells, as demonstrated by chromatin condensation/fragmentation (evidenced by microscopy), loss of DNA content (sub-G₁ DNA content, measured by propidium iodide staining and flow cytometry), and occasionally by double annexin V – propidium iodide staining and flow cytometry, and by demonstration of caspase dependence (death prevention by the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk). With the exception of genistein and resveratrol, which cause G₂/M and S phase arrest, respectively, at the used concentrations neither the polyphenols or the mitochondriotoxic agents cause significant cell cycle phase alterations, as demonstrated by propidium iodide staining and flow cytometry.

2.- Studies using other cell models or other anti-tumour agents demonstrate some degree of cell line- and anti-cancer drug specificity in the action of curcumin and resveratrol. Thus the polyphenols efficaciously potentiated ATO- and lonidamine-provoked apoptosis in acute myeloid HL-60 and acute promyelocytic NB4 leukaemia cells, but in general the apoptotic efficacy was low or even null in THP-1 promonocytic, K562 chronic myeloid, and Jurkat lymphocytic leukaemia cells. In addition, under the here assayed conditions curcumin and resveratrol were unable to potentiate the lethality of DNA-damaging drugs such as cisplatin, cytarabine and etoposide.

3.- Curcumin and resveratrol cause mitochondrial dysfunction as revealed by $\Delta\Psi\text{m}$ dissipation, measured by the use of cationic fluorescent agents (rhodamine-123, DiI C1(5)) and flow cytometry. Nonetheless the time-course of these changes and the co-administration of cyclosporine A or z-VAD-fmk revealed that $\Delta\Psi\text{m}$ dissipation is a late response, concomitant with apoptosis execution, rather than a regulatory event.

In addition, by means of cell lysis, occasional sub-cellular fractionation, and immunoblot (“Western blot”) analysis, it was demonstrated that curcumin and

Abstract

resveratrol in conjunction with ATO and lonidamine activated the typical intrinsic executioner pathway, as evidenced by cytochrome *c* and Omi/HtrA2 release from mitochondria, Bax and Bid activation (measured by migration to mitochondria membrane or cleavage, respectively), XIAP degradation, and cleavage/activation of caspase-9/-3. In addition the treatments cause cleavage/activation of caspase-8, probably as a secondary consequence of mitochondrial pathway activation.

3.- The pro-apoptotic effect of the assayed polyphenols is mediated by moderate oxidative stress generation. On the one hand, genistein and curcumin caused ROS over-accumulation, as demonstrated by staining with the pan-ROS sensitive H₂DCFDA or anion superoxide-sensitive dihydroethidium (DHE) fluorescent probes and flow cytometry. Moreover, the apoptotic action of the polyphenols plus with ATO or lonidamine was decreased by co-treatment with selected antioxidant or ROS scavenging agents, such as N-acetyl-L-cysteine (NAC), butylhydroxyanisole (BHA) or Mn-TBAP. Other agents, such as quercetin or as resveratrol or curcumin plus ATO, cause a decrease in the intracellular content of GSH, demonstrated by luminometry using the GSH-sensitive fluorescent probe monochlorobimane. Of note, lonidamine and specially ATO are oxidation-sensitive drugs (i.e., drugs with higher toxicity under pro-oxidant environments), as demonstrated by increased lethality when co-treated with the specific GSH-depleting agent buthionine sulfoximine or with low H₂O₂ concentrations.

4.- The analysis of protein kinase signalling pathways was carried out by Western blot, using antibodies recognizing phosphorylated/active and total protein forms. When apparently important, the relevance of the observed modifications was investigated using pharmacologic kinase inhibitors. The results may be summarized as follows: (a) Resveratrol, either alone or in combination with ATO and lonidamine increases p38-MAPK phosphorylation, but decreases JNK activation. (b) Curcumin causes Akt inactivation. The use of the PI3K/Akt inhibitor LY294002 indicates that Akt plays a defensive role, and hence its inactivation facilitates the pro-apoptotic action of the polyphenol. (c) Both curcumin and resveratrol cause ERK activation. Co-treatment with the MEK/ERK inhibitors PD98059 and U0126 either mimics or enhances the capacity of the polyphenols to potentiate ATO and lonidamine toxicity. Hence ERK plays a defensive role, and hence its activation by polyphenols serves to attenuate excessive treatment toxicity.

Abstract

5.- Migration of p65-NF- κ B to the nucleus, as determined by cell fractionation and Western blot using nuclear extracts, and NF- κ B binding to the DNA consensus sequence, as measured by “in gel retardation assay” (EMSA), indicate that within the here used time-periods (16-24 h) curcumin does not affect transcription factor activation. The resveratrol in combination with lonidamine decreases nuclear migration of NF- κ B which, due to its defensive properties, may contribute to the increased toxicity of the combined treatment.

6. - It was observed that ATO increases Hsp-70 expression, as demonstrated by Western blot assay, and this increase is greatly reduced by co-treatment with curcumin or resveratrol. Due to the well-proved defensive property of Hsp-70, this could contribute to the increased toxicity of ATO plus polyphenol combinations.

Conclusions

In summary the present work demonstrates that several dietary phenolic agents, used at low toxic and pharmacologically attainable concentrations, efficaciously cooperate with the anti-tumour agents ATO and lonidamine to cause apoptosis in acute myeloid leukaemia cells lines, a response which is both cell-type and drug-type specific. Apoptosis is associated to mitochondrial dysfunction, as manifested by decreased transmembrane potential, and takes place along the intrinsic executioner pathway. At the used concentrations polyphenols cause moderate oxidative stress, as evidenced either by ROS over-accumulation or decreased intracellular GSH level, and these effects may serve to potentiate the action of lonidamine and specially ATO, which are oxidant-sensitive drugs. The polyphenols cause specific alterations in protein kinase activation pathways, especially PI3K/Akt (down-regulation) and MEK/ERK (up-regulation) which, due to their defensive character, may serve to increase or attenuate the toxicity of combined treatments. Finally the alterations in other defensive factors, namely down-regulation of NF- κ B activity by resveratrol plus lonidamine, or abrogation of ATO-provoked Hsp-70 induction by curcumin and resveratrol, also contribute to explain the increased apoptotic efficacy of the combined treatments.

While this work only represents a pre-clinical, *in vitro* assay, the results might ultimately be useful to design appropriate protocols aimed at increasing the clinical efficacy of ATO and lonidamine as anti-tumour drugs.

ABREVIATURAS Y TÉRMINOS ANGLOSAJONES**IX-XIV**

INTRODUCCIÓN	1
1. - MODELOS CELULARES	3
1.1.- LÍNEA CELULAR PROMONOCÍTICA U-937	3
1.2.- OTROS MODELOS CELULARES UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO	3
1.2.1.- LÍNEA CELULAR PROMIELOCÍTICA HL-60	3
1.2.2.- LÍNEA CELULAR PROMIELOCÍTICA NB4	4
1.2.3.- LÍNEA CELULAR PROMONOCÍTICA THP-1	4
1.2.4.- LÍNEA CELULAR ERITROBLÁSTICA K562	5
1.2.5.- LÍNEA CELULAR LINFOIDE JURKAT	5
1.2.6.- LÍNEA CELULAR LINFOIDE RPMI 8866	5
2.- AGENTES QUÍMICOS ANTITUMORALES	5
2.1.- AGENTES MITOCONDRIOTÓXICOS	5
2.1.1.- TRIÓXIDO DE ARSÉNICO	6
2.1.2.- LONIDAMINA	10
2.2.- DROGAS CON DIANA EN EL DNA	11
3.- POLIFENOLES	13
3.1.- GENERALIDADES	13
3.2.- EFECTOS BIOLÓGICOS	13
3.3.- CLASIFICACIÓN	15
3.3.1.- ÁCIDOS FENÓLICOS	15
3.3.2.- ESTILBENOS	16
3.3.3.- LIGNANOS	16
3.3.4.- FLAVONOIDES	17
- Genisteína	17
- Quercetina	19
- Epigallocatequina-3-galato (EGCG)	20
- Naringenina	21
3.3.5.- CURCUMINOIDES	21
3.3.6.- AMIDAS POLIFENÓLICAS	21
3.3.7.- OTROS POLIFENOLES	21
3.4.- CURCUMINA Y RESVERATROL	21
3.4.1.- CURCUMINA	22
Acción a nivel celular y molecular	22

Otros efectos biológicos de la curcumina	23
Efecto antitumoral de la curcumina	24
3.4.2.- RESVERATROL	25
Acción a nivel celular y molecular	25
Otros efectos biológicos del resveratrol	26
Efecto antitumoral del resveratrol	26
4.- PROCESOS CELULARES	27
4.1.- MUERTE CELULAR	27
4.1.1.- GENERALIDADES	27
4.1.2.- APOPTOSIS	28
Vías de apoptosis	30
<i>Familia de las proteínas Bcl-2</i>	32
<i>Familia de IAPs: XIAP</i>	32
<i>Caspasas</i>	33
4.1.3.- NECROSIS	34
4.2.- MITOCONDRIA Y MUERTE CELULAR	36
4.2.1.- GENERALIDADES	36
4.2.2.- TEORÍAS SOBRE LA APERTURA MITOCONDRIAL	36
A.- Poro de permeabilidad mitocondrial. Regulación de su apertura	38
B.- Proteínas de la familia Bcl-2	39
4.3.- PROTEÍNAS HEAT SHOCK	42
4.3.1.- GENERALIDADES	42
4.3.2.- CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE ESTRÉS	42
4.3.3.- FAMILIA HSP-70	42
A. Regulación de la expresión de Hsp-70	43
B. Hsp-70 en apoptosis	43
4.4.- CICLO DE PROLIFERACIÓN CELULAR Y SU REGULACIÓN	44
5.- SEÑALIZACIÓN CELULAR	46
5.1.- ESTRÉS OXIDATIVO	46
5.1.1.- GENERALIDADES	46
5.1.2.- PAPEL FISIOLÓGICO DE LOS ROS	47
5.1.3.- EFECTOS DELETÉREOS DE LOS ROS	47
5.1.4.- GENERACIÓN DE MUERTE CELULAR POR ROS	48
5.1.5.- MECANISMOS DE DEFENSA CONTRA EL ESTRÉS OXIDATIVO	49
A.- Detoxificación.	49
B.- Sistema antioxidante	49
5.1.6.- ROS Y CÁNCER	51
5.2.- PROTEÍNAS QUINASAS	51
5.2.1.- MAP-QUINASAS	51

A) ERK 1/2 (p42/p44)	53
B) JNK/SAPK	53
C) p38	54
5.2.2.- RUTA PI3K/AKT	55
5.3.- FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF-κB	56

OBJETIVOS 61

MATERIALES Y MÉTODOS 63

MATERIALES 65

■ MATERIAL BIOLÓGICO	65
1. LÍNEAS CELULARES	65
2. CONDICIONES DE CULTIVO CELULAR	65
■ MATERIAL NO BIOLÓGICO	66
1. AGENTES Y TRATAMIENTOS CELULARES	66
2. MATERIAL FOTOGRÁFICO Y DE AUTORADIOGRAFÍA	68

MÉTODOS 68

■ ANÁLISIS DE PARÁMETROS CELULARES	68
1.- DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	68
2.- MEDIDA DE CRECIMIENTO CELULAR Y VIABILIDAD	69
3.- DETERMINACIÓN DE LA MUERTE CELULAR	69
3.1.- APOPTOSIS	69
3.1.1.- Tinción del DNA con DAPI fluorescente	69
3.1.2.- Tinción del DNA con yoduro de propidio	70
3.1.3.- Marcaje con anexina V	71
3.2.- NECROSIS	71
3.2.1.- Incorporación de azul de tripano	71
3.2.2.- Incorporación de yoduro de propidio	72
4.- DETERMINACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL	72
4.1.- Medida de la apertura del poro mitocondrial	72
4.2.- Medida del potencial de membrana mitocondrial	73
5.- MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	74
5.1.- Medida de la producción de peróxido de hidrógeno	74
5.2.- Medida de la producción de anión superóxido	74
6.- MEDIDA DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE GLUTATIÓN	75

■ ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL DE PROTEÍNAS	75
1.- INMUNOBLOT (“WESTERN” BLOT)	76
1.1.- Extracción de lisados totales de proteínas	76
1.2.- Extracción de proteínas citosólicas y de proteínas de membrana	76
1.3.- Extracción de proteínas nucleares	77
1.4.- Western blot	78
1.5.- Anticuerpos	79
a) Primarios	79
b) Secundarios	80
2.- ENSAYOS DE RETARDO DE MOVILIDAD DE COMPLEJOS DNA-PROTEÍNA	80
2.1.-Extracción de proteínas nucleares	80
2.2.-Oligonucleótidos	80
2.3.- Reacción de unión y electroforesis	81
OTROS MÉTODOS	81
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	81
DENSITOMETRADO	81
ENDNOTE	82
RESULTADOS	83
MÉTODOS PARA MEDIR APOPTOSIS Y NECROSIS	85
BLOQUE I. ACCIÓN CITOTÓXICA DE POLIFENOLES Y DE DROGAS CON DIANA MITOCONDRIAL	88
1.- APOPTOSIS	88
ACCIÓN DE GENISTEÍNA	88
ACCIÓN DE QUERCETINA	89
ACCIÓN DE EPIGALOCATEQUINA-3- GALATO (EGCG)	89
ACCIÓN DEL ÁCIDO GÁLICO	91
ACCIÓN DE NARINGENINA	92
ACCIÓN DE CURCUMINA	93
ACCIÓN DE RESVERATROL	93
2.- NECROSIS	94
3.- CICLO CELULAR	94

BLOQUE II. ACCIÓN COMPARATIVA DE CURCUMINA Y RESVERATROL	97
2.1.- APOPTOSIS, NECROSIS Y CITOTOXICIDAD	97
1.- APOPTOSIS	97
A. Acción de la curcumina	97
B. Acción del resveratrol	101
2.- NECROSIS	104
3.- CITOTOXICIDAD	104
2.2.- CICLO CELULAR	105
2.3.- ESTUDIO DE LA APOPTOSIS EN OTROS MODELOS CELULARES	107
A.- RESULTADOS CON CURCUMINA	108
B.- RESULTADOS CON RESVERATROL	111
2.4.- EFECTO DE CURCUMINA Y RESVERATROL EN COMBINACIÓN CON OTRAS DROGAS ANTITUMORALES	114
A.- RESULTADOS CON CURCUMINA	115
B.- RESULTADOS CON RESVERATROL	118
2.5.- EVENTOS MITOCONDRIALES	120
1.- PROTEÍNAS DE LA VÍA MITOCONDRIAL	120
1.1.- Curcumina	121
1.2.- RESVERATROL	122
2.- POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	125
2.1.- Curcumina	126
2.2.- Resveratrol	129
a) DiI _{C1} (5)	129
b) Rodamina 123	131
2.6.- ESTRÉS OXIDATIVO	135
1.- PRODUCCIÓN DE ROS Y EFECTO DE ANTIOXIDANTES	135
1.1.- Resultados de producción de ROS con curcumina	138
1.2.- Resultados de producción de ROS con resveratrol	142
2.- NIVELES DE GSH INTRACELULAR Y EFECTO DE GSH-OET	143
2.1.- Resultados con curcumina	144
2.2.- Resultados con resveratrol	146
3.- ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS DE OXIDACIÓN CON FLAVONOIDES	147
2.7.- MODULACIÓN DE PROTEÍNAS QUINASAS Y EFECTOS DE SUS INHIBIDORES	148
A) EFECTOS DE CURCUMINA	148
B) EFECTOS DEL RESVERATROL	153

Indice

2.8.- NF- κ B	157
2.9.- PROTEÍNAS Hsp	159
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>161</u>
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>187</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>191</u>
<u>PUBLICACIONES</u>	<u>241</u>

ABREVIATURAS Y
TÉRMINOS
ANGLOSAJONES

Abreviaturas y términos anglosajones

ADP	Adenosin difosfato
AIF	Factor Inductor de la Apoptosis (<i>Apoptosis Inducing Factor</i>)
Akt	También conocida por proteína quinasa B (PKBs)
AML	Leucemia mieloide aguda
AMPK	Proteína quinasa activa por monofosfato de adenina
ANT	Translocador de nucleótidos de adenina (<i>Adenine Nucleotide Translocator</i>)
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
AP-1	Proteína activadora 1
APL	Leucemia promielocítica aguda
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPasa	Enzima que hidroliza ATP a ADP
ATRA	Ácido trans-retinoico (<i>All-Trans Retinoic Acid</i>)
BCR- ABL	<i>Breakpoint Cluster Region</i> y virus Abelson, respectivamente
BIR	<i>Baculoviral IAP Repeat</i>
BSO	DL-butionina-[S, R]-sulfoximina
bp	Pares de bases
CARD	<i>Caspase Activation and Recruitment Domain</i>
Cdk	Ciclina dependiente de kinasa
COX	Ciclooxygenasa
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
CSF	Factor estimulador de colonias
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
DAPI	4'6'-diamidino-2-fenilindol
DD	Dominio de muerte (<i>Death Domain</i>)
DED	Dominio efector de muerte (<i>Death Effector Domain</i>)
DHE	Dihidroetidio
DIABLO	<i>Direct Inhibitor of Apoptosis – Binding protein with Low pI</i>
DISC	<i>Death Inducing Signaling Complex</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSBs	Roturas de doble cadena en el DNA (<i>DNA double strand breaks</i>)

Abreviaturas y términos anglosajones

DTT	Ditiotreitol
$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
EGTA	Ácido [etilen-bis-(oxietilenamino)] tetra-acético
ER	Receptor de estrógenos
ERKs	Quinasas reguladas por señales extracelulares
FBS	Suero fetal bovino
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
5-FU	5-fluorouracilo
γ -GCS	γ -glutamylcisteinasintetasa
g	Fuerza relativa centrífuga
GP _x	Glutación peroxidada
GR	Glutación reductasa
GRPs	Proteínas de estrés reguladas por glucosa
Grx	Glutaredoxina
GSH	γ -glutamylcisteinglicina. Glutación intracelular reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación S transferasa
h	Horas
H ₂ DCFDA	Diacetato de diclorodihidrofluoresceína
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico
HER	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
HGFR	Receptor del factor de crecimiento hepatocelular
HIV	Virus humano de inmunodeficiencia (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HSE	Elemento de respuesta a estrés (<i>Heat Shock Element</i>)
HSPs	Proteínas de choque térmico (<i>Heat Shock Proteins</i>)
IAPs	Inhibidor de Proteínas Apoptóticas (<i>Inhibitor of Apoptosis Proteins</i>)
IARC	<i>Internacional Agency for Research on Cancer</i>
ICE	Enzima convertidora de interleukina-1 β

Abreviaturas y términos anglosajones

IGF	Factor de crecimiento de insulina
IGF-IR	Receptor del factor de crecimiento de insulina (<i>Insulin-like Growth Factor-I Receptor</i>)
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IκB o IKK	Proteína inhibitoria de NF-κB
IP	Ioduro de propidio
JNK/SAPK	Jun quinasa N-terminal/ <i>Stress- Activated Protein Kinase</i>
KDa	Kilodalton: 1000 Dalton
Kpb	kilopares de bases
LMC	Leucemia mieloide crónica
MAPK	Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos (<i>Mitogen-Activates Protein Kinase</i>)
MCB	Monoclorobimane
MCP	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MDR	Resistencia múltiple a drogas (<i>Multiple Drug Resistance</i>)
Min	Minutos
MIF	Factor inhibitorio de migración
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
mL	Mililitros: 10^{-3} litros
mM	Milimolar: 10^{-3} molar
MMP	Metaloproteasa
MTT	Bromuro de 3-(4, 5- dimetiliazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio
mIMP	Permeabilidad de la membrana mitocondrial externa
mOMP	Permeabilización de la membrana mitocondrial externa
mPTP	Poros de transición mitocondrial (<i>Mitochondrial Transition Pore</i>)
mTOR	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
mtDNA	DNA mitocondrial
μg	Microgramos: 10^{-6} gramos
μm	Micras: 10^{-6} metros
μM	Micromolar: 10^{-6} molar
μl	Microlitros: 10^{-6} litros

Abreviaturas y términos anglosajones

NADPH	Nicotín-adenín-dinucleótido fosfato
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
NF-KB	Factor Nuclear-KB (Nuclear Factor of the k-enhancer B)
NGF	Factor de crecimiento nervioso (Nerve Growth Factor)
NP-40	Nonidet P-40
NQO1	NADPH quinona oxidorreductasa I
Nrf2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2 related factor</i>
O₂⁻	Anión superóxido
Omi/HtrA2	Proteína A2 requerida para las altas temperaturas (High temperature requirement protein A2)
PARP	Proteína poli (ADP-ribosa) polimerasa
PBS	Tampón fosfato salino
PDGR	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet Derived Growth Factor)
PK1	Quinasa 1, dependiente de fosfatidil inositol-3
pH	Potencial de hidrógeno: opuesto del logaritmo en base 10 (o el logaritmo del inverso) de la actividad de los iones hidrógeno
PH	<i>Pleckstrin Homology</i>
PI3K	Fosfatidil inositol 3 Kinasa.
PIs	Fosfolípidos de inositol
PKC	Proteína quinasa C
P. m.	Peso molecular
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptors</i>
PTEN	Fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato 3-fosfatasa
PVDF	Membranas de Polivinildenedifloride
RARα	<i>Retinoic Acid Receptor alpha</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RTKs	Receptores de tirosina kinasas

SAPK	<i>Stress-Activated Protein Kinases</i>
SD	Desviación estándar
SDS	Duodecil sulfato sódico
SIRT	Sirtuina
Smac	<i>Second mitochondria-derived Activator of Caspase</i>
SOD	Superóxido dismutasa
TBE	Tris borato EDTA
TBS	Tris borato sódico
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TRAF	Factor asociado al receptor de TNF α
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tri (trihidroximetil) aminometano
T-TBS	Tween-Tris borato sódico
Uma	Unidad de masa atómica
UVB	Luz ultravioleta B
V	Voltios
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje (<i>Voltaje-Dependent Anion Channel</i>)
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptors</i>)
XIAP	<i>X-linked IAP</i>

ABREVIATURAS DE COMPUESTOS USADOS

Ara-C	Citarabina (4-amino-1- β -D-arabinofuranosil-2(1H)-pirimidinona)
ATO	Trióxido de arsénico
BHA	Hidroxianisol butilado
CDDP	Cisplatino o Cis-diaminodicloroplatino II
CsA	Ciclosporina
Cur	Curcumina

Abreviaturas y términos anglosajones

EGCG	Epigallocatequina-3-galato
ETO	Etopósido
Gal	Ácido gálico
Gen	Genisteína
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
Lon	Lonidamina
NAC	N-acetil cisteína
Nar	Naringenina
Resv	Resveratrol
Qt	Quercetina
2-ME	2-Metoxiestradiol
Z-VAD	Z-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona

INTRODUCCIÓN

1. - MODELOS CELULARES

1.1.- LÍNEA CELULAR PROMONOCÍTICA U-937

La línea celular U-937 se estableció a partir del exudado de un paciente al que le fue diagnosticado un linfoma histiocítico. Estas células presentan características propias de monoblastos/promonocitos y están determinadas a diferenciarse a monocitos y macrófagos, aunque poseen una débil capacidad fagocítica (Sundstrom and Nilsson, 1976).

Las células U-937 crecen en suspensión y presentan una morfología redondeada. Carecen de p53 debido a una mutación puntual que impide el correcto procesamiento del transcrito proveniente de este gen (Sugimoto et al., 1992). La diferenciación hacia macrófago de estas células está bloqueada puesto que presentan una expresión de las proteínas Bcl-2 y c-Myc constitutivamente elevada, lo cual favorece la proliferación frente a la diferenciación. No obstante, estas células son susceptibles de superar dicho bloqueo, e iniciar la diferenciación hacia monocito-macrófago por tratamiento con algunos agentes fisiológicos y no fisiológicos (Mezzetti et al., 1984; Miller et al., 2002; Olsson and Breitman, 1982; Yamamoto et al., 2009).

Además, las células U-937 son sensibles a la apoptosis inducida por agentes de muy diversa naturaleza, como la irradiación con rayos X, hipertermia, moléculas prooxidantes (Choi et al., 2002), metales pesados como el cadmio (Galan et al., 2000; Sancho et al., 2006), agentes antineoplásicos como camptotecina (inhibidor de la DNA-topoisomerasa I) o etopósido (inhibidor de la DNA-topoisomerasa II) (Rubin et al., 1991) y agentes alquilantes como cisplatino (Amran et al., 2005).

Dado que las células U-937 presentan características adecuadas para su uso en el estudio de los mecanismos de regulación de la muerte apoptótica y necrótica, y el laboratorio posee una amplia experiencia en estudios de muerte celular, estrés y diferenciación celular en esta línea, se eligió como modelo celular en la realización de gran parte de este trabajo.

1.2.- OTROS MODELOS CELULARES UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

A efectos de comparación, se utilizaron otras líneas celulares.

1.2.1.- Línea celular promielocítica HL-60: fue establecida a partir de un paciente que sufría una leucemia promielocítica aguda (Collins et al., 1977). Las células HL-

60 crecen en suspensión y presentan una morfología redondeada. Carecen de p53 y tienen sobreexpresado el proto-oncogen *c-Myc*.

En general, están más indiferenciadas que las células U-937. La mayoría de estas células poseen características de promielocitos, aunque en cierta proporción, de forma espontánea llegan hasta formas más diferenciadas (mielocitos, metamielocitos o neutrófilos en banda y segmentados). Estas células pueden diferenciarse hacia granulocito, o hacia monocitos-macrófagos dependiendo del inductor usado. Por ello, esta línea celular representa un modelo clásico para el estudio de los procesos de la diferenciación celular en células leucémicas mieloides. Sin embargo, son también susceptibles a inducción de apoptosis, de manera similar a las células U-937.

1.2.2.- Línea celular promielocítica NB4: fue establecida a partir de la médula de un paciente con leucemia promielocítica aguda (Lanotte et al., 1991). Esta línea celular está citogenéticamente caracterizada por la translocación t (15; 17)(q22; q11-12) que da lugar a la proteína de fusión PML-RAR α característica de la leucemia promonocítica aguda. Dicha proteína de fusión bloquea la expresión de genes requeridos para la diferenciación mieloides normal. Estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que concentraciones farmacológicas de *all-trans* ácido retinoico (ATRA) promueven la diferenciación de estas células, ya que provoca la degradación de la proteína de fusión PML-RAR α (Guidez et al., 1998; Jing, 2004). Además, el trióxido de arsénico y otros agentes son capaces de inducir diferenciación o apoptosis en estas células mediante el mismo mecanismo que ATRA (Jing, 2004; Miller et al., 2002).

Estas células expresan marcadores mieloides y también marcadores de células T. Tiene una mayor sensibilidad a ATO que las células U-937 (Jing, 2004)).

1.2.3.- Línea celular promonocítica THP-1: modelo de células promonocíticas humanas (Tsuchiya et al., 1980). Procede de un paciente con leucemia monocítica aguda. Expresan marcadores característicos de los monocitos y poseen receptores Fc y C3b. Están caracterizadas por su capacidad fagocítica y por la producción de lisozimas y esterazas. Además, poseen la capacidad de acumular lípidos y de expresar en su superficie marcadores diferenciadores de los macrófagos (Tajima et al., 1985).

1.2.4.- Línea celular eritroblástica **K562**: se usó como modelo de células mieloides crónicas (Lozzio et al., 1976) Se caracteriza por una translocación t (9; 2) (q34; q11) que da lugar al cromosoma de Philadelphia. El resultado es que parte del *gen de región de fractura* (BCR) del cromosoma 22 se fusiona con parte del *gen ABL* del cromosoma 9. Debido a la presencia de la proteína de fusión Bcr-Abl, las células K562 son más resistentes a la apoptosis que las otras líneas celulares. Mediante el uso de inhibidores de Bcr-Abl se ha conseguido gran eficacia en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda positiva al cromosoma de Philadelphia, así como frente la leucemia mieloide crónica (Fielding, 2011; Hunger, 2011; McCormack and Keam, 2012).

1.2.5.- Línea celular linfoide **Jurkat**: se usó como modelo de células linfoides tipo T. Fue establecida como línea derivada de sangre periférica de un linfoma T de un paciente (Schneider and Schwenk, 1977). Se caracteriza por secretar interleuquina-2.

1.2.6.- Línea celular linfoide **RPMI 8866**: se utilizó como modelo de células linfoides tipo B. Fue establecida a partir de sangre periférica de una paciente con linfoma B (Lampson and Levy, 1980). Expresa elevadas concentraciones de receptores de calcitonina.

2.- AGENTES QUÍMICOS ANTITUMORALES

2.1.- AGENTES MITOCONDRIOTÓXICOS

Los agentes quimioterapéuticos convencionales producen permeabilización de la mitocondria de forma indirecta por inducción de efectos endógenos implicados en el control fisiológico de la apoptosis.

Por el contrario, los agentes mitocondriotóxicos (“*mitochondrotoxics*” o “*mitochondria-targeting drugs*”) engloban una amplia categoría de agentes antitumorales que producen muerte celular por interacción directa con la mitocondria (Andre et al., 2006; Costantini et al., 2000). Entre estos agentes se encuentran, entre otros, el trióxido de arsénico (ATO) y la lonidamina (Belzacq et al., 2001).

2.1.1.- TRIÓXIDO DE ARSÉNICO

El arsénico es un metaloide que se sitúa en el grupo V de la tabla periódica por su capacidad de formar iones X^{3-} . Es un semimetal que se encuentra en el suelo, agua y aire. El arsénico raramente se encuentra en estado puro en la naturaleza; está combinado con el azufre como sulfido o en estado oxidado unido al oxígeno de forma trivalente o pentavalente, todas ellas formas químicamente inestables, o bien estar como sal de sodio, potasio o calcio (Miller et al., 2002).

Está incluido por la IARC (*Internacional Agency for Research on Cancer*) en el grupo I de carcinógenos humanos, puesto que puede causar enfermedades cardiovasculares, hepáticas y renales así como la aparición de cáncer de riñón, hígado, pulmón, vejiga urinaria y piel (Garcia-Vargas and Hernandez-Zavala, 1996).

A pesar de ser tóxico, los compuestos arsenicales se usan desde el año 2400 a.C., tanto como medicina como veneno. A lo largo de la historia, el arsénico ha sido un componente clave de antisépticos, antiespasmódicos, sedantes y tónicos. Algunas de las medicinas más populares a lo largo de los siglos XVIII y XIX fueron las píldoras tónicas de Aiken, y el licor de Fowlers, una solución hidroalcohólica al 1% de ácido arsenioso. El arsénico se ha usado en Occidente y en la medicina tradicional china, y todavía actualmente se encuentra en uso en Extremo Oriente y en Asia Central como remedio para enfermedades reumáticas, psoriasis y sífilis (como revisiones históricas véase (Evens et al., 2004; Miller et al., 2002; Rao et al., 2013)).

Hasta la introducción de la quimioterapia y radioterapia a mediados del siglo XX, el ATO se usaba como tratamiento estándar para la leucemia mieloide crónica (LMC) y otras leucemias.

El interés de la medicina occidental por el uso del arsénico como agente antileucémico tuvo su origen en la publicación de un estudio clínico realizado con un antiguo remedio chino, el Ailing-1, en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (APL) en 1992, seguido de estudios realizados con el ATO donde se logró una remisión total de aquella enfermedad (Chen et al., 2006; Soignet et al., 1998). En los últimos 30 años los compuestos arsenicales, y en particular el ATO, han despertado un gran interés científico como agentes antitumorales (Tallman, 2007). En la APL, concentraciones fisiológicamente tolerables de ATO (equivalente a 0,5-4 μM en plasma) inducen eficazmente diferenciación y/o apoptosis (Chen et al., 1997), provocando así la remisión de la enfermedad y ejerce una mínima mielosupresión (Dai et al., 1999).

Como se dijo anteriormente, la APL se caracteriza por la presencia de la proteína de fusión PML-RAR α , causada por la translocación t (15; 17) (Wang and Chen, 2008). La expresión de esta proteína de fusión tiene como resultado el bloqueo de la expresión de determinados genes requeridos en la diferenciación mieloide normal (de The et al., 1990). Clínicamente la APL es sensible a agentes antileucémicos como antraciclina y citosina arabinósido, así como a terapia con ATRA. Los tratamientos que combinan ATRA y quimioterapia mejoran la supervivencia de pacientes con APL. El ATO está siendo usado con éxito en clínica para la cura de la APL ya que aumenta la supervivencia de pacientes con APL de forma más eficaz que ATRA (Miller et al., 2002; Tomita et al., 2013).

Se propuso como mecanismo que explica la muerte celular inducida por el ATO en células APLs su capacidad de interactuar con los grupos tiólicos vecinos en la proteína de fusión PML-RAR α e inducir su degradación de forma específica así como la de los co-represores de la proteína de fusión (Jing et al., 1999; Lallemand-Breitenbach et al., 2012; Li et al., 2008; Miller et al., 2002).

No obstante, se ha observado que ATO puede ocasionar apoptosis en células leucémicas carentes de la proteína de fusión o incluso en células de ratones “knock out” para PML-RAR α (Diaz et al., 2005; Rojewski et al., 2002). Algunos ejemplos de neoplasias donde induce apoptosis son la leucemia mieloide crónica, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide aguda no M3 y mieloma múltiple, tanto en monoterapia como en terapia combinada (Diaz et al., 2005; Evens et al., 2004). *In vitro*, ATO es eficaz contra células leucémicas promielocíticas (Chen et al., 1996), linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica (Akao et al., 1998; Konig et al., 1997).

Además, el ATO ha sido ensayado en modelos de células tumorales derivadas de tumores sólidos, como cáncer de pulmón (Pettersson et al., 2009), hígado, riñón, piel o de próstata, así como en enfermedades autoinmunes (Bobe et al., 2006).

Los mecanismos por los que ATO induce citotoxicidad difieren según el tipo celular y el tumor. Entre ellos, destacan:

- El ATO induce apoptosis a través de su acción directa sobre el poro de transición mitocondrial (mPTP, del inglés *Mitochondrial Transition Pore*) (Larochette et al., 1999) así como sobre la cadena respiratoria mitocondrial (Pelicano et al., 2003). El ATO tiene su diana en el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) (Belzacq et al.,

2001), por lo que activa el mPTP y esto conlleva al aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna (mIMP), lo que origina la disipación del potencial de membrana, la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (mOMP), la liberación de citocromo *c* y la activación de las caspasas 9 y 3 (Chen et al., 1997; Larochette et al., 1999; Perkins et al., 2000). Asimismo, el ATO inhibe el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC).

- El ATO genera estrés oxidativo, ya que el mecanismo de inducción de daño mitocondrial de ATO produce variación en el estado redox intracelular. A su vez, la toxicidad del ATO es muy sensible a alteraciones en el estado de oxidación celular medido por variaciones en el contenido intracelular de glutatión intracelular (GSH) (Dai et al., 1999; Han et al., 2008a), y en el contenido intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Diaz et al., 2005; Jing et al., 1999; Sanchez et al., 2008; Wang ZY, 2008). Los efectos terapéuticos y tóxicos de ATO son mediados, al menos en parte, por proteínas y enzimas sensibles al estrés oxidativo.

- El ATO actúa sobre diversas rutas de señalización:

a) Proteínas quinasas: altera la función de enzimas y moléculas de señalización, lo que influye en la expresión génica. Por ejemplo, activa el factor de transcripción AP-1, la quinasa JNK y Akt (Yih et al., 2013).

b) Tirosina fosfatasas. Por ejemplo, incrementa la expresión del supresor tumoral fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) en carcinoma de hígado (Zhang et al., 2012).

c) ATO inhibe la quinasa I κ B, requerida para la activación del factor de transcripción pro-inflamatorio NF- κ B, el cual juega un importante papel en la patogénesis de las enfermedades hematológicas (Miller et al., 2002).

- El ATO promueve apoptosis a través de la inhibición de la actividad de la telomerasa.

- ATO induce la expresión de proteínas de choque térmico, inhibe la polimerización de tubulina durante la formación de los microtúbulos (Wu et al., 2008) y disminuye la gluconeogénesis y la hipoglucemia debido a que inhibe la piruvato deshidrogenasa (Miller et al., 2002).

En la Fig. 1 se resumen los mecanismos de acción del ATO.

<p>I. Inducción de apoptosis (0,5-1 μM) Disminución de Bcl-2 Incremento en la expresión de caspasas Activación de JNK Reorganización del dominio oncogénico de PML Disrupción del citoesqueleto Inhibición de NF-κB</p>	<p>II. Inducción de diferenciación (<0,5μM) Degradación de PML-RARα Metilación de histonas</p>
<p>III. Alteración del estado redox Generación de ROS Unión a proteínas/enzimas ricas en grupos sulfhídricos, como GSH y reduce los niveles de éste</p>	<p>IV. Inhibición de la angiogénesis Disminución de VEGF</p>

Figura 1. Mecanismos de acción del ATO (tomado de (Mathews et al., 2010)).

Sin embargo, el uso del ATO en terapia antitumoral presenta ciertas limitaciones. En células diferentes a APLs, ATO tendría que usarse a concentraciones relativamente elevadas (por encima de las tolerables fisiológicamente) para obtener una apoptosis efectiva y por tanto ser eficaz el tratamiento. Esto impone la necesidad de desarrollar estrategias de sensibilización para incrementar la acción apoptótica del ATO, permitiendo de este modo disminuir las dosis de aplicación. Entre las estrategias desarrolladas para incrementar su eficacia destacan:

- Uso de compuestos arsenicales con mayor eficacia antitumoral. Por ejemplo, el compuesto S-dimetilarsino- glutation (Darinaparsin) es un derivado que tiene mayor eficacia que el ATO en varios tipos de tumores e incluso en APLs resistentes a ATO (Diaz et al., 2008).

- Modulación de las vías de transducción de señales. Así, se ha observado que la inhibición de los niveles de activación de las MAPKs ERK y JNK potencian la acción apoptótica del ATO (Fernandez et al., 2004; Ramos et al., 2006; Ramos et al., 2005).

- Combinaciones con agentes que activan la vía extrínseca ejecutora de la apoptosis, como por ejemplo la citoquina TNF α , cooperan con la activación de la vía intrínseca por ATO, aumentando la apoptosis (Amran et al., 2005).

- Co-tratamiento con agentes que provocan un estrés oxidativo moderado. Dada la dependencia de la toxicidad del ATO frente al estado oxidante de la célula, la disminución en el contenido de glutatión (GSH) favorece la apoptosis inducible por ATO (Ramos and Aller, 2008), y el aumento en el contenido de ROS intracelular potencia su toxicidad (Diaz et al., 2005; Sanchez et al., 2008). Por ello, una posible estrategia puede

ser la combinación del ATO con agentes que causen un estrés oxidativo moderado en la célula por bajada del contenido de GSH y/o acumulación de ROS.

2.1.2.- LONIDAMINA

La lonidamina es un derivado del ácido-3-carboxil indocilasa (Ravagnan et al., 1999). Originariamente se describió que tenía un efecto antiespermiogénico debido a que producía inhibición energética. Posteriormente, se descubrió que es también un agente antineoplásico.

Tiene su diana en la proteína ANT del poro de transición mitocondrial (Fantin and Leder, 2006; Le Bras et al., 2006; Solary et al., 2003). Por ello, provoca una permeabilización de la membrana mitocondrial (Belzacq et al., 2001), la liberación de citocromo *c* y Smac/Diablo de la mitocondria, la activación de caspasas y la apoptosis (Di Cosimo et al., 2003).

La lonidamina inhibe la fosforilación de la glucosa al inhibir la hexokinasa, por lo que la concentración de glucosa- 6- fosfato disminuye; en consecuencia inhibe la glucólisis aerobia y el consumo de oxígeno disminuye. Como inhibe la glucólisis, afecta a la tasa de formación de metabolitos en la glucólisis y a la ruta de las pentosas fosfato. La capacidad disminuida de células tratadas con lonidamina para sintetizar ATP y glucosa-6-fosfato provoca una reducción en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, lo cual afecta al crecimiento y a la viabilidad celular, teniendo efecto antiproliferativo (Fig. 2).

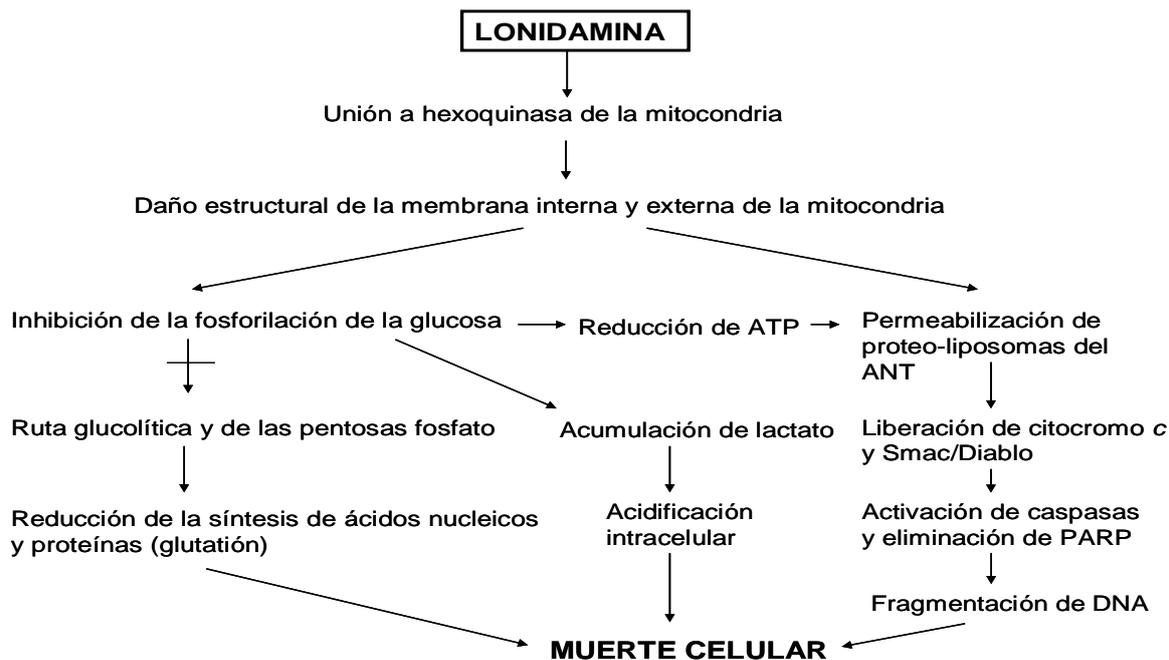


Figura 2. Mecanismos de acción de lonidamina (tomado de (Di Cosimo et al., 2003).

La lonidamina inhibe el sistema de extrusión de drogas, por lo que disminuye el fenotipo de resistencia múltiple a drogas (MDR, del inglés *Multiple Drug Resistance*) (Di Cosimo et al., 2003; Silvestrini, 1991).

La lonidamina ejerce un efecto inhibitorio sobre el transporte y acumulación de lactato en células neoplásicas. Inhibe, por tanto, la acidificación intracelular (De Martino et al., 1984).

La lonidamina es bien tolerable por el organismo, incluso a concentraciones elevadas, y no tiene los efectos secundarios que producen muchos agentes antiproliferativos. Sin embargo, es poco efectiva en monoterapia por lo que su utilidad radicaría en la combinación con drogas convencionales (Caputo and Silvestrini, 1984).

Se sabe que las células tumorales son muy dependientes de la glucólisis. La inhibición de la síntesis de ATP por lonidamina inhibe los sistemas de reparación de DNA provocados por los agentes antitumorales (Di Cosimo et al., 2003). Por ello, la lonidamina es clínicamente útil en combinación con radioterapia y con diferentes fármacos que dañan el DNA, como etopósido (De Cesare et al., 1998; Ning and Hahn, 1990) o doxorubicina (Li et al., 2002), y como tal ha sido usado eficazmente en ensayos clínicos en fase I, II y III frente a diferentes tumores sólidos (Grad et al., 2001) como cáncer de mama, ovario (Ravagnan et al., 1999), pulmón (Di Cosimo et al., 2003) o glioma (Ben-Yoseph et al., 1998; Lena et al., 2009; Oudard et al., 2003). Sin embargo, el potencial terapéutico de la lonidamina en neoplasias hematológicas apenas ha sido investigado.

2.2.- DROGAS CON DIANA EN EL DNA

Los efectos de las drogas mitocondriotóxicas ATO y lonidamina se contrastaron con los derivados de agentes con otros mecanismos de acción, en particular drogas con diana en el DNA, a saber, cisplatino, citarabina y etopósido.

El **cisplatino** [cis-diaminodicloroplatino (II)] es un metal pesado inorgánico que consta de un átomo de platino unido covalentemente a dos átomos de cloro y a dos grupos amino. Tras difundir al interior de la célula, se produce la hidrólisis de los iones de cloro dando lugar a un producto reactivo que se une de forma covalente al ADN causando aductos o puentes inter e intracatenarios, bloqueando la replicación y la transcripción. Por ello, el cisplatino es un agente alquilante que produce muerte celular.

El cisplatino fue el primer miembro de una familia de medicamentos contra el cáncer que en la actualidad incluyen carboplatino y oxaliplatino. El cisplatino tiene un amplio espectro de actividad antitumoral, siendo el fármaco más activo en tumores sólidos. Es usado en quimioterapia para el tratamiento de varios tipos de cáncer, como sarcomas, algunos carcinomas, linfomas o melanoma (como revisión véase (Oberoi et al., 2012)).

Las limitaciones del cisplatino son sus severos efectos tóxicos secundarios así como su relativamente pobre actividad (resistencia intrínseca) frente a tumores, por ejemplo colorrectal (Cvitkovic, 1998; Hartmann and Lipp, 2003).

La **citarabina** (4-amino-1-β-D-arabinofuranosil-2(1H)-pirimidinona) es un nucleósido. Se trata de un agente antineoplásico. En el interior de la célula, la citarabina es convertida en citarabina-5-trifosfato (ara-CTP), que es el metabolito activo. Se postula que el ara-CTP se incorpora al DNA y al RNA e inhibe la síntesis de DNA durante la fase S del ciclo celular, provocando la así muerte celular.

Es el agente más efectivo para la inducción de la remisión de la leucemia mielo-cítica aguda (Stein and Tallman, 2012) También se emplea para tratamiento de la leucemia linfática aguda y la leucemia granulocítica aguda (Fukushima et al., 2012; Maiolo et al., 1987) y para linfoma no Hodgkin (Kim et al., 2012) . Sin embargo, presenta también citotoxicidad frente a células proliferantes no tumorales.

El **etopósido** es un derivado semisintético de la podofilotoxina. Su mecanismo de acción es a través de su interacción y formación de complejos con la topoisomerasa II del DNA, que da lugar a roturas de cadena doble y simple (como revisión véase (Hande, 1998)).

Se usa en el tratamiento de cáncer de mama (Cobleigh, 2011), de pulmón, leucemias (Ezoe, 2012), linfomas no Hodgkin (Kim et al., 2012), sarcomas pediátricos y en tumores germinales en combinación con cisplatino. Sin embargo, tiene toxicidad en células proliferantes no tumorales.

3.- POLIFENOLES

3.1.- GENERALIDADES

Los compuestos fenólicos son sustancias naturales ampliamente distribuidas en el reino vegetal donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Entre otras, intervienen en el crecimiento y reproducción de las plantas y en procesos defensivos frente a patógenos, predadores o radiación ultravioleta (Manach et al., 2004). Están presentes en alimentos de origen vegetal y nutracéuticos.

Según su estructura química, se pueden definir como sustancias que poseen al menos un anillo aromático de benceno conectado con uno o más grupos hidroxilos (fenoles) pero sus características estructurales son diversas, pudiendo incluir grupos funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc (Duthie and Crozier, 2000; Martinez-Valverde et al., 2000; Weng and Yen, 2012a).

3.2.- EFECTOS BIOLÓGICOS

La acción fisiológica de los polifenoles depende de su estructura química.

Los polifenoles son normalmente considerados como beneficiosos para el organismo debido a sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antiproliferativos y anticancerígenos (como revisión véase (Ramos, 2008)). Dadas estas propiedades biológicas, los polifenoles han sido ampliamente estudiados como posibles agentes para el tratamiento del cáncer (Aggarwal, 2008; Aggarwal and Shishodia, 2006), enfermedades neurodegenerativas (Bhullar and Rupasinghe, 2013) y otras enfermedades crónicas e inflamatorias (Auclair et al., 2008; Scalbert et al., 2005) así como preventivos de enfermedades cardiovasculares (Babu and Liu, 2008; Scalbert et al., 2005).

Así, estudios realizados en diferentes líneas celulares, modelos animales, experimentos *in vitro* y ensayos epidemiológicos muestran un papel protector de los polifenoles sobre ciertos tipos de cáncer (Galati et al., 2000; Ramos, 2008). Por ejemplo, se ha observado que una dieta rica en polifenoles, característica de países asiáticos, disminuye el riesgo de padecer cáncer y puede inhibir la carcinogénesis (Ramos, 2007, 2008; Surh, 2003).

Los polifenoles previenen la iniciación y promoción del cáncer y la progresión del tumor (Aggarwal and Shishodia, 2006). Su acción anticarcinogénica se atribuye a una

combinación de efectos citoprotectores en células normales y efectos citotóxicos en células neoplásicas (Ramos, 2008).

Los polifenoles ejercen sus efectos anticancerígenos mediante múltiples mecanismos como (como revisiones véase (Hu, 2011; Ramos, 2007)) (Fig. 3):

- Inducción de apoptosis. Actúan a nivel mitocondrial induciendo liberación de citocromo *c* con la subsiguiente activación de caspasa-9 y caspasa-3, incremento de activación de caspasa-8 y rotura/activación de tBid, disminución de la expresión de Bcl-2 y Bcl-X_L y potenciación de la expresión de Bax y Bak.

- Destoxificación de agentes carcinogénicos. Los polifenoles inhiben enzimas de detoxificación de la fase I e incrementan la actividad o modulación de la expresión génica de las enzimas de fase II (Galati and O'Brien, 2004).

- Atenuación del estrés oxidativo. La actividad antioxidante puede ser directa (mediante eliminación de radicales libres) o indirecta a través de la activación del sistema Nrf2 (del inglés *Nuclear Factor Erythroid 2 related factor*).

- Acción antiproliferativa y modulación de proteínas del ciclo celular, lo que contribuye a la prevención del cáncer (como revisión véase (Meeran and Katiyar, 2008)).

- Inhibición de actividades de la DNA topoisomerasa I y II.

- Tienen dianas en proteínas de diferentes vías de señalización implicadas en inflamación y desarrollo del cáncer como PI3K/Akt y en factores de transcripción, como NF- κ B. La inhibición de PI3K/Akt y de NF- κ B, ambos antiapoptóticos, por polifenoles contribuye a la atenuación de la carcinogénesis (Kang et al., 2011). Asimismo, los polifenoles modulan rutas de supervivencia/proliferación e inhiben la actividad de tirosinas quinasas.

- Previenen la metástasis ya que disminuyen los niveles de VEGF y metaloproteasas, e incrementan el factor inhibitorio de migración (MIF). Los polifenoles tienen la capacidad para inhibir la invasión y la metástasis *in vitro* e *in vivo* en cáncer de cerebro, de boca, tiroides, hipofaringe, mama, pulmón, hígado, tracto biliar, gástrico, pancreático, intestinal, colon, renal, ovario, cervix, próstata y epidérmico (como revisión véase (Weng et al., 2010; Weng and Yen, 2012a)).

- Ocasionalmente, los polifenoles inducen diferenciación celular, principalmente el grupo de isoflavonas y en concreto la genisteína (Constantinou et al., 1990; Hung et al., 2005; Jing and Waxman, 1995; Lee et al., 2001; Sanchez et al., 2009), por lo que pueden ser agentes de gran utilidad en terapias de diferenciación.

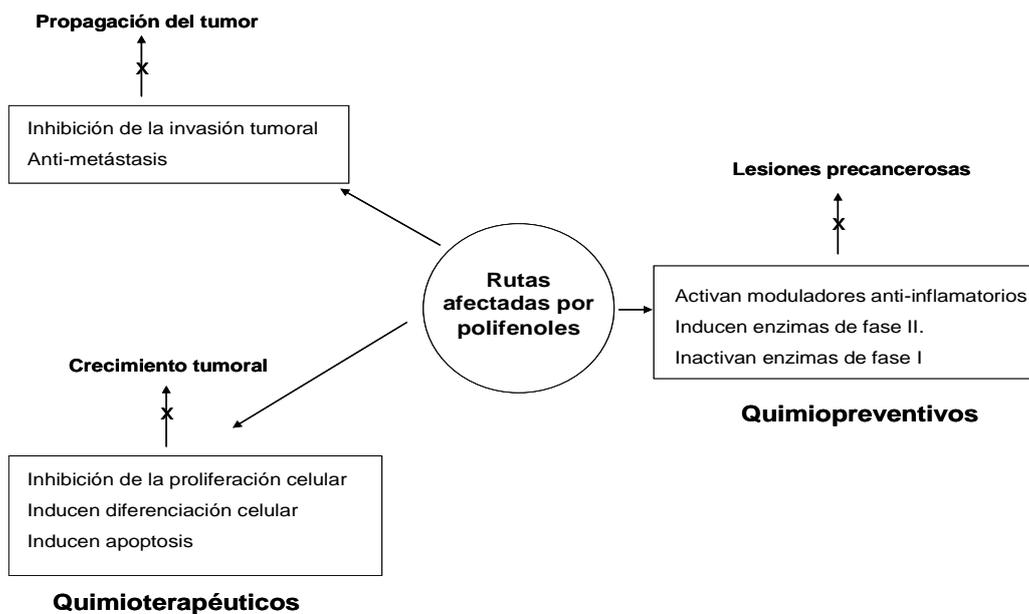


Figura 3. Rutas celulares afectadas por las actividades de los polifenoles (tomado de (Saldanha and Tollefsbol, 2012)).

Como se ha comentado, los polifenoles han sido generalmente caracterizados como agentes antioxidantes, a las concentraciones alcanzadas en plasma por un consumo dietético normal (Sarkar and Li, 2002). Sin embargo, se ha demostrado *in vitro* que algunos polifenoles, a ciertas concentraciones y según el sistema experimental, pueden ejercer un efecto pro-oxidante.

Las células tumorales son particularmente sensibles al estrés oxidativo, por lo que los polifenoles producen muerte celular sobre ellas. Debido a esto, los polifenoles pueden ser usados farmacológicamente como elementos curativos sobre tumores ya formados. Esto es particularmente beneficioso en quimioterapias combinadas de polifenoles con agentes quimioterapéuticos convencionales, ya que potencian su acción apoptótica (Aggarwal and Shishodia, 2006), estrategia que se usará en esta tesis.

3.3.- CLASIFICACIÓN

Los compuestos fenólicos se clasifican en 14 clases según su estructura química. Hay 8000 estructuras polifenólicas. Las clases más comúnmente conocidas y numerosas son las siguientes (como revisión véase (Tsao, 2010)):

3.3.1.- Ácidos fenólicos. Son metabolitos secundarios procedentes de la ruta del ácido siquímico. Se caracterizan por poseer en su estructura química el anillo aromático y el grupo hidroxílico comunes a los compuestos fenólicos y una función carboxílica. Se clasifican basándose en el número de anillos aromáticos hidroxilados y el tipo de

grupo funcional, habiendo dos tipos principales: los del ácido cinámico y derivados y los del ácido benzoico y derivados. En este último grupo se encontraría el ácido gálico, producto de la descomposición del ácido tánico.

Los ácido fenólicos tienen actividad antitumoral, antiviral, antibacteriana y cardioprotectora (Agarwal et al., 2006).

En este trabajo se utiliza el **ácido gálico** (3, 4, 5,-trihidrobenzoico) (Fig. 4). Se encuentra en el té verde, uvas, fresas, plátanos, en la corteza de roble, en las agallas y en otras plantas (Faried et al., 2007).

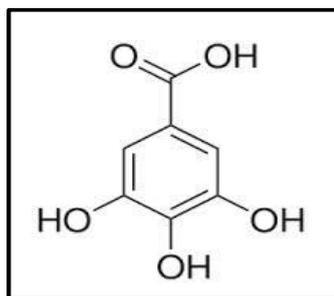


Figura 4. Estructura del ácido gálico.

El ácido gálico tiene actividad antiinflamatoria (Kim et al., 2006), anti-invasiva y anti-metastásica en varios modelos tumorales, como adenocarcinoma gástrico y de colon, cáncer de esófago o mastocitoma (Faried et al., 2007) y cáncer de pulmón (Kawada et al., 2001) (como revisión véase (Weng and Yen, 2012a)). Se ha visto en modelos animales y en líneas celulares cancerígenas *in vitro* (Verma et al., 2013).

3.3.2.- Estilbenos. Son hidrocarburos aromáticos, de fórmula $C_{14}H_{12}$, del que existen dos formas isómeras: el trans-1,2-difeniletieno (E-estilbeno) y el cis-1,2-difeniletieno (Z-estilbeno). Se encuentran en baja cantidad en la dieta humana (Manach et al., 2004; Scalbert et al., 2005). En este trabajo estudiamos el resveratrol.

3.3.3.- Lignanós. La estructura básica de estas sustancias son dos unidades C_6C_3 unidas por enlaces β , β' . Tienen un bajo peso molecular. El aceite de linaza es la fuente más rica en lignanos, pues contiene secoisolariciresinol.

Los lignanos aril-tetralina y aril-naftaleno son muy usados para el tratamiento del cáncer, principalmente cáncer de mama y de próstata, tanto en modelos animales como en humanos (Ionkova, 2011).

3.3.4.- Flavonoides. Es el grupo más numeroso de los polifenoles, hay al menos 8000 caracterizados en varias plantas (Benavente-Garcia and Castillo, 2008). Los flavonoides se encuentran en hojas, semillas, cortezas y flores.

Se sintetizan a partir de una molécula de fenilalanina y tres de malonil-CoA, cuyo producto se cicla gracias a la acción de una enzima isomerasa (Winkel-Shirley, 2002). La estructura de los flavonoides consiste en dos anillos de 6 átomos de carbono (un anillo A aromático y un anillo C heterocíclico) conectados a través de una cadena de tres átomos de carbono a un anillo aromático B (Fig. 5). Es, por tanto, un esqueleto de difenilpropanos o difenilpiranos (C6-C3-C6) el cual puede sufrir modificaciones y adiciones de grupos funcionales, originando diferentes subgrupos: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, isoflavonas, antocianinas y flavanoles (como revisiones véase (Ramos, 2007; Weng and Yen, 2012b)) (Ver Tabla 1).

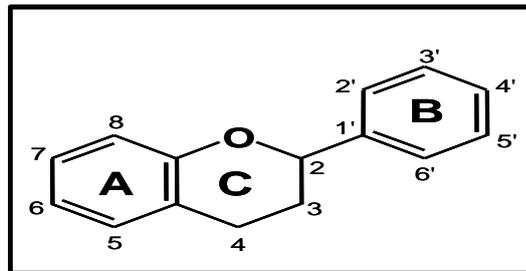


Figura 5. Estructura base de los flavonoides.

En el presente trabajo estudiamos la acción de los siguientes flavonoides:

- **Genisteína** (4', 5, 7-trihidroxiisoflavona) (Fig. 6) es la isoflavona principal de la soja (ver Tabla 1).

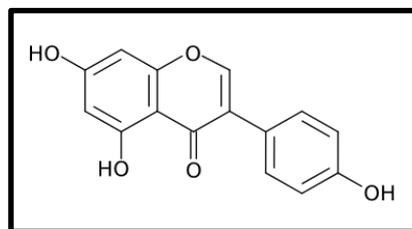


Figura 6. Estructura de la genisteína.

Los efectos biológicos de la genisteína incluyen, entre otros:

- **Actividad estrogénica:** estructuralmente la genisteína es un fitoestrógeno, un análogo de β -estradiol (Zava and Duwe, 1997).

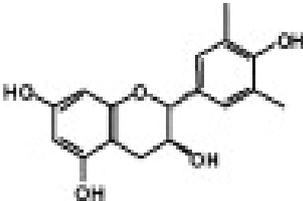
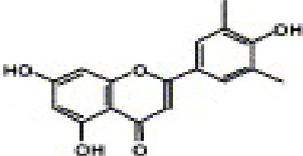
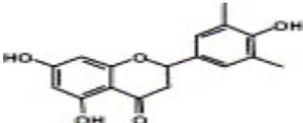
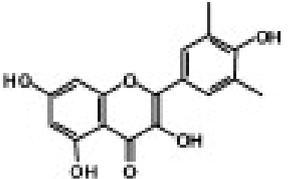
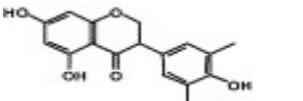
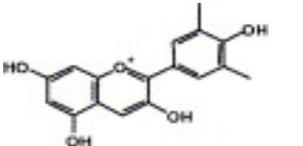
<u>Subgrupo de flavonoide</u>	<u>Flavonoides característicos</u>	<u>Fuente de obtención</u>
<p>FLAVANOLES</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - EGCG - Epigallocatequinas - Catequinas - Epicatequinas 	<p>Chocolate, té verde, vino tinto, manzana, cerezas, albaricoque, alubias, zarzamora, uvas, judías.</p>
<p>FLAVONAS</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Luteolina - Apigenina - Crisina - Tangeretina 	<p>Tomillo, pimentón, apio, perejil, orégano.</p>
<p>FLAVANONAS</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Naringenina - Hesperetina - Eriodictiol 	<p>Naranja, pomelo, limón.</p>
<p>FLAVONOLES</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Quercetina - Miricetina - Kaemferol - Rutina - Ramanazina 	<p>Cebolla, manzana, cereza, brócoli, tomate, té, puerro, vino tinto, fresa.</p>
<p>ISOFLAVONAS</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Genisteína - Daidzeína - Gliciteína 	<p>Soja, legumbres.</p>
<p>ANTOCIANIDINAS</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Pelargonidina - Cianidina - Malvidina - Delfinidina 	<p>Cerezas, fresas, vino tinto, malva, berenjena, pasa negra, ruibarbo.</p>

Tabla 1. Clasificación de los flavonoides (modificado a partir de (Ramos, 2007)).

- Inhibidor de tirosinas quinasas de amplio espectro (Akiyama et al., 1987).
- Inhibidor de DNA topoisomerasas: es un potente inhibidor de la actividad catalítica topoisomerasa I y II (Okura et al., 1988), provocando roturas en el DNA.

- Aunque normalmente es un antioxidante, la genisteína es capaz de actuar como agente pro-oxidante debido a su capacidad de interferir con la cadena respiratoria mitocondrial (Galati and O'Brien, 2004; Salvi et al., 2002).

Su potencial acción antitumoral se relaciona con su acción pro-apoptótica (Banerjee et al., 2008; Gossner et al., 2007; Park et al., 2005; Sarkar and Li, 2002). La genisteína se usa frente al tratamiento de cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de páncreas (véase como revisiones (Dixon and Ferreira, 2002; Saldanha and Tollefsbol, 2012; Tarkowski et al., 2013)). Asimismo, la genisteína se usa como quimiosensibilizador en quimioterapia, en combinación con cisplatino (Tamura et al., 2003), con gemcitabina (Liang et al., 2012), etc.

- **Quercetina** (3, 3',4', 5, 7-pentahidroxiflavona) es un flavonol (Fig. 7) (ver Tabla 1). Se absorbe rápidamente después de su ingestión.

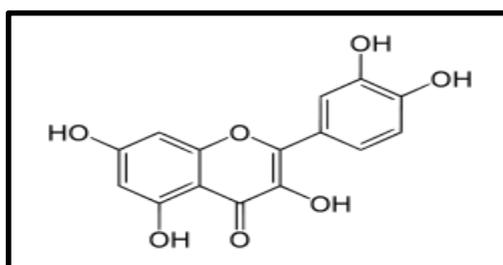


Figura 7. Estructura de la quercetina.

La quercetina puede desregular rutas de señalización, causando activación o inhibición de MAPKs e inhibición del eje PI3K/Akt (Murakami et al., 2008) y puede afectar al estado redox celular por alterar el contenido en GSH (revisado en (Ramos and Aller, 2008)).

Se ha demostrado que la administración con la dieta de quercetina previene la carcinogénesis, especialmente de colon, mientras que estudios epidemiológicos indican que la ingesta del flavonol evita el cáncer de pulmón (Murakami et al., 2008).

La quercetina produce apoptosis en diferentes líneas celulares, como leucemia y tumores sólidos tales como cáncer de pulmón (Kuo et al., 2004; Nguyen et al., 2004), cáncer de hígado (Granado-Serrano et al., 2006), cáncer cervical (Vidya Priyadarsini et al., 2010), cáncer de próstata (Cimino et al., 2012), cáncer de mama, cáncer de boca, cáncer de colon, o glioma. Su eficacia como agente antitumoral se ha corroborado en

modelos de ratón y en ensayos en fase I (Ferry et al., 1996; Yuan et al., 2006). Asimismo, aumenta la eficacia de drogas anticancerígenas como doxorubicina (Li et al., 2013).

- **Epigallocatequina-3-galato (EGCG)**: es un flavanol (Fig. 8) (ver Tabla 1). En solución es inestable, por lo que tiene una baja biodisponibilidad (Lam et al., 2004).

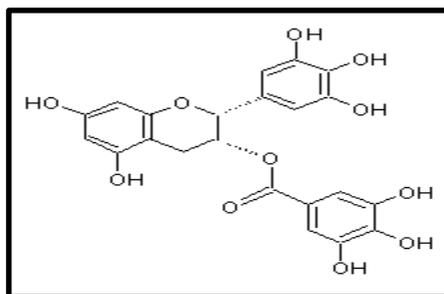


Figura 8. Estructura de EGCG.

Inhibe el desarrollo y la progresión tumoral mediante la modulación de varias dianas, como inhibición de los receptores de tirosina quinasas: EGFR, VEGFR, PDGR, IGFIR (Cao et al., 2002; Fridrich et al., 2008; Masuda et al., 2011; Pianetti et al., 2002; Shimizu and Weinstein, 2005). Modula AMPK (Hwang et al., 2007). Bloquea la carcinogénesis al afectar a las rutas JAK/STAT, MAPK, PI3K/AKT, Wnt, Notch y NF- κ B (como revisiones véase (Saldanha and Tollefsbol, 2012; Singh et al., 2011)). Inhibe la formación del proteasoma, un complejo multiproteico esencial en la proliferación celular y desarrollo de resistencia a drogas (Lam et al., 2004).

Induce apoptosis a través de la generación de ROS (Hwang et al., 2005; Nakazato et al., 2007) y la activación de caspasa-3 y caspasa-9 en leucemia, cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de boca, preadipocitos y fibroblastos (como revisiones véase (Ding et al., 2013; Ramos, 2007, 2008; Yang et al., 2009)). Provoca reducción tumoral, tiene actividad anti-metastásica y para el ciclo celular en muchos tipos de cáncer sin afectar a las células normales *in vitro* e *in vivo* (Hwang et al., 2005; Saldanha and Tollefsbol, 2012; Weng and Yen, 2012b)).

Además de los efectos por sí solo, EGCG puede potenciar la eficacia terapéutica de drogas quimioterapéuticas convencionales (Tang et al., 2012)

- **Naringenina** (5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil) cromen-4-ona) es una flavono-na, una glicona de la naringina, abundante en cítricos, uvas y tomates (Fig. 9) (ver Tabla 1).

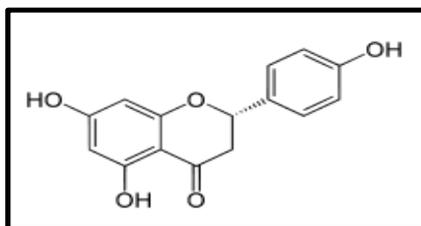


Figura 9. Estructura de la naringenina.

Tiene efectos antiproliferativos y antiangiogénicos. Muestra citotoxicidad en líneas celulares derivadas de cáncer de mama, de estómago, hígado, cervix, páncreas, útero, cerebro y colon así como en líneas leucémicas (Kanno et al., 2005). Se usa en quimioterapia junto a otros agentes (Meiyanto et al., 2012; Takahata et al., 2008).

3.3.5.- Curcuminoides. Son pigmentos polifenólicos presentes en la cúrcuma (planta *Curcuma Longa L.*). Los más importantes son: curcumina (entre un 70-75%), demetoxi-curcumina (15-20%) y bis-demetoxi-curcumina (aproximadamente un 3%). Estas sustancias representan entre el 3 y el 6% de la planta. En este trabajo estudiamos la curcumina, de la que hablaremos más adelante.

3.3.6.- Amidas polifenólicas: contienen sustituyentes funcionales en el grupo N. Hay dos grupos: capsaicinoides, que se encuentran en la pimienta picante, y avenantramidas, halladas en avenas (Tsao, 2010).

3.3.7.- Otros polifenoles: hay otros grupos de polifenoles menos conocidos. Algunos ejemplos de otros polifenoles serían el senósido A, una antraquinona que se encuentra en la hoja de sen, el ácido rosmarínico, el gingerol... etc (Tsao, 2010).

3.4.- CURCUMINA Y RESVERATROL

El estudio principal de esta tesis se centrará en la acción de la curcumina y el resveratrol, por su gran interés clínico en la actualidad (Kelkel et al., 2010). Por ello, ampliaremos la información sobre estos agentes.

3.4.1.- CURCUMINA

La curcumina [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenol)- 1,6 heptadieno-3,5-diona] es un polifenol hidrofóbico derivado del rizoma del turmérico, una planta de origen asiático usada como especia en países orientales (Fig. 10).

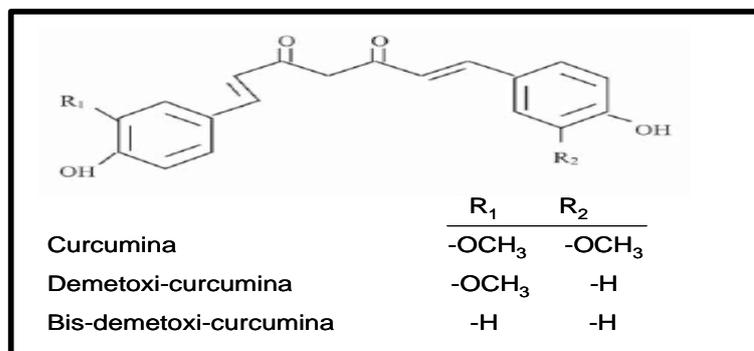


Figura 10. Estructura de la curcumina y sus principales derivados.

La curcumina se ha utilizado en la medicina tradicional india para el tratamiento de heridas, dolencias hepáticas, hepatitis y enfermedades del tracto urinario (Gupta et al., 2012a).

La elevada lipofilia de curcumina le permite una rápida absorción intestinal gastrointestinal por difusión pasiva. Una vez absorbida en el organismo, la curcumina tiene pobre estabilidad porque es rápidamente excretada, principalmente por bilis y heces y también por orina, y por otra parte se absorbe mal a nivel de membrana celular. Sin embargo, la curcumina es estable en el estómago y en el intestino delgado. Debido a que se absorbe mal, se intentan desarrollar derivados semisintéticos con mayor propiedad de captación celular y mayor estabilidad (Anand et al., 2007; Basile et al., 2009). Sus principales metabolitos son bioactivos (Anand et al., 2008; Basile et al., 2009).

Acción a nivel celular y molecular

a) Es antioxidante (Menon and Sudheer, 2007). Por ejemplo, previene la peroxidación lipídica, un proceso que causa muchas patologías como enfermedades hepáticas, renales, cardiovasculares, neurodegenerativas, en la diabetes y en las cataratas (Kelkel et al., 2010). A pesar de su capacidad antioxidante, bajo ciertas condiciones la curcumina puede *per se* estimular la producción de ROS (Chan et al., 2006; Woo et al., 2003) o potenciar la generación de ROS por otros agentes (Javvadi et al., 2008; Kikuchi et al., 2010) en algunos modelos de células tumorales.

b) Dianas moleculares. Puede afectar a numerosas cascadas moleculares y de señalización (Aggarwal et al., 2007; Anand et al., 2008; Kunnumakkara et al., 2008). La curcumina tiene numerosas dianas como factores de transcripción (NF- κ B, STAT3, AP-1), receptores (HER-2, IL-8 y CXCR-4), quinasas (RTK, JNKs, ERKs, EGFR, JAK), citoquinas (TNF $_{\alpha}$, IL, MIP y MCP), enzimas (MMP, iNOS, GST, ATPasa) y factores de crecimiento (EGF, NGF, HGF y PDGF). Inhibe rutas de señalización defensivas tales como PI3K/Akt y NF- κ B (Lin, 2007; Reuter et al., 2008). Es un inhibidor de histonas desacetilasas (Chen et al., 2007). Aumenta los niveles de p53 en modelos como adenocarcinoma de colon y carcinoma de ovario.

c) Efectos sobre ciclo celular. La curcumina regula proteínas del ciclo celular y *checkpoints* lo que implica disminución de ciclinas y Cdks, aumento de inhibidores de Cdks e inhibición de la síntesis de DNA, impidiendo así el desarrollo tumoral (Karunagaran et al., 2007; Meeran and Katiyar, 2008).

d) Acción pro-apoptótica: induce apoptosis *in vitro* sobre varias líneas celulares tumorales (Bengmark et al., 2009).

Otros efectos biológicos de la curcumina

- Efectos antiinflamatorios, por modulación del metabolismo de los eicosanoides.
- Capacidad inmunomoduladora (Gautam et al., 2007; Sharma et al., 2007).
- Actividad hipolipidémica: disminuye el colesterol, los triglicéridos y los fosfolípidos plasmáticos así como las LDL (Mesa, 2000).
- Inhibe la agregación plaquetaria.
- Actividad antimicrobiana: ejerce efecto antibacteriano, antifúngico y antiparasitario. Es capaz de inhibir la integrasa del HIV-1 (Mazumder et al., 1995).
- Tienes acciones específicas en tejidos como (como revisión véase (Mesa, 2000)):
 - a) Piel: produce cicatrización de las heridas y muestra efectos beneficiosos en lesiones de la piel, como psoriasis.
 - b) Tracto gastrointestinal: ejerce protección frente a los tumores de estómago.
 - c) Hígado: la curcumina tiene actividad hepatoprotectora.
 - d) Sistema respiratorio.

La curcumina se usa para el tratamiento de enfermedades tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes, artritis reumatoide, enfermedades neurológicas y enfermedad de Crohn (Anand et al., 2008) o depresión (Scapagnini et al., 2012).

Efecto antitumoral de la curcumina

La curcumina tiene un gran potencial terapéutico contra el cáncer. Debido a sus efectos biológicos, muestra un potencial terapéutico contra cáncer hematológico, cáncer gastrointestinal, cáncer genitourinario, cáncer de mama, tumores ginecológicos, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, melanoma, tumores neurológicos y sarcoma (como revisiones véase (Anand et al., 2008; Shehzad et al., 2013)).

Su acción quimiopreventiva se debe a su capacidad para inducir apoptosis en células tumorales y debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Anand et al., 2007; Gupta et al., 2012b; Leu and Maa, 2002). Además, inhibe la iniciación y la promoción tumoral (Reuter et al., 2008). Tiene actividad anti-invasiva y anti-metastásica en cáncer de mama (Liu and Chen, 2013; Nagaraju et al., 2012), cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, osteosarcoma, glioma y melanoma (como revisiones véase (Kunnumakkara et al., 2008; Ramos, 2008; Weng and Yen, 2012a)).

Su eficacia ha sido probada en modelos animales y ensayos clínicos en fase I en múltiples tipos de cáncer (Anand et al., 2008; Cheng et al., 2001; Gao et al., 2012; Sharma et al., 2004) y en fase II (Gao et al., 2012) y III (Hatcher et al., 2008).

Además de su acción en monoterapia, la curcumina es un eficaz quimiosensibilizador de la acción de agentes quimioterapéuticos convencionales *in vitro*, tales como paclitaxel (Taxol) para cáncer de mama (Aggarwal et al., 2005) y cáncer de próstata, docetaxel para cáncer de mama (Bayet-Robert et al., 2010), con citoquinas (TNF α y TRAIL) en cáncer de vejiga y próstata (Deeb et al., 2005), con 5-FU (5-fluorouracilo) en cáncer de esófago (Tian et al., 2012), con gemcitabina para el cáncer de páncreas (Lev-Ari et al., 2007), con ácido docosahexaenoico en cáncer de mama (Altenburg et al., 2011), con sulfinosina (un antiinflamatorio no esteroideo) frente al tratamiento de cáncer de pulmón (Andjelkovic et al., 2008) y con celecoxib en cáncer de colon. Con algunos de estas combinaciones se han realizado ensayos tipo I, como en el caso de la combinación con docetaxel (Bayet-Robert et al., 2010) y II (como revisiones véase (Hsu and Cheng, 2007; Limtrakul, 2007; Reuter et al., 2008)).

Además, la curcumina se usa para sensibilizar a radioterapia, por ejemplo en células tumorales de cáncer cervical (Javvadi et al., 2008).

3.4.2.- RESVERATROL

El resveratrol es una fitoalexina polifenólica (3, 5, 4'-trihidroxi-trans-estilbeno) (Fig. 11) abundante en más de 70 especies de plantas, como fresas, cacahuets, uvas, zarzamora, arándanos, vino tinto y en varias hierbas (Cucciolla et al., 2007; Yu et al., 2012).

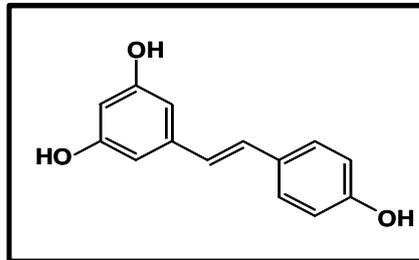


Figura 11. Estructura química del resveratrol.

Es el responsable de los efectos positivos del consumo del vino tinto sobre la prevención de enfermedades cardiovasculares (Bianchini and Vainio, 2003). Tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y quimiopreventivas, como se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* y en estudios con animales (2010). Se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal (Walle et al., 2004).

Acción a nivel celular y molecular

a) Normalmente es antioxidante e ingerido con la dieta es quimiopreventivo (Roemer and Mahyar-Roemer, 2002). Evita la peroxidación lipídica e inhibe ciclooxigenasa y lipooxigenasa.

b) Sus dianas moleculares son diversas. El resveratrol afecta a proteínas de membrana y receptores: modifica factores de crecimiento, inhibe la expresión del receptor de estrógenos, puede tener actividad estrogénica o antiestrogénica y posee un efecto inhibitorio sobre CYP1A1 (Cucciolla et al., 2007), una enzima de fase I detoxificante, e induce enzimas de fase II (Jang and Pezzuto, 1999).

c) Produce apoptosis porque, entre otros, aumenta la expresión de Bax, Bak, PUMA, Noxa, Bim, p53, TRAIL, TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R1/DR5 y disminuye la expresión de Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 y survivina (Shankar et al., 2007).

d) El resveratrol produce parada en G₂/M por su regulación de proteínas del ciclo celular (Holmes-McNary and Baldwin, 2000). Induce retraso en la fase S durante la replicación porque afecta a la ribonucleótido reductasa (Fontecave et al., 1998).

e) Inhibe NF-κB (Cucciolla et al., 2007).

f) El resveratrol puede inducir diferenciación en una gran variedad de tipos celulares (Cucciolla et al., 2007), por ejemplo en células mieloides (Asou et al., 2002).

Otros efectos biológicos del resveratrol

- Efecto anti-envejecimiento. El resveratrol tiene efectos sobre la restricción calórica, por lo que incrementa la esperanza de vida en especies tales como levadura, *D. melanogaster* y *C. elegans* al actuar sobre la expresión genética de la enzima sirtuina Sir2 (Baur and Sinclair, 2006; Guarente, 2005). En mamíferos activa SIRT1, ortóloga de Sir2 (Chung et al., 2010).

- Tiene actividad antiinflamatoria, mediada porque inhibe NF-κB (Estrov et al., 2003) y por ello disminuye la expresión de citoquinas (2010).

- Actúa sobre la regulación inmune (Sharma et al., 2007).

- Promueve la función vascular endotelial y previene enfermedades cardiovasculares (2010).

- Potencia el metabolismo de los lípidos.

Efecto antitumoral del resveratrol

Sus efectos anticancerígenos a nivel molecular incluyen, como hemos comentado anteriormente, efectos fitoestrógenos, incremento en SIRT1, inhibición de la actividad NF-κB, inhibición de COX-2, actividad antioxidante y estimulación de apoptosis. Muestra actividad pro-oxidante bajo ciertas condiciones que están ligadas a la iniciación, promoción y progresión tumoral (como revisiones véase (Jang et al., 1997; Shankar et al., 2007)).

El resveratrol, usado a concentraciones fisiológicas, inhibe la proliferación celular y tiene efecto directo en la citotoxicidad por inducción de apoptosis, por ejemplo en líneas tumorales derivadas de tumores humanos, como osteosarcoma o líneas de cáncer de próstata LNCaP y PC-3 (como revisiones véase (Aggarwal et al., 2004; Athar et al., 2007; Cimino et al., 2012; Meeran and Katiyar, 2008)). Además, tiene actividad antiangiogénica (Cao et al., 2002), por ejemplo en mieloma múltiple, debido a que inhibe VEGF y metaloproteinasas (Hu et al., 2007).

Estas propiedades y la carencia de efectos secundarios dañinos hace del resveratrol un agente potencialmente útil como quimiopreventivo y para el tratamiento del cáncer (Fulda and Debatin, 2006b).

Asimismo, aparte de su uso en monoterapia, se puede usar el resveratrol en combinación con drogas quimioterapéuticas o factores citotóxicos en el tratamiento de tumores o en células tumorales resistentes a drogas (Gupta et al., 2011). Así, el resveratrol se puede combinar *in vitro* con paclitaxel en cáncer de pulmón (Kubota et al., 2003), en mieloma y en linfoma no Hodgkin (Jazirehi and Bonavida, 2004), con TNF α (Fulda and Debatin, 2004; Ivanov et al., 2008), con ciclofosfamida (Singh et al., 2009) o con estrógeno 17 β -estradiol (Bhat and Pezzuto, 2001) para el tratamiento del cáncer de mama, con n-butilato (Wolter et al., 2003) o con 5-FU (Chan et al., 2008) contra el cáncer de colon. Hay ensayos clínicos en fase I (Gupta et al., 2011; Nguyen et al., 2009). Además de usarse como quimiosensibilizador, se usa como radiosensibilizador (Scarlati et al., 2007).

Las limitaciones en el uso del resveratrol es que es poco permeable a las células (Espin et al., 2007), por ello se busca generar derivados del mismo o análogos, con el fin de mejorar su actividad biológica. La actividad antioxidante y antiplaquetaria y para inducir apoptosis de estos derivados es superior a la que tiene el resveratrol, como se ha demostrado experimentalmente (Kelkel et al., 2010; Santos et al., 2013). Por ejemplo, algunos derivados son el TMS (2, 4, 3',5'-tetrametoxiestilbeno), que es efectivo sobre recaídas de cáncer de mama (Aiyar et al., 2010), el HST-1 (3, 5, 3',5' tetrahidroxi estilbeno)(Guha et al., 2010) o el gloriosaol (Nigro et al., 2007).

4.- PROCESOS CELULARES

4.1.- MUERTE CELULAR

4.1.1.- GENERALIDADES

Los organismos celulares han desarrollado complejos mecanismos de control que les permiten un correcto desarrollo embrionario y el mantenimiento de los tejidos. El control de la división y muerte celular durante el desarrollo es esencial para la organogénesis y la formación de los tejidos. Mediante este proceso los organismos eliminan las células sobrantes, dañadas o potencialmente peligrosas (Ulukaya et al., 2011).

Existen tres tipos principales de muerte celular descritos (Kroemer et al., 2009), a saber: a) la apoptosis dependiente de caspasas (modelo de muerte celular programada); b) la necrosis como modelo de muerte traumática, no fisiológica; y c) la autofagia, un proceso de degradación mediado por lisosomas destinada a la eliminación de estructuras celulares y constituyentes dañados de la célula y puede tener función proapoptótica o anti-apoptótica (De Duve, 1963; Lee et al., 2012).

4.1.2.- APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso de muerte celular activo, puesto que requiere de energía para su ejecución, y está genéticamente controlado. Se lleva a cabo de manera fisiológica durante la embriogénesis y el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. Además puede desarrollarse en respuesta a estímulos ambientales tales como exposición a drogas antitumorales (Hickman, 1992), metales pesados (Galan et al., 2000), hipertermia, sustancias oxidantes, infecciones virales, etc. Las alteraciones en el desarrollo de la apoptosis son la causa de patologías humanas tales como enfermedades degenerativas, infarto de miocardio, aterosclerosis, diabetes, Alzheimer, Parkinson que implican exceso de apoptosis, o enfermedades proliferativas tales como cáncer o desórdenes autoinmunes que implican defecto de apoptosis (Barr and Tomei, 1994; Cotman and Anderson, 1995; Hanahan and Weinberg, 2000, 2011; Thompson, 1995).

Existen una serie de parámetros morfológicos y bioquímicos asociados al proceso de apoptosis, los cuales pueden servir como marcadores metodológicos.

Algunas características típicas de la apoptosis son:

a) La función principal de la apoptosis es la eliminación selectiva de una célula, evitando el daño a las células adyacentes. Una de las características más importantes de la apoptosis es el mantenimiento íntegro de la membrana plasmática, impidiendo la salida al exterior de su contenido intracelular evitando así una respuesta inflamatoria. La membrana sufre una serie de cambios bioquímicos como el cambio de localización del fosfolípido fosfatidilserina, que tras un estímulo apoptótico se transloca a la cara externa de la membrana y sirve como marcador de las células apoptóticas o de sus cuerpos derivados (cuerpos apoptóticos) para su fagocitosis por los macrófagos (Fadok et al., 1992). En los cultivos celulares *in vitro*, las células apoptóticas pueden presentar en las últimas fases de este proceso daños en la membrana plasmática, debido a la falta de células fa-

gocíticas que las eliminen. Este proceso de permeabilización de la membrana en células apoptóticas tardías se denomina necrosis secundaria, para diferenciarla de la necrosis primaria genuina. La membrana de una célula apoptótica sufre un proceso de ondulación en su superficie, un fenómeno denominado con el término inglés “blebbing” (vesiculación), que es un proceso previo a la formación de los cuerpos apoptóticos.

b) El evento bioquímico más importante es la rotura específica de múltiples proteínas celulares, llevada a cabo por una familia de cisteín-proteasas denominadas caspasas (Li and Yuan, 2008). Estas proteínas se encargan del desmantelamiento celular, ya que desintegran el citoesqueleto y la lámina nuclear, eliminan el contacto entre células, inhiben la replicación y las señales de supervivencia y activan las endonucleasas encargadas de la degradación del DNA. Además, se ha descrito que la actividad de las caspasas puede dañar la permeabilidad mitocondrial afectando directamente la actividad de los complejos mitocondriales I y II, provocando generación de ROS (Ricci et al., 2004). Esta amplificación del daño mitocondrial por las caspasas es muy importante a tener en cuenta en tratamientos contra células tumorales (Fulda and Debatin, 2006a).

c) Se activan endonucleasas, por lo que el DNA de las células apoptóticas sufre una condensación y fragmentación en unidades características para evitar la replicación. El DNA sufre dos procesos de rotura, uno que produce fragmentos de alto peso molecular (correspondiente a 50 Kpb), y la fragmentación intranucleosomal que origina fragmentos de bajo peso molecular (200 pares de bases).

d) Otra característica típica de la apoptosis es la pérdida del volumen celular. La condensación citoplasmática ocurre por la pérdida de iones K^+ , Cl^- e iones orgánicos, lo que conlleva una pérdida de agua (Maeno et al., 2000).

Una vez finalizado el proceso de autodigestión, los restos celulares (citoplasma, orgánulos y fragmentos de cromatina) quedan englobados por fragmentos de la membrana plasmática formando los cuerpos apoptóticos. Posteriormente, estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por células vecinas o del sistema inmune impidiendo así el desarrollo de una respuesta inflamatoria que dañe a las células circundantes, lo cual es fundamental para evitar daños tisulares y orgánicos (Vaux and Korsmeyer, 1999).

La apoptosis, en general, implica tres fases (Kroemer et al., 1997):

- **Iniciación:** según el estímulo inicial varía la secuencia de eventos bioquímicos que disparan la apoptosis. Se produce la permeabilización de la membrana mitocondrial y se activan las caspasas y endonucleasas debido al incremento de calcio intracelular.

- Decisión. La célula apoptótica pierde contacto con las células vecinas y el citoplasma se contrae provocando una disminución en el tamaño celular. Se produce el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones y el incremento en la generación de ROS. Finalmente, se forman los cuerpos apoptóticos y las caspasas ejercen su acción.

- Degradación: las células o cuerpos apoptóticos son fagocitados. La fagocitación celular puede empezar de forma temprana en algunos tipos celulares, no siempre es un evento terminal.

Vías de apoptosis

Se han descrito dos vías principales de ejecución de la apoptosis (Jin and El-Deiry, 2005).

La **vía extrínseca** (“mediada por receptor”) implica la activación de las caspasas iniciadoras tras la unión de un ligando específico a un receptor de superficie. La unión de la molécula de procaspasa-8 a las moléculas adaptadoras del complejo del receptor, formando el complejo DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*), origina un cambio conformacional en la estructura de la procaspasa-8, permitiendo la autoproteólisis (fragmentos de 43/42 kDa y 18 kDa) y por tanto la activación de la caspasa.

Las células se pueden clasificar en dos tipos. El tipo I engloba aquellas células en las que la cantidad de caspasa-8 activa es suficiente para producir la activación de las caspasas ejecutoras. Por su parte, el tipo II se produce cuando la actividad de la caspasa-8 generada por el DISC no es suficiente para activar las caspasas ejecutoras, por lo que necesita de la activación de la vía mitocondrial para amplificar la señal de muerte. En este paso participa la proteína Bid, que es proteolizada por la caspasa-8 (Esposti, 2002).

La **vía intrínseca** (“mitocondrial”) implica la permeabilización de la membrana externa mitocondrial mediante miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 y la liberación de proteínas mitocondriales (Green and Kroemer, 2004). En particular, la liberación del citocromo *c* al citosol permite la formación del apoptosoma, que tras la rotura/activación de caspasa-9, facilitará la activación proteolítica de las caspasas ejecutoras, como las caspasas -3, -6 y -7.

El apoptosoma es un complejo proteico formado por moléculas de la proteína citosólica Apaf-1 (Zou et al., 1997), moléculas de citocromo *c* (apaf-2) (Liu et al., 1996) y

moléculas de procaspasa-9 (apaf-3) (Li et al., 1997) (revisado en (Yuan and Akey, 2013)).

Además de citocromo *c*, salen de la mitocondria otras proteínas relacionadas con la ruta de activación de la apoptosis. Tras la salida de la mitocondria del citocromo *c*, éste se une a la procaspasa-9 y a Apaf-1 produciéndose el ensamblamiento de citocromo *c*/Apaf-1/caspasa-9 formando el complejo del apoptosoma (Cain et al., 2000). El citocromo *c* se une a la región C-terminal de Apaf-1, una proteína citosólica con un dominio N-terminal de unión a caspasas (CARD). Esta unión del citocromo *c* a Apaf-1 facilita la asociación de dATP con Apaf-1 y expone su extremo N-terminal CARD, el cual puede unirse a la procaspasa-9 mediante una interacción CARD-CARD (Adrain et al., 1999). La procaspasa-9 se rompe por cercanía, dando lugar a caspasa-9 en forma activa. Ulteriormente, la procaspasa-3 es reclutada en el apoptosoma y es rota por la caspasa-9 dando lugar a caspasa-3 activa (Bratton et al., 2001). La caspasa-3 es la responsable de la ruptura y activación de múltiples sustratos en la célula que provocan el desencadenamiento celular y bioquímico de la apoptosis (Fig. 12).

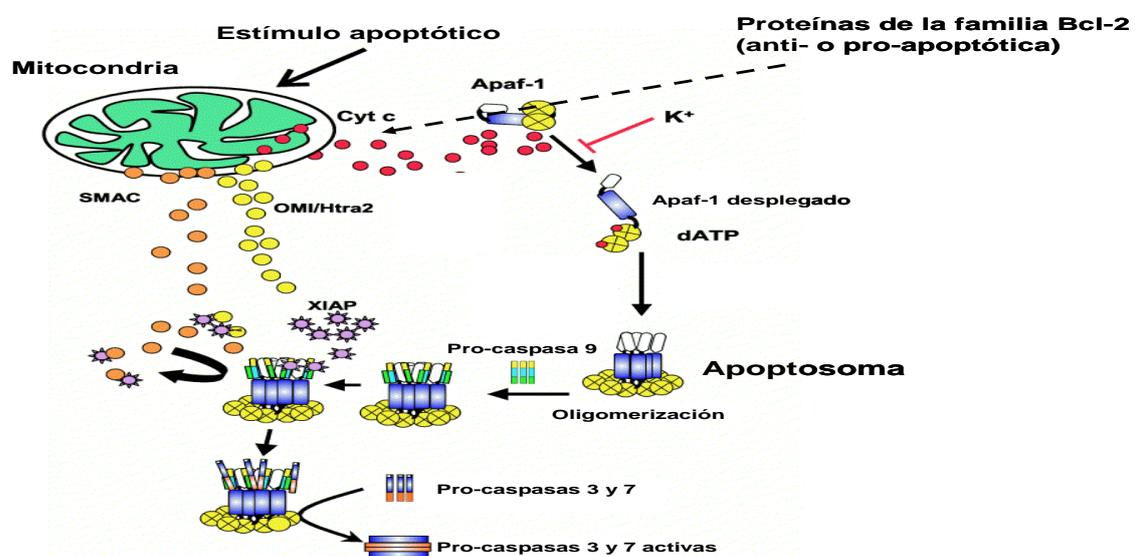


Figura 12. Resumen de la vía intrínseca.

A continuación, se describen las proteínas que intervienen en la ruta intrínseca.

Proteínas mitocondriales

Se liberan diferentes proteínas desde la mitocondria al citosol para ejecutar la apoptosis (como revisión véase (Ravagnan et al., 2002)):

- Citocromo c: fue la primera proteína intermembranal apoptogénica identificada que se liberaba desde la mitocondria al citosol durante la apoptosis.

- Omi/HtrA2 (del inglés *High temperature requirement protein A2*). Es una proteasa que juega un papel esencial en la regulación de la homeostasis mitocondrial. Es procesada a una proteína madura por rotura de su secuencia aminoterminal. Una vez en el citosol interacciona con las proteínas inhibidoras de la apoptosis IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*), degradándolas y permitiendo así la activación de la caspasa-3. No obstante, también es capaz de inducir muerte independientemente de la activación de las caspasas o de la interacción con IAPs (Suzuki et al., 2001).

- Smac/Diablo: inhibe la acción de las IAPs (Verhagen et al., 2000).

- AIF (factor inductor de la apoptosis): causa la fragmentación del DNA y la condensación de la cromatina periférica (Susin et al., 2000). En el citoplasma, la sobreexpresión de AIF provoca la disipación del potencial de membrana mitocondrial y la translocación de fosfatidilserina en la membrana plasmática (Susin et al., 1999).

- Endonucleasa G: provoca la fragmentación del DNA nuclear (Li et al., 2001).

Familia de las proteínas Bcl-2

Esta familia de proteínas incluye proteínas antiapoptóticas (como Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W y Mcl-1) y proteínas pro-apoptóticas (Bid, Bax, Bak, Bad y Bok).

Familia de IAPs: XIAP

Las proteínas IAPs son una familia de proteínas caracterizadas por la presencia de uno o más dominios BIR (del inglés *Baculoviral IAP Repeat*), secuencia de 70 aminoácidos que rodean estructuras α y β de la proteína. Se conocen 8 familias de IAPs en mamíferos (XIAP, c-IAP1, c-IAP2, NAIP, BRUCE, ML-IAP, ILP2 y survivina) siendo XIAP (*X-linked IAP*) la más potente e inhibidora directa de la actividad de caspasas (Rajalingam and Dikic, 2009).

Estas proteínas tienen múltiples actividades biológicas como son la inhibición de caspasas, la regulación de la progresión del ciclo celular y la modulación de la transducción de señales por receptor (Yang and Li, 2000). Además, están frecuentemente sobreexpresadas en tumores, siendo su inhibición favorable para la inducción de apoptosis (Hunter et al., 2007).

Caspasas

Las caspasas (**Cisteín aspartato proteasas**) son una familia de proteínas expresadas constitutivamente en casi la totalidad de las células animales. Se expresan en forma inactiva (pro-caspasa), por lo que necesitan un proceso proteolítico para su activación (como revisión véase (McIlwain et al., 2013)). Desde el descubrimiento de la enzima convertidora de interleukina-1 β (ICE o caspasa-1) (Yuan et al., 1993) se han detectado 14 caspasas en mamíferos, de las cuales 11 se codifican en humanos (Li and Yuan, 2008). Además de intervenir en procesos de muerte celular, tienen otras funciones en la célula (Li and Yuan, 2008).

Las caspasas se dividen en dos grupos según la estructura primaria del extremo N-terminal:

- Caspasas iniciadoras: engloba las caspasas 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 y 12. Se caracterizan por tener largos prodominios, que contienen motivos de interacción proteína-proteína y se activan al inicio de la cascada apoptótica gracias a moléculas adaptadoras. Su secuencia favorita de corte es (I, L, V) ExD. Son las encargadas de la propagación de la señal apoptótica mediante el inicio de una cascada de activación proteolítica que produce la puesta en funcionamiento de las caspasas ejecutoras.

- Caspasas ejecutoras: son el grupo de caspasas 3, 6 y 7. Son las encargadas de la degradación de la mayor parte de los sustratos de estas proteasas, lo que supone el inicio del desmantelamiento y del colapso celular. Estas caspasas poseen prodominios cortos y su sitio de corte favorito es DExD (Thornberry et al., 1997).

Estructuralmente, la molécula precursora inactiva denominada pro-caspasa consta de tres dominios (como revisión véase (Hengartner, 2000)):

- Prodominio. Se encuentra situado en el extremo N-terminal y debe ser eliminado para la activación de la caspasa. Su longitud varía entre los 23 aminoácidos de la caspasa-6 y los 219 descritos en la caspasa-10. Pese a que los prodominios tienden a ser más divergentes que los segmentos catalíticos, se han encontrado segmentos comunes implicados en la interacción proteína-proteína, como DED (*Death Effector Domain*) encontrados en las caspasas-8 y -10, y CARD, descrito en las caspasas-1, -2, -4, -5, -9, -11 y -12.

- Subunidad mayor (p20): Su peso molecular oscila entre los 17 kDa de la caspasa-3 o -10 y los 43 kDa de la caspasa-8.

- Subunidad menor (p10). Se encuentra en el extremo C-terminal. Su tamaño también es variable, entre 10 y 15 kDa.

En algunos casos existe un pequeño fragmento proteico entre las subunidades mayor y menor, que también debe ser eliminado durante el proceso de activación.

La activación de las pro-caspasas es fruto de una autoproteólisis o de una proteólisis originada por una caspasa iniciadora anteriormente activada y son necesarios dos cortes (Li et al., 1997; Srinivasula et al., 1998). En primer lugar, se produce un corte entre la subunidad mayor y la menor que libera esta última, y posteriormente se produce el corte entre la subunidad mayor y el prodominio, quedando libre a su vez la subunidad mayor. La estructura cuaternaria de la caspasa activa está formada por homodímeros, por lo que habría dos subunidades mayores y dos menores, y por tanto, dos sitios catalíticos activos (Fig. 13).

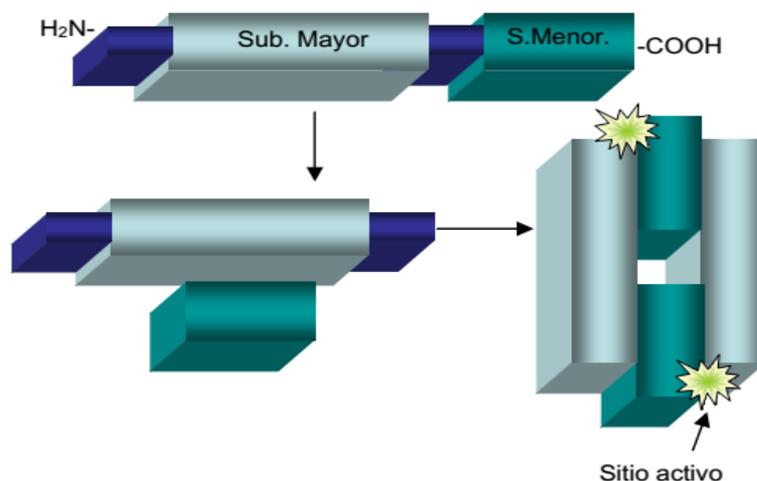


Figura 13. Secuencia de activación de caspasas.

4.1.3.- NECROSIS

La necrosis es un tipo de muerte pasivo y no fisiológico, originado por un daño celular severo, generalmente traumatismos físicos o químicos (Wyllie, 1987).

Las principales características de la necrosis típica son el incremento de volumen mitocondrial, la aparición de vacuolas, la destrucción de orgánulos y una rápida pérdida de la funcionalidad de la membrana plasmática. Esto provoca un aumento de volumen celular y origina roturas en la membrana plasmática, produciéndose así la salida del contenido citoplasmático al exterior y provocando una respuesta inflamatoria.

En la necrosis hay alteraciones en canales catiónicos no selectivos (NSCC), lo que conduce a una mayor captación de agua y al incremento en el volumen celular (Barros et al., 2001). Esto provocaría, además, la lisis de los orgánulos observada en las primeras etapas de la necrosis.

Además, hay un mantenimiento de uniones celulares entre las células necróticas, al contrario de lo que ocurre en la apoptosis (Majno and Joris, 1995).

Las principales diferencias entre apoptosis y necrosis se resumen en la Tabla 2.

	Apoptosis	Necrosis
Dependencia de ATP/dATP	Proceso activo	Proceso pasivo
Volumen celular	Disminuido	Aumentado
Integridad organular	Mantenida	Perdida
Membrana plasmática	Íntegra	Rotura rápida
Contacto célula-célula	Perdido	Mantenido
Resultado final	Cuerpos apoptóticos No inflamación	Lisis celular Inflamación

Tabla 2. Diferencias entre apoptosis y necrosis.

Se ha demostrado que apoptosis y necrosis pueden coexistir en un mismo tejido (Ledda-Columbano et al., 1991) y que un mismo estímulo puede causar necrosis o apoptosis dependiendo de las condiciones experimentales en una misma línea celular. En principio, el mecanismo de control que dirige a la célula a apoptosis o necrosis está basado en el mantenimiento o no de los niveles intracelulares de ATP y en la activación o no de caspasas (Zhan et al., 1999). Así, en muchos modelos experimentales, el surgimiento de un fenotipo necrótico puede deberse al mero hecho de que la apoptosis no se puede ejecutar debido a un aumento excesivo en los niveles de ROS o por una bajada en los niveles de ATP/ADP, que son necesarios para la activación del apoptosoma (Eguchi et al., 1997; Nicotera et al., 1999). Ahora bien, hay tratamientos que pueden inducir necrosis de forma directa, por ejemplo los tratamientos que dañan la membrana plasmática alterando el canal de transporte aniónico de la misma, como por ejemplo por un choque térmico elevado o por alta concentración de H₂O₂ (Guenal et al., 1997).

Sin embargo, hay mecanismos de regulación en la necrosis comunes a los observados en la apoptosis, como la pérdida de potencial de membrana mitocondrial (Lemasters, 1999) o la oxidación celular (Hampton and Orrenius, 1997).

Además, existen procesos intermedios que comparten características fenotípicas de ambos tipos de muerte y que no pueden ser clasificados como típicamente necróticos o típicamente apoptóticos (Leist and Jaattela, 2001).

4.2.- MITOCONDRIA Y MUERTE CELULAR

4.2.1.- Generalidades

La mitocondria es un orgánulo clave en los procesos de inducción de muerte celular. Su papel se manifiesta a tres niveles diferentes: (a) favorece la aparición del estrés oxidativo celular al aumentar la producción de ROS; (b) participa en la síntesis de energía necesaria para el proceso de apoptosis y en la catástrofe energética originada como consecuencia del desacoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial; y c) participa en la regulación de la activación de caspasas.

Numerosos inductores típicos como, por ejemplo, agentes causantes de alteraciones en el DNA, carencia de factores tróficos, isquemia, radiación ultravioleta, estrés oxidativo, etc., necesitan de la mitocondria para el desarrollo de la apoptosis.

Durante la apoptosis se aprecian numerosos cambios en la integridad mitocondrial que afectan tanto a la membrana interna como a la membrana externa de este orgánulo, que pueden originar el desacoplamiento de la cadena respiratoria detectado en las fases iniciales de este proceso. Se relacionaron los cambios en la permeabilidad de las membranas de la mitocondria con el desarrollo de la apoptosis (Zamzami et al., 1995).

La mitocondria contiene procaspasas inactivas, como las procaspasas -2, -3, -8 y -9, que son liberadas desde el espacio intermembrana junto con las proteínas efectoras.

4.2.2.- Teorías sobre la apertura mitocondrial

Hay dos teorías, aunque no necesariamente excluyentes, sobre la apertura mitocondrial y liberación de proteínas desde el espacio intermembrana (Fig. 14):

1.- Una basada en la formación del poro de permeabilidad mitocondrial (mPTP), que ocurre principalmente en respuesta a la liberación de Ca^{+2} del retículo endoplasmá-

tico. Como consecuencia de la permeabilización de la membrana interna, se produce la disipación del potencial de membrana, el hinchamiento de la matriz, la disrupción de la membrana externa y la liberación de proteínas del espacio intermembrana.

2.- Como la despolarización de la membrana interna no siempre ocurre antes que la salida de proteínas mitocondriales, se ha postulado la existencia de canales formados por proteínas de la familia Bcl-2 que afectan a la membrana externa y que permite la salida de solutos.

El mecanismo concreto mediante el cual se regula la permeabilización mitocondrial es un punto de intenso estudio. Puesto que la activación del poro implica pérdida del potencial de membrana y reducción de ATP esto conduciría a la apoptosis más que a la necrosis (Grimm and Brdiczka, 2007). Pero hay autores que implican el mPTP como un elemento regulador clave tanto en la apoptosis como en la necrosis (Brenner and Grimm, 2006; Kroemer, 1998, 2002; Lemasters et al., 1998). La intensidad del daño celular y la duración de la apertura del poro determinaría el tipo de muerte celular (Grimm and Brdiczka, 2007).

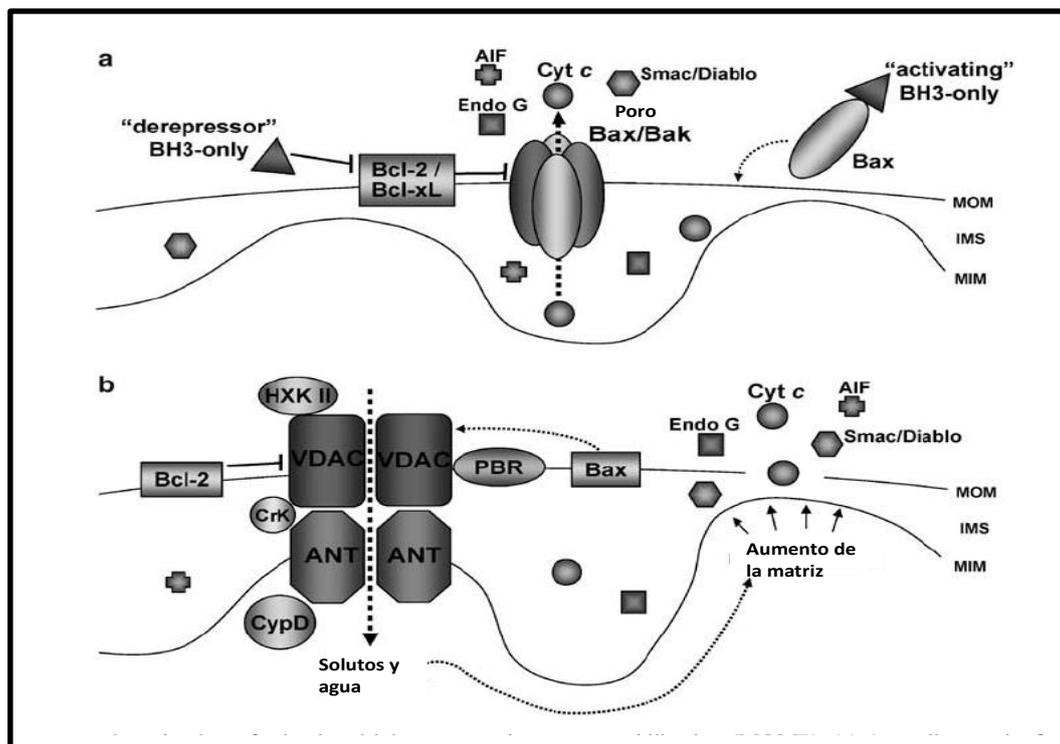


Figura 14. Mecanismo de la permeabilización de la membrana externa (mOMP). A) Modelo de formación del poro. B) Modelo del mPTP (Modificado de (Fantin and Leder, 2006)). [MOM: membrana mitocondrial externa. MIM: membrana mitocondrial interna. IMS: espacio intermembrana].

A continuación, se explican las dos teorías en profundidad.

A.- Poro de permeabilidad mitocondrial. Regulación de su apertura.

Las alteraciones sufridas por la mitocondria durante la apoptosis son fruto de un aumento de permeabilidad de la membrana interna que permite la entrada en la matriz de protones, disipando así el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) generado por la cadena transportadora de electrones y empleado por la ATPasa mitocondrial para la generación de ATP. Este repentino aumento de la permeabilización se debe a la activación y apertura de un complejo multiproteico denominado poro de permeabilidad mitocondrial o poro de transición mitocondrial (mPTP) (Grimm and Brdiczka, 2007).

Existen zonas de contacto entre las membranas mitocondriales, las denominadas 'zonas densas', cuyos componentes proteicos son capaces de interactuar y dar lugar a la formación del mPTP. Por ello, este poro atraviesa las membranas interna y externa de la mitocondria. En condiciones fisiológicas, los diferentes componentes del poro están disgregados (Tornero et al., 2002). Está compuesto, al menos parcialmente, por proteínas localizadas en ambas membranas y en la matriz. El núcleo del mPTP está formado por el ANT, que se encuentra en la membrana interna y controla el paso de manera específica de la forma fosforilada y no fosforilada de nucleótidos de adenina, y por la porina o canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC, del inglés *Voltaje-Dependent Anion Channel*), localizada en la membrana externa y que contribuye a la permeabilización. Otras proteínas que forman el MTP son la ciclofilina D (CD), que se encuentra en la matriz mitocondrial, la hexoquinasa (HK), la creatina quinasa (CK), el receptor de benzodiazepinas (RB) y la proteína Bax (Beutner et al., 1996; Marzo et al., 1998) (Fig. 15).

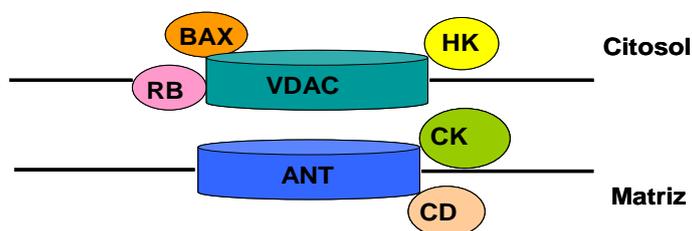


Figura 15. Estructura del poro de permeabilidad mitocondrial (mPTP).

El mPTP se regula por Ca^{+2} , fosfato inorgánico, pH alcalino y ROS, los cuales promoverían su apertura. Los factores que controlarían o se asocian a la apertura del poro serían:

APERTURA	CIERRE
↑Ca ⁺² en la matriz mitocondrial	↑Mg ⁺² o Mn ⁺² en la matriz
Pi	ADP
pH alcalino en la matriz	pH ácido en la matriz
ROS	
Bax	Bcl-2
Cerámida y gangliósidos	Glucosa y creatina

A consecuencia de la apertura del poro, solutos con un peso molecular no superior a 1,5 kDa difundirían de forma no selectiva a través de la membrana interna. Se han caracterizado 79 componentes que se liberan, entre ellos, se incluyen enzimas catabólicas, endocepina y multitud de iones y moléculas con actividad pro-apoptótica, como el citocromo *c*, Smac/Diablo, Apaf-1, AIF y las procaspasas inactivas -2, -3, -8 y -9 (Fantin and Leder, 2006; Tornero et al., 2002). Todos ellos producen despolarización de la mitocondria, desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y un aumento del volumen mitocondrial (Bernardi et al., 1999; Zoratti and Szabo, 1995).

Hay evidencias que sugieren que estos poros tienen dos modos de apertura, regulado y no regulado (He and Lemasters, 2002).

Además, la apertura de este poro provoca una entrada masiva de agua en la matriz, debido a su hiperosmolaridad. El aumento de volumen de la matriz mitocondrial provoca la rotura de la membrana mitocondrial externa, debido a su menor superficie, y de este modo se liberaría el contenido de su espacio intermembranal al citoplasma.

B.- Proteínas de la familia Bcl-2

Se ha sugerido la existencia de otros mecanismos alternativos, puesto que la liberación de las proteínas pro-apoptóticas puede producirse mucho antes que la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Gogvadze et al., 2001). Se ha propuesto que miembros pro-apoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2 de forma independiente permeabilizarían específicamente la membrana mitocondrial externa sin despolarización mitocondrial ni alteraciones ultraestructurales (Shimizu and Tsujimoto, 2000; von Ahsen et al., 2000) (Fig. 14).

El primer miembro descrito de la familia Bcl-2 fue el proto-oncogen Bcl-2 (Bakhshi et al., 1985). Fue el primer proto-oncogen descrito cuya expresión bloqueaba la muerte celular inducida por múltiples estímulos fisiológicos y patológicos.

Los mamíferos expresan una familia entera de proteínas Bcl-2. Los miembros de esta familia de proteínas se caracterizan por poseer uno o varios dominios de homología Bcl-2 (BH), los cuales se corresponden con dominios α -hélice altamente conservados.

La familia Bcl-2 se divide en dos grandes grupos de acuerdo a su capacidad inhibidora o promotora de la apoptosis (Taylor et al., 2008) (Fig. 16). Incluye proteínas antiapoptóticas (como Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, A1 (Bfl-1), NR13 y Boo), y proteínas pro-apoptóticas (Bid, Bax, Bak, Bad y Bok). En general, las proteínas de esta familia se asocian en dímeros, y la respuesta celular a la señalización de muerte depende del ratio entre las proteínas pro-apoptóticas y las antiapoptóticas (Cai et al., 1998; Reed, 1997). Estas proteínas se localizan tanto en el citosol como en las membranas intracelulares (Riparbelli et al., 1995).

Los dos tipos de proteínas de la familia Bcl-2 comparten secuencias homólogas en sus diferentes regiones o dominios (BH1, BH2, BH3 y BH4).

a) Los miembros antiapoptóticos poseen los cuatro dominios conservados.

b) Los miembros pro-apoptóticos de la familia se dividen según la homología de secuencia en:

- Miembros que tienen homología solo en el dominio de muerte BH3, como serían las proteínas pro-apoptóticas Bid, Bad, Bik y Bim, Blk, Hrk, Bnip3, Bim_L y Noxa, (Danial and Korsmeyer, 2004). Se les denomina “BH3 only”. Estas proteínas necesitan la colaboración con los miembros de múltiples dominios para inducir apoptosis (Wei et al., 2001). Se ha propuesto una nueva subdivisión para el grupo BH3 (Letai et al., 2002) (Fig. 18): unos activarían directamente las proteínas pro-apoptóticas y otros actuarían indirectamente inactivando las proteínas antiapoptóticas.

- Proteínas con tres dominios homólogos (BH1, BH2 y BH3), pero no secuencia homóloga de BH4. Lo serían los miembros pro-apoptóticos Bax, Bak y Bok. Necesitan de un evento de activación antes de poder interactuar con las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L. Bax y Bak se encuentran formando monómeros en células viables (Wei et al., 2001). Bax se encuentra en el citosol o próximo a la membrana de diferentes orgánulos, mientras que Bak se halla en la mitocondria. Tras una señal de muerte celular, ambas proteínas sufren un cambio conformacional que les permite su oligomerización y, en el caso de Bax, su inserción en la membrana mitocondrial externa (Gross et al., 1998), y permitiría la salida de proteínas pro-apoptóticas del espacio intermembrana mitocondrial (Bellosillo et al., 2002; Wei et al., 2001).

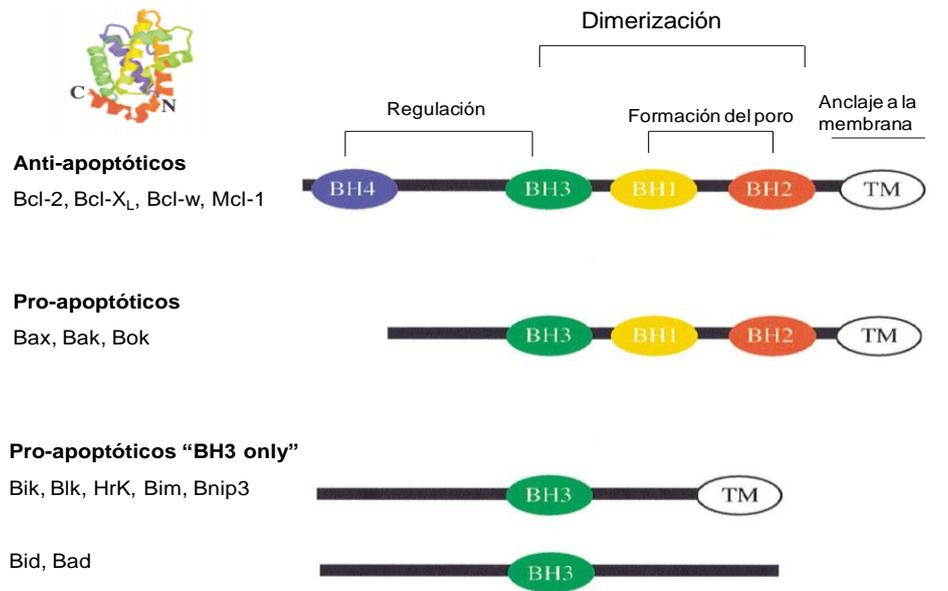


Figura 16. Esquema de los miembros de la familia Bcl-2 (tomado de (Zimmermann et al., 2001)).

El mecanismo preciso por el cual Bax y Bak promueven la liberación de proteínas del espacio intermembrana mitocondrial está en investigación. Uno de los modelos descritos propone que Bax y Bak formarían poros en la membrana mitocondrial externa (Gross et al., 1998; Jurgensmeier et al., 1998). Finalmente, se proponen mecanismos de permeabilización de la membrana mitocondrial externa mediante el cambio de la curvatura de la membrana y formación de poros lipídicos tras la inserción y oligomerización de estas proteínas (Basanez et al., 2002).

Los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 (como por ejemplo Bid) pueden ser secuestrados por los miembros antiapoptóticos (Bcl-2 y Bcl-X_L), dando lugar a interacción proteína-proteína y formación de dímeros.

Normalmente Bid funciona como proteína pro-apoptótica. Sin embargo, puede promover supervivencia y proliferación celular (Yin, 2006). Bid puede funcionar como forma truncada (tBid), y es más potente en inducir muerte celular que la forma completa. Un estudio *in vitro* demostró que tBid desencadena la oligomerización de Bax y Bak (Wei et al., 2001). Bid puede ser truncado y activado por caspasa-8 o bien por otras proteasas (Yin, 2006). Bid se transloca a la membrana mitocondrial y favorece la liberación de citocromo *c*, Smac/Diablo, Omi/HtrA2, endonucleasas G y AIF (van Loo et al., 2002). Asimismo, Bid es capaz de inducir despolarización mitocondrial y la generación de ROS (Ding et al., 2004; Zamzami et al., 1995).

En la mayoría de los tumores se produce una sobreexpresión de alguna de las proteínas de la familia Bcl-2 , por lo que se trata de buscar dianas terapéuticas (Lessene et al., 2008).

4.3.- PROTEÍNAS HEAT SHOCK

4.3.1.- Generalidades

Las HSPs (del inglés *Heat Shock Proteins*) inicialmente se caracterizaron como proteínas inducibles por estrés térmico (Pauli et al., 1992; Tissieres et al., 1974). No obstante, se ha observado síntesis de HSPs en presencia de otros estímulos adversos como la hipoxia, el estrés oxidativo, los metales pesados o el daño del DNA (Akerfelt et al., 2010).

Se definen como “chaperonas moleculares”, es decir, proteínas que se unen a otras proteínas controlando su plegamiento, su ensamblaje oligomérico, su transporte a compartimentos subcelulares o el equilibrio entre formas activas e inactivas de las mismas (Ellis, 2006; Hendrick and Hartl, 1995).

4.3.2.- Clasificación de las proteínas de estrés

Las proteínas de estrés, en sentido amplio, se clasifican en dos grandes grupos, a saber, las GRPs y las HSPs (Welch, 1991). Las GRPs responden a inhibición metabólica, como la carencia de glucosa (Locke, 1997).

HSPs y GRPs se subdividen en familias de acuerdo a su peso molecular. En concreto, las Hsps comprenden las siguientes familias: Hsp-10, Hsp-28, Hsp-32, Hsp-47, Hsp-60, Hsp-70, Hsp-90, Hsp-110 y ubiquitina. Las GRPs agrupan GRP-75, GRP-80 y GRP-100 (como revisiones véase (Locke, 1997) (Burdon, 1993)).

4.3.3.- Familia Hsp-70

La familia de las Hsp-70 son un grupo de ATPasas muy conservadas filogenéticamente, especialmente en su dominio N-terminal (ATPasa) y en el sitio de unión al sustrato (como revisiones véase (Ellis, 2006; Evans et al., 2010; Mayer and Bukau, 2005)). En mamíferos la familia Hsp-70 está compuesta por 5 miembros, con un tamaño aparente de 70 kDa codificados por 5 genes distintos. Dichos miembros son: *GRP-78*, *GRP-75*, *HSC-73*, *HSP-72* y *HST-70* (Locke, 1997).

La proteína Hsp-72 se denomina también genéricamente Hsp-70 por ser la más representativa y la más abundante de la familia. Se suele expresar a muy bajo nivel en situaciones normales, induciéndose fuertemente en respuesta al estrés, por ello se le llama proteína inducible (Tanguay et al., 1993).

Las proteínas recién sintetizadas bajo condiciones de estrés no pueden adoptar un plegamiento adecuado y permanecen unidas a la Hsp-70, la cual puede presentar las proteínas en conformaciones incorrectas a los lisosomas celulares para su posterior degradación (Chiang et al., 1989). Por el contrario, la HSC-73 se expresa de forma constitutiva y en cantidades elevadas en células no sometidas a estrés (Brown et al., 1993; Milarski and Morimoto, 1989).

A. Regulación de la expresión de Hsp-70

Los genes que codifican proteínas de estrés poseen en sus promotores una secuencia consenso altamente conservada, activadora en la transcripción. Esta secuencia, conocida como HSE (“*heat shock element*”), regula la expresión de estos genes por unión de factores de transcripción conocidos como HSFs (“*heat shock factor*”) (Akerfelt et al., 2010; Jurivich et al., 1992; Sorger, 1991)

En mamíferos se han identificado dos HSFs distintos, HSF-1 y HSF-2 (Anckar and Sistonen, 2011). El factor HSF-1 está constitutivamente presente en el citoplasma en forma monomérica o formando complejos con otras proteínas. Tras un factor de estrés, se homo-trimeriza, se transloca al núcleo y se une a secuencias específicas (HSE_S) en el promotor de los genes HSP, promoviendo así su expresión (Akerfelt et al., 2010). El HSF-1 es el responsable mayoritario de la respuesta celular a estrés, mientras que HSF-2 se activa por hemina y no parece jugar un papel fundamental en la respuesta a estrés (Locke, 1997).

B. Hsp-70 en apoptosis

Hsp-70 está implicada en cáncer, rechazo tisular y neurodegeneración. La inducción de Hsp-70 puede estar desregulada en cáncer, debido a una actividad alterada de HSF-1, lo que confiere ventaja de supervivencia a las células tumorales. Normalmente Hsp-70 tiene una función antiapoptótica debido a que es capaz de interactuar con múltiples componentes de las rutas apoptóticas dependiente e independiente de caspasas. Así, Hsp-70 modula Bcl-2, bloquea la apoptosis inducida por TNF α , la activación de caspa-

sas, la translocación de Bax, la ruptura de PPAR (Evans et al., 2010; Sherman and Multhoff, 2007) e impide la activación de Apaf-1 (Ravagnan et al., 2001) (Fig. 17).

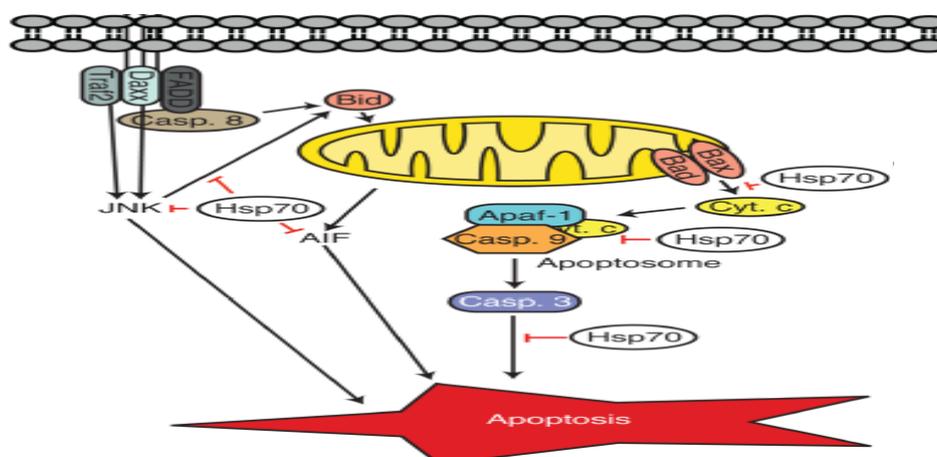


Figura 17. Interacción de Hsp-70 con elementos de la ruta apoptótica (Tomado de (Evans et al., 2010)).

Algunos polifenoles son capaces de modular la actividad de Hsp-70 con resultados variables, según el polifenol y el modelo celular utilizado. Por ejemplo, el resveratrol actúa inhibiendo Hsp-70 en células K562 (Chakraborty et al., 2008). Por su parte, la quercetina inhibe Hsp-70 en cáncer de colon (Koishi et al., 1992). EGCG puede suprimir la activación de Hsp-70 y Hsp-90 *in vitro* e *in vivo* (Tran et al., 2010). La genisteína no afecta a la activación de Hsp-70 en células epidermoides humanas (Kiang, 2003).

4.4.- CICLO DE PROLIFERACIÓN CELULAR Y SU REGULACIÓN

La división celular simétrica en organismos eucariotas engloba los procesos mediante los cuales una célula incrementa su masa proteica y duplica su contenido en DNA para dar lugar a dos células hijas iguales.

Durante todo el ciclo celular hay una coordinación entre estos procesos, de manera que la separación no debe tener lugar hasta que el DNA esté duplicado, y el tamaño de la célula previo a la separación de las dos hijas debe ser el adecuado para mantener unas dimensiones adecuadas en la generación de descendencia (Everitts and Coller, 2012; Schafer and Hawkins, 1998). El control básico del ciclo celular se da a nivel de los puntos de control o *checkpoints*, que son rutas de control bioquímico que aseguran el orden y tiempo de progresión de los eventos, como la replicación del DNA y la segregación cromosómica (Hartwell and Weinert, 1989; Lukas et al., 2004; Pietsenpol and

Stewart, 2002). Defectos en los *checkpoints* originan mutaciones en genes, daños cromosómicos y aneuploidías, lo cual puede contribuir a la tumorigénesis (Vermeulen et al., 2003). Existen varios puntos de control:

-Punto de control en G1. Regula que el tamaño de la célula sea el adecuado para continuar con la división, así como la existencia de un entorno favorable (nutrientes).

-Punto de control en S. Se activa por factores genotóxicos, generando un retraso en el paso por la fase S, debido a una tasa de replicación del DNA menor.

-Punto de control en G₂/M. Chequea que el tamaño de la célula es el correcto para continuar con la división, que el entorno sea favorable y comprueba que el DNA se haya replicado y reparado correctamente.

-Punto de control en fase M. Chequea la correcta colocación y unión de los cromosomas al huso mitótico en la placa ecuatorial.

El paso de una fase a otra del ciclo celular está controlado por Cdks, enzimas con actividad serina/treonina quinasa, cuya actividad depende a su vez de la presencia de una subunidad reguladora denominada ciclina (ver Fig. 18) (como revisiones véase (Nurse, 1997; Pines, 1994a, b). Las Cdks, además, se regulan por fosforilación y por la unión a inhibidores específicos.

Los agentes que causan daño en el DNA previenen la progresión del ciclo celular de G₂ a mitosis, provocando parada de las células en fase G₂ para poder reparar el daño y evitar la formación de células con alteraciones genómicas.

Por otra parte, el ATO podría afectar a la fase G₂/M, pero los efectos son variados según el tipo celular (McCollum et al., 2005). Los polifenoles tienen efectos muy variados sobre el ciclo celular, dependiendo del agente y del tipo celular utilizado.

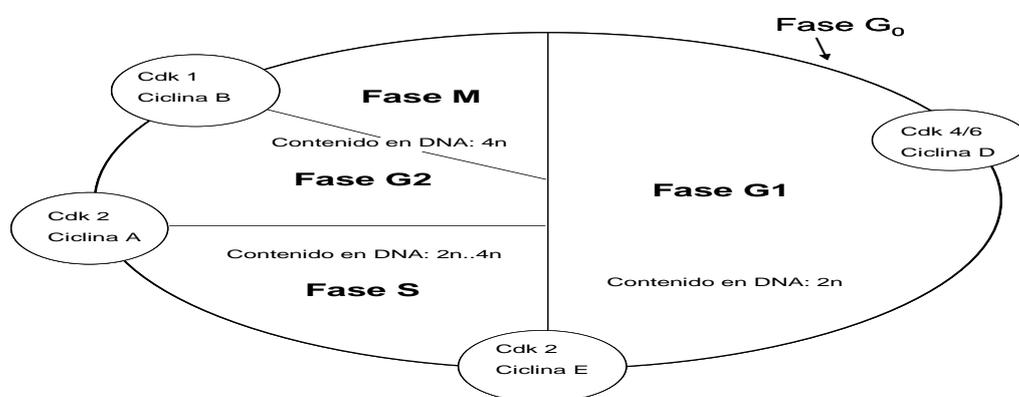


Figura 18. Control de ciclo celular por Cdks.

5.- SEÑALIZACIÓN CELULAR

5.1.- ESTRÉS OXIDATIVO

5.1.1.- Generalidades

La mitocondria es el sitio principal de formación de especies reactivas de oxígeno o ROS (del inglés *Reactive Oxygen Species*), como subproducto de la respiración mitocondrial que se produce en la cadena respiratoria (Kroemer, 1998). El mecanismo por el que se producen ROS es mediante el escape de electrones en el flujo de la cadena respiratoria. De este modo, en la cadena respiratoria de todo sistema aerobio, además de las reacciones enzimáticas que llevan a la formación de H₂O a partir de oxígeno, también se producen intermediarios reactivos del oxígeno. Entre ellos, los más importantes son el anión superóxido (O₂⁻), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el radical hidroxilo (OH[•]) y el peroxinitrito (ONOO⁻). Se puede producir una reacción no enzimática de reducción incompleta del O₂ para formar el anión superóxido, que posteriormente puede formar peróxido de hidrógeno (Drose and Brandt, 2012). Se considera que entre el 1-5% del O₂ que consume la célula en condiciones normales formará H₂O₂ (Chance et al., 1979). Pese a que tanto el O₂⁻ como el H₂O₂ son moléculas poco reactivas, su peligrosidad radica en el potencial de formación del radical hidroxilo, que es muy agresivo.

Además de la mitocondria, existen otras estructuras celulares donde pueden producirse ROS, como el retículo endoplasmático, la membrana plasmática o la membrana nuclear. Así, bajo determinadas agresiones ambientales originadas por toda clase de estímulos como las infecciones microbianas y virales, los xenobióticos, las toxinas provenientes de la dieta y la hipoxia, se producen ROS mediante las NADPH asociadas a membrana. Pueden derivarse también de procesos bioquímicos en los que participan ácidos grasos como el ácido araquidónico.

Los ROS son potencialmente tóxicos para la célula. En humanos, una sobreexpresión de ROS está generalmente implicada en el desarrollo de patologías como cáncer, diabetes tipo II, arterioesclerosis, procesos inflamatorios crónicos, isquemia y enfermedades neurodegenerativas (como revisión véase (Droge, 2002)).

Normalmente debe haber un balance entre la producción de ROS y su eliminación por sistemas antioxidantes para que la célula se encuentre en homeostasis (Sies and Cadenas, 1985). Si se rompe el equilibrio debido a un aumento de los oxidantes o una disminución de los antioxidantes, se producen situaciones deletéreas.

5.1.2.- Papel fisiológico de los ROS

En condiciones normales, los ROS desempeñan funciones fisiológicas importantes en la célula (como revisión general véase (Droge, 2002)).

-Señalización celular: Los ROS son importantes moléculas de señalización en plantas y animales (Hancock et al., 2001). Varias citoquinas, factores de crecimiento o neurotransmisores utilizan los ROS como segundos mensajeros (Brookes et al., 2002). La capacidad de reacción de los ROS con grupos sulfhídricos de las proteínas permite regular la actividad de varias enzimas que participan en importantes funciones celulares, como las ATPasas transportadoras de Ca^{+2} , colagenasas, proteína quinasa C, tirosina quinasa o receptores de membrana (Bae et al., 2011; Huang et al., 1996). Además, se ha observado que los ROS pueden activar la p38 MAPK (Huot et al., 1998), p53 o regular múltiples procesos biológicos entre los que se encuentra la apoptosis (Amran et al., 2007; Galan et al., 2000; Sanchez et al., 2008).

-Control de la actividad transcripcional: Diversos factores de transcripción son sensibles a los intermediarios del oxígeno, entre ellos el NF- κ B (Schreck et al., 1991), AP-1 (Karin et al., 1997) y los Nrfs.

-Defensa contra infecciones: los fagocitos producen grandes cantidades de ROS para destruir a patógenos invasores (Thomas and Brugge, 1997).

-Control de proliferación: distintas líneas celulares producen ROS en respuesta a estímulos proliferativos (Burdon, 1995). Además, los ROS juegan un papel importante en la progresión del ciclo celular (Boonstra and Post, 2004) y tienen capacidad de inducir parada en G_2 en células cancerosas deficientes en p53 (Macip et al., 2006).

5.1.3.- Efectos deletéreos de los ROS

Cuando la concentración de ROS es alta, debido a una superproducción o acumulación excesiva por fallo de los sistemas antioxidantes, se origina en la células un desequilibrio del balance redox conocido como estrés oxidativo (Cadenas, 1989).

Las ROS, debido a su elevada reactividad, pueden causar muerte celular, siendo además potencialmente tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas. Las ROS pueden originar enfermedades cardiovasculares, enfermedades del sistema inmune, cataratas, enfermedades cerebrales e incluso, el mismo proceso de envejecimiento.

Los efectos de los ROS sobre macromoléculas incluyen:

- **DNA.** La capacidad mutagénica de los ROS radica en su capacidad de modificación química del DNA, principalmente por el radical hidroxilo (Marnett, 2000). Un gran número de alteraciones, como rotura del DNA, uniones irreversibles entre el DNA y proteínas, oxidación de purinas, etc, se deben a la reacción con ROS, principalmente OH[•]. El DNA es muy susceptible al efecto de los ROS cuando se está replicando. Por tanto, las células con alta capacidad proliferativa son más vulnerables al ataque de los ROS. El DNA mitocondrial, debido a encontrarse en un importante entorno productor de ROS y carecer de proteínas asociadas (histonas), es especialmente vulnerable al efecto de los ROS (Shoji et al., 1995).

-**Lípidos.** La oxidación de lípidos de membrana (peroxidación lipídica) genera unas membranas más rígidas y favorece la pérdida de la permeabilidad selectiva. Los ácidos grasos poliinsaturados son las dianas preferentes.

-**Proteínas.** Los ROS reaccionan con las proteínas a través de los residuos de metionina y cisteína, cuya oxidación origina la formación de puentes disulfuro intra o intermoleculares. Esto provoca la formación de agregados proteicos o proteínas poco flexibles, causando de este modo la inactivación de diversas enzimas. Por ejemplo, las caspasas poseen en su centro activo cisteínas sensibles a la oxidación. Se ha propuesto la hiperoxidación y consiguiente inactivación de las caspasas como responsables del bloqueo de la apoptosis y derivación alternativa de las células hacia necrosis, en condiciones de fuerte estrés oxidativo que no permiten la adecuada activación de la maquinaria apoptótica (Hampton and Orrenius, 1997; Samali et al., 1999).

5.1.4.- Generación de muerte celular por ROS

Los ROS de origen mitocondrial son desencadenantes de la muerte celular en numerosos tipos celulares y muchos inductores de apoptosis pueden elevar la producción de ROS (Green and Reed, 1998). Se sabe que una elevada concentración de ROS puede desencadenar la apertura del mPTP (Ott et al., 2007). Además, el incremento de las defensas antioxidantes de las células o la adición de antioxidantes exógenos pueden disminuir la tasa de apoptosis en múltiples modelos celulares (Han et al., 2008b; Kinningham et al., 1999; Sanchez et al., 2008).

5.1.5.- Mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo

Las células poseen un amplio sistema de detoxificación y de defensa antioxidante para protegerse de los efectos nocivos del estrés oxidativo.

A.- Detoxificación

Los mecanismos que promueven la reducción de ROS o estimulan su detoxificación ocurren en dos fases. En la fase I, en la cual participan principalmente enzimas de la familia de los citocromos P450, se metabolizan carcinógenos y xenobióticos y ocurren reacciones de óxido-reducción. Durante la fase II, varias enzimas reducen la electrofilidad de los metabolitos carcinógenos y xenobióticos mediante su conjugación enzimática con ligandos endógenos, como el glutatión (GSH) y el ácido glucorónico. Algunas de las enzimas que participan en la fase II son la flavoproteína NADPH quinona oxidoreductasa I (NQO1), glutatión S transferasa (GST), UDP-glucoronosil transferasa o γ -glutamilcisteinasintetasa (γ -GCS).

B.- Sistema antioxidante: está formado por enzimas y por moléculas no enzimáticas.

- Enzimas antioxidantes: Las principales en eucariotas son la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa (GPx). Sus funciones quedan resumidas en la siguiente tabla:

ENZIMA	SUSTRATO	PRODUCTO
Catalasa	H_2O_2	$H_2O + O_2^-$
Superóxido dismutasa	O_2^-	$H_2O_2 + O_2^-$
Glutatión peroxidasa	$ROOH + GSH$	$ROH + H_2O + GSSG$

- Moléculas antioxidantes no enzimáticas: producidas por las propias células o aportadas por la dieta. Son sustancias capaces de neutralizar un único radical libre por molécula y sólo actúan a concentraciones elevadas. Hay dos grupos:

a) Moléculas reductoras de pequeño tamaño e hidrosolubles. Dentro de ellas se encuentra el ascorbato o vitamina C, diferentes compuestos de selenio, ácido lipoico y ubiquinonas. Pueden actuar como pro-oxidantes y antioxidantes. Así, pueden autooxidarse, especialmente en presencia de metales, para producir ROS.

b) Vitaminas liposolubles A (β -caroteno), D, E (α -tocoferol) y K.

- GSH (γ -glutamilcisteinglicina): es la principal defensa no enzimática de la célula y se encuentra a concentraciones del orden de milimolar en todas las células aerobias.

Hay síntesis *de novo* de GSH en la célula utilizando glutamylcisteína sintetasa, enzima limitante, a partir de aminoácidos tomados del medio intracelular pero también existe un sistema de regeneración de GSH mediante la enzima glutatión reductasa (GR). Esta enzima se encarga de reducir el glutatión oxidado (GSSG), utilizando $\text{NADPH} + \text{H}^+$ como cofactor de la reacción y donantes de protones. De este modo, el glutatión oxidado puede ser reciclado y reconstituido (Fig. 18).

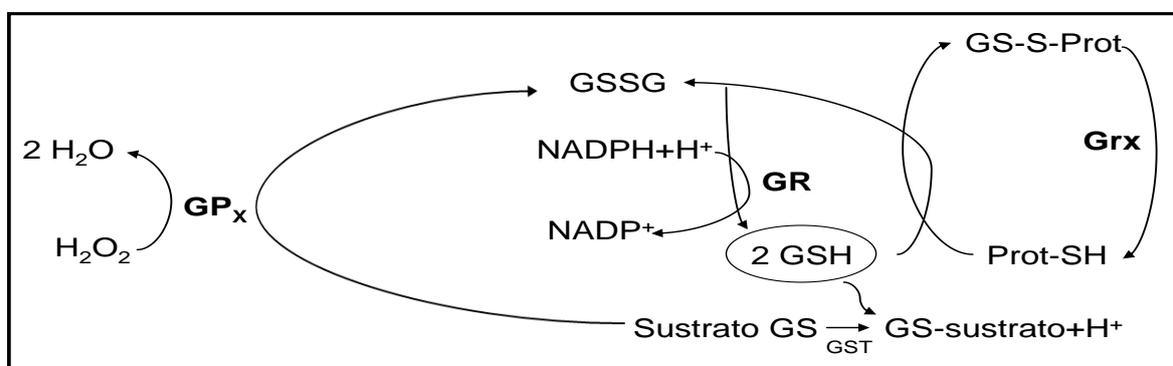


Figura 18. Papel protector del GSH en la célula.

Las principales funciones del GSH son:

-Eliminación de ROS: Esto puede llevarse a cabo mediante una reacción directa entre el GSH y los ROS o mediante una reacción catalizada por la enzima GPx.

-Mantenimiento de grupos tiólicos de las proteínas: El glutatión, mediante su oxidación, puede formar puentes disulfuro reversibles con las proteínas formando disulfuros mixtos (proteína-SSG). Esto representa una forma de protección frente a un daño irreversible de las proteínas en situación de estrés oxidativo intenso. La formación de disulfuros mixtos es reversible por acción de glutaredoxina (Grx).

-Detoxificación de xenobióticos: se realiza por conjugación directa al agente estresante, en el caso de sustancias muy electrofílicas, o a través de una reacción catalizada por las enzimas glutatión transferasas (GSTs).

A pesar de ser la mitocondria el sitio principal de producción de ROS, el GSH no puede ser sintetizado en este orgánulo. Por ello, el GSH ha de ser transportado a la mitocondria desde el citosol, proceso esencial para proteger las proteínas mitocondriales de los ROS producidos *in situ* y para mantener íntegra la membrana mitocondrial. Por

ello, la eliminación del GSH residente en la mitocondria supone unos efectos altamente perjudiciales para la célula (Reed, 1990).

5.1.6.- ROS y cáncer

Se sabe que las células cancerígenas tienen un estrés oxidativo basal mayor que el de las células normales, bien por sobreproducción de ROS o por disminución de antioxidantes. Este estrés oxidativo favorece el crecimiento del tumor. Se han propuesto varias hipótesis sobre el incremento de los niveles de ROS en células cancerígenas tales como disfunción mitocondrial, metabolismo aberrante o pérdida de p53. La expresión de genes asociados a transformación celular puede inducir producción de ROS, produciéndose tumorigénesis (Verrax et al., 2011).

Por otro lado, un incremento parcial en la oxidación es más susceptible de producir muerte en células tumorales que en normales. En este mecanismo se fundamentan las terapias de oxidación (Verrax et al., 2008); algunas drogas antitumorales tienen una acción mayor en un ambiente prooxidante, por ejemplo el ATO.

5.2.- PROTEÍNAS QUINASAS

A pesar de que la apoptosis es un proceso intrínseco inherente a todos los tipos celulares, ésta puede ser regulada por factores extrínsecos como hormonas, factores de crecimiento, receptores de superficie de la membrana y estrés celular, los cuales darán lugar a alteraciones en el estado de fosforilación y de este modo en la actividad de proteínas pro o antiapoptóticas críticas. Este proceso viene mediado por la actividad de las proteínas quinasas (Cross et al., 2000).

5.2.1.- MAP-QUINASAS

La superfamilia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés *Mitogen Activated Protein Kinase*) es un conjunto de serín/treonin quinasas que actúan como transductoras de señales originadas por estímulos extracelulares o por una respuesta de estrés (Su and Karin, 1996). Cada una de estas MAP quinasas está activada por una MAP quinasa quinasa (MKK) específica que fosforila en residuos de treonina y tirosina, y que es desfosforilada e inactivada por proteínas fosfatasas. Por lo general, la vía de señalización de la MAPK incluye tres componentes, que son las MAP3Ks (MAP

quinasa quinasa quinasa), las MAP2Ks (MAP quinasa quinasa) y las MAPKs. Así, cuando MAP3K se fosforila estimula MAP2K, que a su vez estimula MAPK por fosforilación (Chang and Karin, 2001). La MAP3K es una quinasa serina-treonina que actúa como molécula de contacto pues recibe señales activas desde los receptores membranales, se fosforila y entonces activa su sustrato, la MAP2K. La MAP2K es una quinasa que fosforila su sustrato, la MAPK, en los residuos treonina y tirosina. La MAPK es también una quinasa serina-treonina que se fosforila y activa proteínas citoplasmáticas, transmitiendo la señal del citoplasma al núcleo (Hagemann and Blank, 2001). El amplio rango de las funciones de las MAPK está mediado por la fosforilación de diferentes sustratos, que incluyen fosfolipasas, proteínas del citoesqueleto, factores de transcripción, varias proteínas quinasas y proteínas de la maquinaria de apoptosis, etc.

Las MAPKs están relacionadas con la regulación de diversas respuestas celulares tales como la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (como revisiones véase (Anderson, 1997; Cross et al., 2000; Davis, 1993; Reddy et al., 2003; Seger and Krebs, 1995; Treisman, 1996; Yen et al., 1999)).

Las tres principales rutas de MAPKs que han sido identificadas son ERK p44/42 (*Extracellular Signal- Regulated Kinases*), JNK (*c-JunN-terminal Kinase*) y p38 (ver Fig. 19).

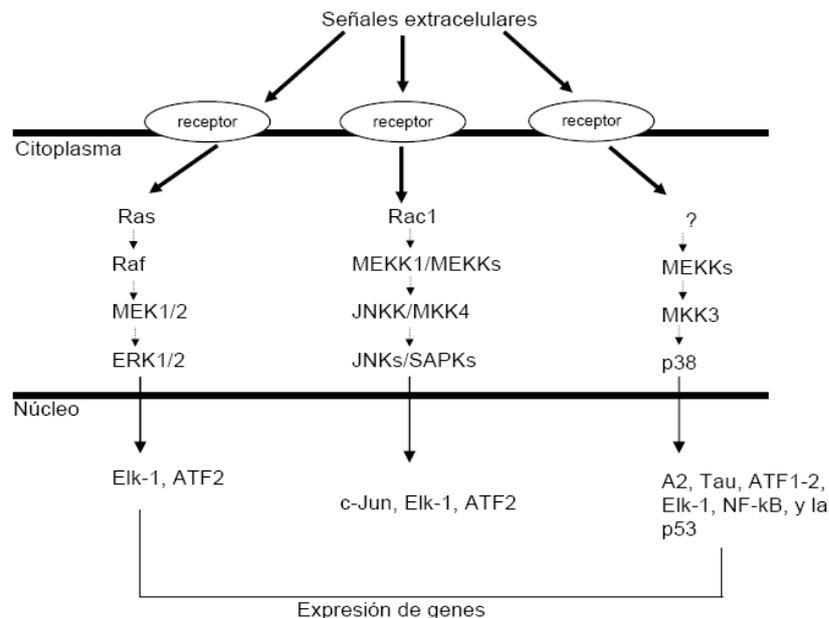


Figura 19. Transducción de señales de los distintos grupos de MAPKs: ERK1/2, JNKs y p38.

A) ERK 1/2 (p42/p44)

Normalmente, la activación de ERK1 y ERK 2 (ERK1/2) se realiza a través de diversos receptores mitogénicos (como EGFR o IGFR, etc.).

La activación de ERK está relacionada con la activación de oncogenes como Ras y Raf-1 y con la activación de MEK, quinasa específica que fosforila a ERK1/2. Después de su activación, ERK1/2 puede fosforilar una gran cantidad de proteínas localizadas en el citoplasma o en el núcleo, como por ejemplo los factores de transcripción Elk1, ATF-2, Ets, TAL-1 (Persons et al., 1999; Seger and Krebs, 1995).

La ruta Ras/Raf/MEK/ERK está frecuentemente desregulada y sobreactivada en células tumorales, contribuyendo a la inducción y progresión del fenotipo tumoral y provocando resistencia a la acción de fármacos antitumorales (Rodríguez-Berriguete et al., 2012).

Las ERK1/2 están normalmente relacionadas con la activación de la proliferación celular, por lo que suelen tener un efecto antiapoptótico. Se sabe que las ERKs juegan un papel muy importante en la regulación del ciclo celular (Chambard et al., 2007; Tang et al., 2002). La inhibición de las MEK/ERK incrementa la apoptosis en células de cáncer de colon HT29 y en células leucémicas AML-3 inducidas por diversas drogas anticancerígenas (Rice PL, 2004; Wu et al., 2004). Estas observaciones sugieren que la activación de las ERKs favorece la supervivencia en células tratadas con drogas quimioterapéuticas.

Sin embargo, en algunos modelos experimentales la inhibición de las ERKs atenúa la inducción de apoptosis por drogas antitumorales, tales como el cisplatino (Hayakawa et al., 1999; Persons et al., 1999). Además, el agente PMA incrementa la acción apoptótica del ATO a través de la activación de las ERKs (Fernandez et al., 2004).

Por tanto, la relación de la activación de las ERKs y la señalización a apoptosis puede ser dependiente del tipo celular y del estímulo.

También se ha estudiado la implicación de las ERK1/2 en procesos de diferenciación (Kang et al., 1999; Miranda et al., 2007; Yen et al., 1999).

B) JNK/SAPK

La JNK, también llamada SAPK (*Stress- Activated Protein Kinase*), es activada principalmente por estrés medioambiental, como la luz UV, tratamientos de choque térmico,

hiperosmolaridad, o por citoquinas inflamatorias tales como TNF α y Fas ligando. La quinasa que activa JNK es activada por MEKK2 y, a su vez, la JNK fosforila varios factores de transcripción tales como c-Jun, Elk-1 y ATF2 (Seger and Krebs, 1995; Treisman, 1996).

JNK puede tener un efecto pro-apoptótico o antiapoptótico, o no tener ninguna función en la apoptosis (Dhanasekaran and Reddy, 2008; Jin and El-Deiry, 2005).

Se ha observado ocasionalmente la implicación de esta quinasa en procesos de diferenciación, por ejemplo, en la diferenciación inducida en células HL-60 y U-937 en presencia de 1,25- dihidroxivitamina D3 (Wang et al., 2005; Wang et al., 2003).

C) p38

El primer miembro característico de esta familia fue p38 α , que se describió como una quinasa de 38 kDa que se fosforilaba intensamente en un residuo tirosina quinasa en presencia de lipopolisacárido, por estrés osmótico (Han et al., 1994), estrés oxidativo (Zhuang S, 2000), o por múltiples agentes de diferente índole (Nebreda and Porras, 2000; Porras et al., 2004).

Fue identificada como una serín-treonin quinasa involucrada en la fosforilación y activación de la proteína Hsp-27. Posteriormente se han identificado tres isoformas más, p38 β (Stein et al., 1997), p38 γ (Mertens et al., 1996) y p38 δ (Wang et al., 1997). De estas isoformas, la α y β presentan un 75% de homología, mientras que la γ y δ son relativamente distintas (Ono and Han, 2000). La p38 α y β se encuentran en todos los tejidos, mientras que p38 γ y δ son diferencialmente expresadas. Todas son activadas por la misma quinasa, MKK3 y MKK6 (Ono and Han, 2000).

La mayoría de los estímulos que activan la JNK/SAPK inducen también la cascada de p38. Algunos sustratos de la p38 son las fosfolipasas citosólicas A2, Tau, los factores de transcripción ATF1-2, Elk-1, NF-kB, y p53 (Roux and Blenis, 2004).

Las proteínas de la familia de p38 se activan por la mayoría de los agentes ambientales que causan un estrés celular así como por citoquinas inflamatorias, pero también los estímulos no estresantes pueden activarlas, regulando las funciones celulares como la proliferación, diferenciación y apoptosis (Porras et al., 2004).

El papel de p38 en apoptosis depende del tipo celular y del estímulo (Nebreda and Porras, 2000). Puede jugar un papel pro-apoptótico en unos sistemas celulares y antiapoptótico en otros. Así, se ha descrito que la activación de p38 previene la apopto-

sis a través de la regulación de la actividad de diferentes factores de transcripción (Okamoto et al., 2000; Park et al., 2002). Por otro lado, la p38 puede tener función proapoptótica por ejemplo en tratamientos con $TNF\alpha$ (Valladares et al., 2000), agentes oxidantes (Dolado et al., 2007) y ATO en células leucémicas (Amran et al., 2007; Giasis et al., 2006). Se ha observado cómo la activación de p38 por un metabolito intermediario de la genisteína provoca parada en G_2/M en células tumorales de mama (Nguyen et al., 2006), así como en células leucémicas (Sanchez et al., 2008).

Diversos estudios han demostrado que la activación de p38 ejerce una función reguladora en procesos de diferenciación en algunos modelos celulares tales como neuronas (Okamoto et al., 2000) y células mieloides (Yuo, 2001).

5.2.2.- Ruta PI3K/Akt

La fosfatidil inositol 3 Kinasa (PI3K) es un heterodímero compuesto por una subunidad catalítica y otra reguladora llamada p85 que fosforila fosfolípidos de inositol (PIs). Hay tres clases de PI3K (I-III) (Willems et al., 2012).

La activación de PI3K puede ocurrir a través de Ras activado o directamente por algunos receptores tirosina quinasa (RTKs), que responden a varios factores de crecimiento y citoquinas. La activación de estos receptores de tirosina kinasas conduce a la autofosforilación de la porción intracelular de los mismos, los cuales interaccionan con la subunidad reguladora de PI3K. Dicha subunidad puede fosforilar PIs pudiendo así generarse varios fosfolípidos como $PI(3,4)P_2$ o $PI(3,4,5)P_3$.

PIP_3 puede interaccionar con proteínas de señalización intracelular que poseen dominios PH, como por ejemplo *Sos*, ciertas proteínas quinasas C (PKCs) o la quinasa B (PKBs), también llamada Akt. Esta quinasa es reclutada a la membrana plasmática por PIP_3 y puede ser activada mediante fosforilación por PDK1, la cual se encuentra en la cara citosólica de la membrana plasmática. Una vez Akt ha sido fosforilado, PDK1 regresa al citoplasma donde puede fosforilar diversas proteínas implicadas en la supervivencia y en la proliferación, así como en la síntesis de proteínas.

Las actividades quinasas son reguladas por las fosfatasas. Así, PTEN desfosforila PIP_3 .

La activación de Akt produce un incremento en la supervivencia celular, proliferación, crecimiento y metabolismo.

Las dianas de Akt pueden ser clasificadas en tres grupos: proteínas apoptóticas, factores de transcripción, y otras proteínas quinasas. Así, Akt fosforila Bad y caspasa-9, inhibiendo su actividad apoptótica y promoviendo la supervivencia celular (Song et al., 2005). Los factores de transcripción pueden bien ser activados o inhibidos por Akt. Akt fosforila los factores de transcripción NF- κ B, HIF-1 α y CREB, lo que conlleva un incremento en la transcripción de genes antiapoptóticos. En cuanto a otras quinasas diana, Akt fosforila mTOR (del inglés *mammalian Target Of Rapamycin*), quinasa clave en la regulación de la apoptosis, y activa proteínas de regulación del ciclo celular o proteínas de crecimiento. Por su parte, Akt inactiva los factores de transcripción FOXO (familia Forkhead) (Brunet et al., 1999) y p53 (Zhou et al., 2001).

La vía PI3K/Akt está frecuentemente desregulada y constitutivamente activada en células tumorales (Vivanco and Sawyers, 2002), lo que puede contribuir a la progresión del ciclo celular, disminuir la apoptosis o incrementar las capacidades metastásicas de las células cancerígenas (Borlado et al., 2000; Paez and Sellers, 2003). Ello genera también resistencia a la acción de agentes antitumorales.

Por ello, una estrategia contra el cáncer sería el desarrollo de inhibidores de la ruta PI3K/Akt. La primera generación de inhibidores de Akt son LY294002, un inhibidor reversible de mTOR y PI3K, y wortmannina, un inhibidor irreversible de todas las formas de PI3K. Ambos son efectivos en el tratamiento de xenotransplantes de cáncer pero su desarrollo está limitado por una excesiva toxicidad. Recientemente se han desarrollado nuevos inhibidores de PI3K, algunos de los cuales están en fase I y II (Qiao et al., 2013).

5.3.- FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B

El factor de transcripción NF- κ B es un factor de supervivencia celular presente en la mayoría de las células. Está implicado en varios procesos celulares, como inflamación, respuesta inmune, regulación del ciclo celular, apoptosis y oncogénesis (como revisiones véase (Ghosh and Karin, 2002; Pahl, 1999)).

En humanos, la familia comprende p50/p105 (NF- κ B1), p52/p100 (NF- κ B2), p65 (RelA), c-Rel y RelB. La forma más común de NF- κ B es el heterodímero de NF- κ B p65: p50 (Thanos and Maniatis, 1995).

En la mayoría de tipos celulares, la proteína NF- κ B está inactiva, al estar unida a las proteínas inhibitorias I κ B (por ejemplo, I κ B α , β , γ y ϵ) en el citoplasma. Diferentes estímulos físicos y químicos activan una multisubunidad de la quinasa I κ B (IKK), la cual fosforila y dispara la degradación de I κ B- α (Muller et al., 1995; Thanos and Maniatis, 1995). Por tanto, la activación de NF- κ B se debe a la fosforilación de sitios específicos así como por la degradación de su inhibidor, I κ B. Una vez activada, NF- κ B se transloca al núcleo, donde modula la transcripción de varios genes por unirse a secuencias de consenso específicas de DNA. Las modificaciones directas de NF- κ B a través de la fosforilación y la acetilación también modulan su actividad transcripcional.

Según experimentos *in vitro*, la activación de NF- κ B juega un papel muy importante en la protección frente a la apoptosis (Beg and Baltimore, 1996) al activar la expresión de genes antiapoptóticos (Kane et al., 1999; Song et al., 2005). Algunos genes inducidos por NF- κ B incluyen inhibidores de caspasas, la familia de proteínas Bcl-2 y moléculas de señalización. Además, NF- κ B inhibe la señalización vía receptor de TNF α y de JNK (como revisiones véase (Pahl, 1999; Pickering et al., 2007)).

La activación constitutiva de NF- κ B en muchos tipos de tumores sólidos o su activación inducible por drogas antitumorales provoca resistencia a la apoptosis y por ello reduce la eficacia de los tratamientos terapéuticos. En sentido opuesto, la inhibición de NF- κ B por diferentes agentes incrementa la sensibilidad de los tumores al tratamiento con drogas citostáticas o a radiación *in vitro* e *in vivo* (Arlt and Schafer, 2002). Sería el caso de muchos polifenoles, que presentan capacidad de potenciar la apoptosis debido a su capacidad de inhibir NF- κ B, en la mayoría de los casos como consecuencia de la bajada en los niveles de Akt (Kang et al., 2011).

OBJETIVOS

El objetivo global de esta Tesis Doctoral consiste en el estudio de la capacidad quimiosensibilizadora de algunos polifenoles usados en combinación con las drogas mitocondriotóxicas trióxido de arsénico (ATO) y lonidamina, en modelos de células leucémicas. En concreto, se analizará:

Bloque I. Como estudio preliminar, análisis general de la acción citostática (ciclo celular) y citotóxica (apoptosis y necrosis) del ácido gálico, genisteína, quercetina, epigallocatequina-3-galato, naringenina, curcumina y resveratrol por sí solos y en combinación con ATO y lonidamina, en el modelo de células leucémicas mieloides U-937.

Bloque II. Dada su especial actualidad y relevancia, profundizamos en la acción quimiosensibilizadora de la curcumina y el resveratrol, analizando:

1.- *Generación de muerte celular*, en distintas condiciones de tratamiento y con diferentes modelos de células leucémicas.

2.- *Disfunción mitocondrial*, medida por modulación del potencial de membrana mitocondrial y activación de componentes de la vía ejecutoria intrínseca.

3.- *Generación de estrés oxidativo* como mediador de la muerte celular: medida de alteraciones en contenido de GSH y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), y acción protectora de agentes antioxidantes.

4.- *Señalización de la muerte celular por proteínas quinasas*: modulación de la actividad de MAPKs y Akt, y acción de inhibidores farmacológicos de estas quinasas.

5.- *Otros factores moduladores*: activación de NF- κ B y expresión de la proteína de estrés Hsp-70.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

■ MATERIAL BIOLÓGICO

1. Líneas celulares

Las líneas celulares leucémicas utilizadas en este trabajo son:

a) Células U-937 de naturaleza promonocítica humana. Asimismo se usaron células U-937 transfectadas con Bcl-2.

b) Células HL-60 de naturaleza promielocítica humana.

c) Células NB4: células mieloides agudas.

d) Células K562: células eritroblásticas.

e) Células THP-1: células promonocíticas humanas.

f) Células Jurkat: células linfoides T.

g) Células RPMI 8866: células linfoides B.

2. Condiciones de cultivo celular

Los medios de cultivos utilizados fueron el RPMI-1640 (Life Technologies, Inc.) para todas las líneas celulares, a los que se añadieron los siguientes compuestos:

- Gentamicina (Invitrogen)..... 0,025 mg/ml
- Penicilina (Invitrogen) 60 U/ml
- Suero fetal bovino (FBS) descomplementarizado (Invitrogen).....10% (v/v)

El suero fetal bovino se descomplementarizó por calentamiento a 56°C durante 30 minutos.

Los cultivos fueron realizados en una estufa termostata a 37°C, en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂, y se mantuvieron en crecimiento exponencial por sucesivos pases cada 24 ó 48 horas.

Para evitar manipulaciones que podrían afectar al metabolismo celular basal o a la activación de quinasas, 24 horas antes de los tratamientos las células se ajustaron a 100.000 células/ml (para tratamientos de 16-24 horas) o 200.000 células/ml (para tratamientos de 3-6 horas) usando una mezcla de medio condicionado (sobrenadante del cultivo) y de medio fresco, permaneciendo el cultivo sin alterar hasta el momento de la

administración de las drogas. En tratamientos más largos, para evitar que las células alcancen densidades de saturación o se produzca un consumo total de nutrientes, tras el segundo día de tratamiento el cultivo se suplementa con un volumen igual de medio fresco, conteniendo en su caso las correspondientes drogas.

■ MATERIAL NO BIOLÓGICO

1. Agentes y tratamientos celulares

Se han usado distintos agentes y tratamientos inductores y/o moduladores de muerte celular y diferenciación que se detallan a continuación.

- Ácido gálico: Sigma. P.m: 170,12. El stock a 100 mM se preparó en DMSO y se almacenó a -20°C. Se usó a concentraciones de 20-100 μ M.

- Ciclosporina A: Sigma. P.m: 1202,61. El stock a 20 mM se preparó en DMSO y se almacenó a -20°C. Se usó a una concentración de 5 μ M.

- Cisplatino (CDDP): Sigma. P.m.: 333,0. El stock se preparó en agua caliente a 65°C, a una concentración de 3,3 mM, y quedó almacenado a -20°C y protegido de la luz. La concentración de uso fue de 1-8 μ M para tratamientos de 24 horas y a 2 μ M en tratamientos de 72 horas. Antes de su uso, el CDDP se esterilizó por filtración, utilizando para ello filtros de 0,22 μ m (GSW PO2500, Millipore).

- Citarabina: Sigma. P.m.: 243,22. El stock se preparó a una concentración de 10 mM. Antes de su utilización, se procedió a su esterilización por filtración usando filtros de 0,22 μ m (GSW PO2500, Millipore). Se usó a concentraciones de 5-10 μ M.

- Curcumina: Sigma. P.m.: 368,38. El stock se preparó en DMSO a una concentración de 20 mM y se almacenó a -20°C. Se usó a concentraciones de 2-15 μ M.

- Epigallocatequina-3- galato (EGCG): Sigma. P.m.: 458,4. Se preparó un stock a 50 mM en DMSO. Fue almacenada a -20°C y en oscuridad. La concentración de uso es de 50 μ M.

- Etopósido: Sigma. P.m.: 588,56. Se preparó un stock a 20 mM en DMSO. Se almacenó a -20°C. Se utilizó a concentraciones de 0,05 a 1 μ M.

- Genistéina: Sigma. P.m.: 270,2. Se preparó un stock en DMSO a 50 mM que fue almacenado a -20°C y protegido de la luz. La concentración de uso es de 50 μ M.

- GSH-OEt: Sigma. P.m.: 335,38. Se prepara en PBS a 100 mM justo antes de su uso. Se almacenó a -20°C. Se usó a una concentración de 5 mM.

- Hidroxianisol butilado (BHA): Sigma. P.m.: 180,2. El stock fue preparado en etanol absoluto a una concentración de 0,5 M y fue almacenado a -20°C. La concentración a la que fue utilizado es 50 µM.

- L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO): Sigma. P.m.: 222,3. Inmediatamente antes de su uso, se disolvió en agua a una concentración stock de 50 mM. La concentración a la que fue utilizado es de 1 mM. Antes de su uso, el BSO se esterilizó por filtración, utilizando para ello filtros de 0,22 µm (GSW PO2500, Millipore).

- Lonidamina: Sigma. P.m.: 321,2. El stock de 100 mM fue preparado en DMSO y conservado a -20°C. Se usó a oncentraciones de 25 a 100 µM.

- LY294002 (LY): Calbiochem. P.m.: 307,4. Se preparó un stock a 20 mM en DMSO. Se conservó a -20°C. La concentración de uso es de 30 µM.

- 2-Metoxiestradiol: Sigma. P.m.: 302,41. Se preparó un stock a 20 mM en DMSO y se conservó a -20°C. Se usó a concentraciones de 0,1 a 0,5 µM.

- Mn (III) tetrakis (4-ácido benzoico) porfirina cloruro (Mn-TBAP): Calbiochem. P.m.: 879,2. Se preparó un stock a 100 mM en base acuosa y se conservó a 4°C. Se usó a concentraciones de 5 a 100 µM.

- N-acetil-L-cisteína (NAC): Sigma. P.m.: 163,2. Se preparó un stock a 3 M en DMSO que fue conservada a -20° C. La concentración de uso es de 10 mM.

- Naringenina: Sigma. P.m.:273,3. Se preparó un stock 100 mM en etanol y se conservó a -20°C. Lo usamos a concentraciones de 20-100 µM.

- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂): Foret. P.m: 34 Uma. El stock comercial tiene una concentración de 8,8 M y se conserva a 4°C. Previamente a su uso se hicieron dos diluciones intermedias de 1/100 en agua destilada. La concentración de uso es 20, 40 y 60 µM.

- PD98059 (PD): Calbiochem. P.m.: 267,3. Se disuelve en DMSO hasta una concentración de 20 mM conservándose a -20°C, protegido de la luz. La concentración de uso fue de 20 µM.

- Quercetina: Sigma. P.m.: 338,27. El stock 100 mM se prepara en DMSO y se conserva a -20°C. Se usa a una concentración de 5 y 10 µM.

- Resveratrol: Sigma. P.m.: 228,24. El stock, con una concentración de 50 mM, se disolvió en DMSO y se conservó a -20°C protegiéndolo de la luz. La concentración de uso fue desde 5 µM hasta 50 µM.

- Tumor Necrosis Factor (TNF α): Peptotech EC; London, UK. P. m.: 17 kDa. El stock de 50 $\mu\text{g/ml}$ fue preparado en agua y almacenado a -20°C . La concentración de uso fue de 50 ng/ml.

- Trióxido de arsénico (ATO): Sigma. P.m.: 197,8. El stock se disolvió en 100 μl de NaOH 1 M y se añadió PBS hasta conseguir una solución final de 10 mM. Antes de su uso, el ATO se esterilizó por filtración, utilizando para ello filtros de 0,22 μm (GSW PO2500, Millipore). Se conservó a 4°C . Las concentraciones de uso son 0,5-5 μM .

- U0126 (U): Calbiochem. P. m.: 380.5. El stock del producto fue de 2,5 mM en DMSO y se conservó a -20°C y en oscuridad. La concentración de uso fue 2,5 μM .

-N-benciloxycarbonil-Val-Ala-Asp(OMe)-fluorometilcetona(Z-VAD-fmk): Calbiochem. El stock se disolvió en DMSO a una concentración de 20 mM y se almacenó a -20°C . Se utilizó a una concentración final de 50 μM .

2. Material fotográfico y de autorradiografía

Se utilizaron películas X-OMAT AR (Kodak) y Agfa Curix RP2 Plus, las cuales se revelaron en una máquina Agfa Curix 60 que emplea revelador G-153 y fijador G-354.

En la composición de figuras se empleó un escáner Agfa Arcus II y como programa para el tratamiento de imágenes, Adobe Photoshop 7.0.

MÉTODOS

■ ANÁLISIS DE PARÁMETROS CELULARES

1.- Determinación de la proliferación celular

Se determinó mediante el conteo total de células, usando el contador TC10TM Automated Cell Counter (BioRad, Madrid, España). También se puede determinar la proliferación celular poniendo las células en un hemocitómetro y procediendo a su conteo en el microscopio invertido.

2. - Medida de crecimiento celular y viabilidad (Levitz and Diamond, 1985)

Es una medida relativa del número de células viables en un cultivo, haciendo referencia a su capacidad proliferativa.

Las sales de tetrazolio del MTT (3-[4,5-dimetil-tiazol-2il]-2,5-difenil tetrazolio) son útiles para ensayos de cuantificación de células viables. La conversión de las sales de tetrazolio (amarillo y soluble) a cristales de formazán (púrpura e insoluble) sólo se puede producir por la actuación de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas ya que en las mitocondrias de las células muertas no hay respiración.

Se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

a) Se recogen unas 5×10^5 células y se centrifugan. Se lavan en PBS precalentado.

b) Se centrifugan las células y el pellet obtenido se resuspende en 700 μ l de PBS con MTT a 0,5 mg/ml.

c) Las células se reparten en una placa de 96 pocillos, efectuando triplicados para cada muestra y poniendo 200 μ l por pocillo. Se debe de poner un blanco que consiste en una solución de MTT en PBS sin células.

d) Se incuba aproximadamente una hora (hasta que veamos color) a 37°C y en oscuridad.

e) Se añade SDS al 2% para detener la reacción y deshacer los cristales de formazán, y se incuba en oscuridad durante toda la noche.

f) Las medidas de absorbancia se realizaron por espectrometría a 595 nm usando un lector de placas iMark (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Bajo estas condiciones, una disminución en la absorbancia puede reflejar inhibición de la proliferación celular, incremento de muerte celular o la suma de ambos factores.

3.- Determinación de la muerte celular

3.1.- APOPTOSIS

3.1.1.- Tinción del DNA con DAPI fluorescente (Vergne et al., 1987)

a) Se recogen unas 2×10^5 células, se centrifugan y se lavan en PBS 1X.

b) Se resuspenden en unos 50 μ l de PBS 1X y se extiende mediante frotis en un porta, que se deja secar al aire.

c) Tras el secado, las células se fijan en etanol al 70% (v/v) a temperatura ambiente durante 20 minutos, y se dejan secar de nuevo los portas.

d) La tinción se realiza sumergiendo los portas en una solución de PBS 1X que contiene 1 μ g/ml de DAPI (4', 6'-diamino-2-fenilindol; Serva (Heidelberg, Alemania)) y 1 μ g/ μ l de sulforrodamina 101, durante 20 minutos y en la oscuridad. Estos colorantes tiñen de forma específica el DNA y las proteínas, respectivamente.

e) Se vuelven a dejar secar en oscuridad, se montan las preparaciones añadiendo una gota de medio de montaje (10% (v/v) PBS, 0,1% (p/v) de o-fenilendiamina, 90 % (v/v) glicerol) y se les coloca encima un cubreobjetos.

Las preparaciones se conservan a -20° C y protegidas de la luz hasta su observación en el microscopía de fluorescencia, donde las células apoptóticas se verán con el DNA condensado y fragmentado.

3.1.2.- Tinción del DNA con ioduro de propidio (Crissman and Steinkamp, 1973).

Otro método de detección de células apoptóticas consiste en la cuantificación del contenido de DNA celular por incorporación de un agente intercalante como es el ioduro de propidio (IP). Estas células, una vez permeabilizadas, tienen un contenido en DNA menor que el de células normales ya que pierden parte de su DNA fragmentado, por lo que incorporan menor cantidad de IP y emiten menos fluorescencia.

La fluorescencia emitida por el IP se detectó en el citómetro de flujo EPICS-XL Beckman Coulter (Hialeah, Florida, USA) que opera a 200 mW usando un láser de excitación de argón a 488 nm y un filtro con pico de emisión a 620 nm.

El procedimiento utilizado para el tratamiento de las células fue el siguiente:

a) Se recogen unas 2×10^5 células, se centrifugan y se lavan en PBS 1X atemperado.

b) Se vuelve a centrifugar y el pellet resultante se resuspende en 425 μ l de PBS 1X. Se añaden 50 μ l de NP-40 1% (concentración final: 0,1% (p/v) en PBS) y 3-6 μ l de RNasa A 10 mg/ml (0,5 mg/ml final), incubándose a temperatura ambiente durante 20-30 minutos.

c) Se añaden 10 μ l de IP 1 mg/ml (50 μ g/ml final).

d) Se analiza por citometría de flujo la intensidad de fluorescencia emitida por el IP, considerándose apoptóticas las células con contenido en DNA hipodiploide (pico sub-G₁).

Esta técnica permite también la determinación de la distribución de células en cada fase del ciclo celular.

3.1.3.-Marcaje con anexina V (Koopman et al., 1994)

Durante la apoptosis la fosfatidilserina, la cual en células vivas se sitúa en la cara interna de la membrana plasmática, se transloca a la cara externa. La anexina V se une preferentemente a la fosfatidilserina, por lo que este método se basa en el reconocimiento de anexina V unida a la superficie celular de las células apoptóticas.

Se emplea el kit anexina V/FITC ApoAlert (Clontech, Mountain View, CA).

El procedimiento utilizado para el tratamiento de las células fue el siguiente:

- a) Se colectan unas 2×10^5 células, se centrifugan y el pellet se lava en PBS 1X.
- b) Se centrifugan y el pellet resultante se resuspende en 200 μ l de buffer.
- c) Se añade a cada muestra la cantidad adecuada de anexina V-FITC y de IP.
- d) Se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, y después las células se analizan en el citómetro (láser de emisión y excitación de 488 nm; filtro de 525 nm -fluorescencia verde para detectar anexina V- y filtro de 620 nm -fluorescencia roja para detectar IP-).

3.2.- NECROSIS

Las principales características de las células necróticas son el aumento del volumen celular y la pérdida de la integridad de la membrana plasmática. Esta característica hace que las células necróticas sean permeables al flujo de diferentes solutos y colorantes, entre ellos el azul de tripano y el yoduro de propidio.

3.2.1.- Incorporación de azul de tripano (Freshney, 1987)

- a) Se recogen unas 2×10^5 células por centrifugación y se lavan en PBS.
- b) Se resuspenden en PBS al que se le añade azul de tripano (0,05%) a volúmenes iguales.

c) Tras unos segundos, las células se observan al microscopio óptico en una cámara de Neubauer, observando que las células necróticas aparecen coloreadas de azul.

3.2.2. Incorporación de yoduro de propidio

a) Se recogen 2×10^5 células por centrifugación y se lavan en PBS.

b) Se resuspenden en 475 μ l de PBS y se añaden 5 μ l de yoduro de propidio 1 mg/ml (quedando una concentración final de 50 μ g/ml).

c) Las muestras se analizan por citometría de flujo utilizando un filtro de emisión máxima de 590 nm.

4.- Determinación de la funcionalidad de la membrana mitocondrial

4.1.-Medida de la apertura del poro mitocondrial (Petronilli et al., 1999), con adaptaciones para citometría de flujo (Poncet et al., 2003)

Las células se incuban con calceína-AM (forma esterificada de acetoximetil ester), la cual entra en las membranas celulares y luego es hidrolizada por esterasas intracelulares y esterasas que están dentro de los orgánulos, produciéndose calceína. La calceína es hidrofílica y por tanto permanece en los compartimentos subcelulares, incluyendo la matriz mitocondrial. Si las células marcadas con calceína se cargan luego con cloruro de cobalto (CoCl_2), la fluorescencia dependiente de calceína es “quencheada” (apagada) en todos los compartimentos subcelulares con la excepción de la matriz mitocondrial, porque la membrana mitocondrial interna es la única membrana intracelular que normalmente es impermeable al cobalto.

Se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- a) Se cuentan las células para tener 4×10^5 células/ml por punto.
- b) Se centrifugan y se guarda el medio resultante a 37°C.
- c) Se lava el medio con PBS estéril precalentado a 37°C.
- d) Se centrifugan las células y se lavan con PBS estéril precalentado a 37°C.

e) Se centrifugan las células y se resuspenden en un medio que contiene RPMI sin suero y sin rojo fenol, 1 mM de CoCl_2 (solución a 100 mM) y 1 mM de calceína (solución de 4 mM). Se incuban a 37°C protegidas de la luz durante 15 minutos.

f) Las células se centrifugan y se lavan con PBS estéril precalentado a 37°C . Se vuelven a centrifugar dos veces más y finalmente se resuspenden en el medio guardado a 37°C para que tengan una concentración final de 4×10^5 células/ml por punto.

g) Se reparten las células en placas y se aplica el tratamiento correspondiente.

h) Finalizado el tiempo de tratamiento se mide la fluorescencia por citometría de flujo utilizando un filtro de 525 nm. Conviene poner un control negativo. Si se produce un decrecimiento de la fluorescencia significa que se ha producido apertura del poro.

4.2.- Medida del potencial de membrana mitocondrial (Troyano et al., 2001)

La mitocondria acumula un fuerte gradiente de carga negativa en su interior debido a la cadena respiratoria que extrae protones de la matriz mitocondrial, generando así un potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).

Las sondas que se emplean en el estudio del $\Delta\Psi_m$ son sustancias catiónicas hidrófobas, por lo que tienden a acumularse en la mitocondria, y este acúmulo dependerá del potencial de membrana de la mitocondria. Se emplearon las sondas DilC₁ (5) y rodamina 123 (Molecular Probes- Eugene, OR).

Se siguió el siguiente proceso:

a) Se recogen unas 4×10^5 células por centrifugación y se lavan en PBS 1X precalentado.

b) Se resuspenden en PBS 1X con 1 $\mu\text{g/ml}$ de la sonda correspondiente y se incuban durante 30 minutos en oscuridad y a 37°C .

c) Al finalizar la incubación, las células se centrifugan, se lavan en PBS 1X una vez y se resuspende el pellet en PBS 1X. Se ponen las muestras en hielo y protegidas de la luz y se mide la fluorescencia por citometría de flujo en el citómetro FC500 (Beckam Coulter, Hialeah, FL) en FL1 con un filtro de 630 nm para DilC₁ (5) y en el citómetro XL (Beckam Coulter, Hialeah, FL) en FL3 con un filtro de 525 nm para rodamina 123. Como control interno, las células se incubaron con el agente despolarizante carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona (50 μM).

5.- Medida de la producción de especies reactivas de oxígeno

5.1.- Medida de la producción de peróxido de hidrógeno (Hockenbery et al., 1993)

La producción de H_2O_2 se puede cuantificar mediante el uso de la sonda diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA). Esta sonda, permeable a la membrana plasmática, se acumula en las regiones lipídicas hidrofóbicas donde puede ser hidrolizada por esterasas celulares. La sonda queda, por tanto, como diclorofluoresceína reducida (H_2DCF), que al reaccionar con peróxidos produce diclorofluoresceína oxidada (DCF) fluorescente (Bass et al., 1983).

El procedimiento empleado fue el siguiente:

a) Se recogen unas 2×10^5 células y se resuspenden en medio RPMI sin rojo fenol.

b) Las células son sometidas al tratamiento deseado y 30 minutos-1 hora antes de pasar por el citómetro se les añade la sonda H_2DCFDA a una concentración de $5 \mu M$. Se ponen en la estufa de incubación.

c) Como control positivo de la técnica, se añade H_2O_2 (50-100 mM) a células sin tratar.

d) La medida de la fluorescencia por citometría de flujo se realiza utilizando un filtro en FL1 de 525 nm. Es conveniente pasar una muestra de células sin sonda para fijar el umbral negativo de fluorescencia. Asimismo, es conveniente pasar células tratadas con el agente a estudiar, sin sonda fluorescente, para analizar la posible fluorescencia de dicho agente.

5. 2.- Medida de la producción de anión superóxido (Miller et al., 1998)

La producción de anión superóxido (O_2^-) se cuantifica mediante el uso de la sonda fluorescente dihidroetidio (DHE) (Invitrogen). La DHE es un agente permeable a la membrana plasmática que emite fluorescencia azul en su forma reducida, pero en presencia de O_2^- se oxida emitiendo fluorescencia roja y origina etidio, que a su vez se intercala en el DNA.

El procedimiento utilizado es el siguiente:

a) Se recogen unas 2×10^5 células y se resuspenden en medio RPMI 1640 sin rojo fenol.

b) Se trata a las células y 30 minutos-1 hora antes de pasar las muestras por el citómetro se les añade la sonda DHE a una concentración de $5 \mu\text{M}$. Se incuban en la estufa de incubación.

c) La medición de la fluorescencia se realizó por citometría de flujo a 630 nm en FL3. Es conveniente pasar una muestra de células sin sonda para fijar el umbral negativo de fluorescencia. Asimismo, es conveniente pasar células tratadas con el agente a estudiar, sin sonda fluorescente, para analizar la posible fluorescencia de dicho agente.

6.- Medida de los niveles intracelulares de glutatión (Fernandez-Checa and Kaplowitz, 1990; Troyano et al., 2001; Troyano et al., 2003)

Para la medida de los niveles de glutatión reducido (GSH) se utiliza la sonda monoclorobimane (Molecular Probes- Eugene, OR), que reacciona específicamente con este compuesto. Esta sonda adquiere fluorescencia tras su conjugación con los grupos tiólicos, preferentemente GSH, por lo que es fácilmente detectable.

Se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

a) Se recogen 5×10^5 células y se lavan en PBS 1X.

b) Se resuspenden en PBS 1X que contiene la sonda monoclorobimane a 2 mM, y se incuban en oscuridad a 37°C durante 20 minutos.

c) Se lava el exceso de sonda y las células se resuspenden en PBS 1X.

d) La fluorescencia se mide en un lector PolarStar Galaxy Fluorometer (BMG LabTechnologies, Offenburg, Germany) a una λ de excitación de 390 nm y de emisión de 520 nm. Para ello se utilizan placas de 96 pocillos con fondo plano, donde las muestras se reparten para hacer cuadruplicados.

e) Los resultados se normalizan midiendo la cantidad de proteína de cada muestra.

■ ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL DE PROTEÍNAS

1.- Inmunoblot (“Western” blot)

1.1.- Extracción de lisados totales de proteínas

Para la extracción de lisados totales se realizó el siguiente procedimiento:

a) Se recolectan unas 4×10^6 células, se centrifugan en frío y se resuspenden en PBS 1X.

b) Las células se centrifugan de nuevo en frío y se resuspenden en buffer de lisis y se mantienen en hielo durante 20 minutos. Este tampón contiene 62,5 mM Tris-HCl pH=7,6, NP-40 1%, glicerol, NaCl, cocktail de inhibidores de proteasas NaF (10 mM) y ortovanadato sódico (1 mM).

c) Las muestras se centrifugan a 13.000 g durante 5 minutos en frío y se recogen los sobrenadantes, que constituyen los extractos proteicos totales. Se pueden almacenar a -70°C hasta su uso.

1.2.- Extracción de proteínas citosólicas y de proteínas de membrana

En la extracción de lisados citosólicos se realizó una valoración de la salida de proteínas mitocondriales al citosol. El procedimiento es el siguiente:

a) Se recogen 6×10^6 células y se lavan en PBS 1X.

b) El pellet se resuspende en 100 μl de tampón de lisis citosólico. Este buffer contiene KCl 80 mM, sacarosa 250 mM, digitonina 200 $\mu\text{g/ml}$ (Calbiochem) y 1% (v/v) de cocktail de inhibidores de proteasas.

c) Las muestras se incuban 5 minutos en hielo y posteriormente se centrifugan a 10.000 g durante 5 minutos y a 4°C . Se recogen los sobrenadantes, que contienen la fracción citosólica.

d) El pellet celular, que contiene la membrana y el resto de componentes contenidos en organelas, se puede lavar en PBS 1X o 2X frío para terminar de eliminar la fracción citosólica de la membrana.

e) El pellet, que contiene la fracción de orgánulos (entre otras cosas el *pool* mitocondrial), se resuspende en tampón de lisis de Laemmli (Laemmli, 1970) sin SDS y posteriormente se añade el mismo volumen de Laemmli 2% SDS (en una proporción de 20-30 μl de tampón sin SDS más la misma cantidad de tampón con SDS por cada

millón de células recogidas). El tampón de lisis de Laemmli contiene 62,5 mM Tris-HCl pH=6,8, glicerol 10% (v/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v), cocktail de inhibidores de proteasas 1% (v/v), NaF 10 mM, ortovanadato sódico 1 mM y SDS 1%.

f) Las muestras se hierven durante 5 min y posteriormente se sonicán en frío durante 15 minutos.

g) Se centrifugan las muestras a 13.000 g durante 5 min y se recogen los sobrenadantes que constituyen los extractos proteicos totales de membrana. Se pueden almacenar a -70°C hasta su uso.

1.3.- Extracción de proteínas nucleares (Schreiber et al., 1988)

a) Se recogen unos 5×10^6 células, se centrifugan y se lavan con PBS 1X.

b) Se vuelven a centrifugar las células y se resuspenden los pellets en TBS 1X frío. Las células se centrifugan en frío.

Los siguientes pasos se realizan en frío y usando los medios y buffers enfriados.

b) Se resuspenden en 1 ml de tampón TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, pH=7,5), se centrifugan a 13.000 r.p.m. durante 15 segundos a 4°C. El resto del proceso se realiza en la cámara fría.

c) Los pellet se resuspenden en 400 μ l de buffer A suplementado con inhibidores de proteasas/fosfatasas. Se mantienen en hielo durante 15 minutos. El buffer A es un tampón hipotónico de homogeneización (HEPES 10 mM pH=7,9, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM), al que en el momento de su utilización se le añade 1% (v/v) de cocktail de inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasas (NaF 10 μ l/ml y ortovanadato sódico 15 μ l/ml, Sigma) y 5 μ l/ml de DTT.

d) Se añaden 25 μ l NP-40 al 10% (v/v), se agita vigorosamente durante 10 segundos y se centrifuga durante un minuto a 13.000 r.p.m. y a 4°C.

e) Se elimina el sobrenadante (correspondiente al extracto citosólico). Al pellet se le añade 100 μ l de buffer A hipotónico de homogeneización. Se centrifugan de nuevo en las mismas condiciones que en el paso anterior y se elimina el sobrenadante.

f) Se añaden a los pellets 60 μ l del buffer C de extracción (HEPES 20 mM pH=7,9, glicerol 25%, NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM) suplementado con el 1% (v/v) de cocktail de inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasas (NaF 10 μ l/ml y ortovanadato sódico 15 μ l/ml, Sigma) y 5 μ l/ml de DTT. Se mantienen estos pellets en agitación en la rueda giratoria durante 15-30 minutos.

g) Se centrifuga de nuevo a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos y los sobrenadantes, que contienen los extractos nucleares, se alicuotan y se almacenan a -80°C . Es necesario valorar la concentración de proteínas previamente a su utilización.

1.4.- Western blot

a) La concentración de las diferentes muestras se valoró utilizando el reactivo BioRad Protein Assay Reagent.

b) Alícuotas con la misma cantidad de proteína se separaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (BioRad) (Laemmli, 1970), y utilizando el sistema de separación electroforética Mini-Protean (BioRad).

c) Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (InmobilonTM-P, Millipore) por el sistema de transferencia Mini-Protean (BioRad) durante 1-1,5 hora a 80 V. En algunas ocasiones se usó el sistema de transferencia semi-dry (BioRad).

d) Las membranas fueron bloqueadas con leche desnatada en polvo o con albúmina de suero bovino-BSA- 5% durante 1 hora a temperatura ambiente.

e) Se lavan las membranas con T-TBS (0,05% (v/v) Tween-20, Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH=7,5) tres veces (cada lavado de 7 minutos).

f) Las membranas se incuban con el anticuerpo primario, preparado en la solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C y en agitación o bien en una bolsita cerrada herméticamente.

g) Se incuba con el anticuerpo secundario (conjugado con peroxidasa) diluido en la solución de bloqueo durante 1-1,5 hora a temperatura ambiente.

h) Se lavan las membranas con T-TBS cinco veces (cada lavado de 15 minutos) y un lavado con TBS con el fin de lavar el Tween.

i) Las membranas se revelan con el kit comercial ECL (Enhanced Chemiluminescence Western Blotting Detection System RNP 2019, Amersham) en las condiciones que aconseja el fabricante.

En otras ocasiones se ha revelado con el kit LiteAblot (Chemiluminescent substrate for Western Blotting) (Euro-lone) según las condiciones indicadas por el fabricante.

1.5.- Anticuerpos

a) Primarios

Proteína	Origen	Dilución	Casa comercial
p44/p42 ERK1/2 humana	conejo	1:2000	Cell Signaling Technology
Fosfo-p44/p42 ERK1/2 humana	conejo	1:2000	Cell Signaling Technology
p38 humana	conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
Fosfo-p38 humana	conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
SAP/JNK	conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
Fosfo-JNK	conejo	1:500	Cell Signaling Technology
Akt	conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
pAkt	conejo	1:500	Cell Signaling Technology
Bcl-2 humana	ratón	1:2000	Santa Cruz Biotechnology
Bax (N-20) humana	conejo	1:4000	Santa Cruz Biotechnology
Bid humana	cabra	1:2000	Santa Cruz Biotechnology
Bcl-X _L humana	conejo	1:2000	BD Pharmingen
Caspasa-8 humana	mouse	1:1000	Cell Signaling
Caspasa-8 cleaved	mouse	1: 1000	Cell Signaling
Caspasa-9	conejo	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Caspasa-9 cleaved	cabra	1: 1000	Santa Cruz Biotechnology
Caspasa-3	conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
Caspasa-3 cleaved	conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
Citocromo c paloma Clon 7H8.2C102	ratón	1:1000	BD Biosciences Pharmingen
Omi/HtrA2	conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
XIAP (clon 2F1)	ratón	1:1000	MBL
NF-kB p65	conejo	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
SAM-p68	ratón	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Hsp-70	ratón	1:5000	Sigma
β - Actina	ratón	1:60000	Sigma
α -antitubulina humana	ratón	1:5000	Sigma

b) Secundarios

Los anticuerpos secundarios utilizados, como se ha mencionado anteriormente, fueron anticuerpos conjugados con peroxidasa:

- Frente a anticuerpos de ratón: “*horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG*” (Dako Diagnósticos, Barcelona). Se empleó una dilución 1:4000 en el caso de Bcl-2; para caspasa-8, cleaved caspasa-3, XIAP, anti-citocromo *c* y Hsp-70 se utilizó a 1:1000; para β -actina se utilizó a 1:60000.

- Frente a anticuerpos de conejo: “*horseradish peroxidase-conjugates goat anti-rabbit IgG*” (Dako Diagnósticos, Barcelona). Se utilizó una dilución 1:1000 para JNK, p-JNK, p38, fosfo-p38, Akt, pAkt, caspasa-9, caspasa-3, cleaved caspasa-3 y Omi/Htra, se empleó una dilución 1:2000 para p-ERK y Bcl-X_L, para ERK total se utilizó una dilución 1:6000, y para Omi/HtrA2 se utilizó a 1:8000.

- Frente a anticuerpos de cabra: “*horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat IgG*” (Dako Diagnósticos, Barcelona). Se utilizó una dilución 1:2000 para Bid y cleaved caspasa-9.

2.- Ensayos de retardo de movilidad de complejos DNA-proteína (Sanchez et al., 2008)

2.1.-Extracción de proteínas nucleares

Se extraen conforme al protocolo descrito en la página 77.

2.2.- Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados contienen secuencias de reconocimiento en el DNA para el factor de transcripción NF- κ B y su secuencia se detalla a continuación:

NF- κ B: 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'

3'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-5'

Este oligonucleótido es marcado radiactivamente por incorporación de [γ -³²P] ATP mediante la enzima T4 polinucleótido quinasa. Este marcaje se realiza en un baño a 37°C durante 45 minutos.

2.3.- Reacción de unión y electroforesis

Las reacciones de unión se realizan en un volumen final de 20 μ l y contienen:

- 8 μ l de tampón de unión: KCl 100 mM, MgCl₂ 100 mM, DTT 2 mM, HEPES 20 mM en pH=7,9, 20% (v/v) glicerol.

- 5 μ g de extracto nuclear.

- 1 μ g de poli (dI:dC).

- Agua hasta completar los 20 μ l.

- Y por último, se añade 50 ng del oligonucleótido marcado.

Esta primera mezcla se incuba durante 30 minutos en hielo.

En todos los casos, de forma paralela, se realizan ensayos de competición específica añadiendo a la mezcla de reacción un exceso 50x del mismo oligonucleótido sin marcar, e inespecífica utilizando como competidor un exceso de otro oligonucleótido diferente.

TNF α se usó como control positivo de la técnica.

Las muestras son cargadas en un gel de acrilamida/bis (37,5:1) al 4.5% (BioRad) en TBE 0.5X (que contiene 90 mM de Tris-borato y 1 mM de EDTA) a una diferencia de potencial de 175 V durante 2-3 horas. Finalmente, se seca al vacío a 80°C una hora y media y se expone con una película autorradiográfica (X-OMAT, Kodak).

OTROS MÉTODOS

Análisis estadístico

La significación estadística entre diferentes condiciones experimentales fue medida mediante el test de la *t-student*. Las diferencias significativas han sido representadas en este trabajo mediante asteriscos cuyo significado son: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Densitometrado

El densitometrado permite detectar la expresión de las proteínas y se efectuó mediante el programa Quantity One. Se basa en que la intensidad de banda del inmunoblot está directamente relacionada con la expresión de la proteína. Es necesario poner un blanco fuera de los carriles de proteínas para realizar el densitometrado.

Materiales y métodos

Dado el carácter semicuantitativo de los blot, a las oscilaciones de un 50% por encima o por debajo no se les suele dar mucho valor.

EndNote

Se usó el programa EndNote X6 para la búsqueda y clasificación de la bibliografía.

RESULTADOS

MÉTODOS PARA MEDIR APOPTOSIS Y NECROSIS

Incluimos algunos ejemplos de resultados ilustrativos obtenidos por medición de apoptosis y necrosis, técnicas que se optimizaron. Estos ejemplos están realizados en células U-937. Para ello, se trataron células con H_2O_2 a una concentración de $100\ \mu\text{M}$ para inducir apoptosis y otras células se trataron con H_2O_2 a una concentración de $2\ \text{mM}$ para inducir necrosis durante 14 horas. Las técnicas usadas se describieron detalladamente en la sección de "Materiales y Métodos".

1.- Tinción con DAPI fluorescente y observación en el microscopio de fluorescencia.

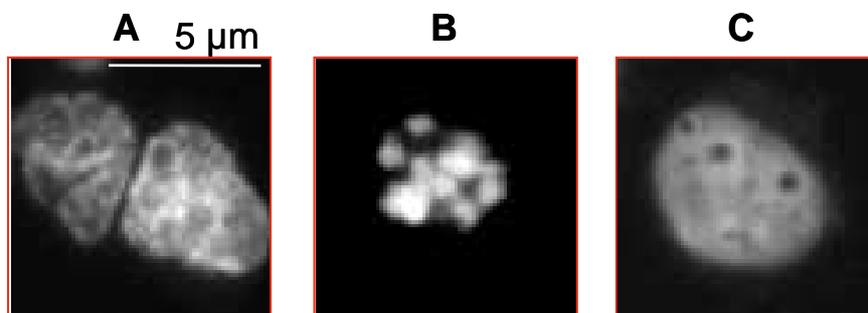


Figura 1. Observación de células teñidas con DAPI al microscopio de fluorescencia. A) Células control. B) Células tratadas con H_2O_2 $100\ \mu\text{M}$ durante 14 h. C) Células tratadas con H_2O_2 $2\ \text{mM}$ durante 14 h.

En estas fotografías (Fig. 1) se observan las células control con la cromatina dispersa (A). Las células apoptóticas tienen el DNA condensado y la cromatina está fragmentada en cuerpos discretos (B). En la necrosis a corto plazo (8-14 horas) se sigue conservando la dispersión de la cromatina, de forma similar al control (C).

2.- Ciclo celular: las células son permeabilizadas y tratadas con yoduro de propidio. Se analizan por citometría de flujo.

En la Fig. 2 se observa que la fracción de DNA en sub- G_1 (A_p) es mínima en las células control (A). El tratamiento pro-apoptótico produce una pérdida selectiva de DNA, por lo cual la fracción en sub- G_1 es elevada (B). Las células necróticas mantienen a corto plazo una distribución del ciclo celular similar a las células control (C).

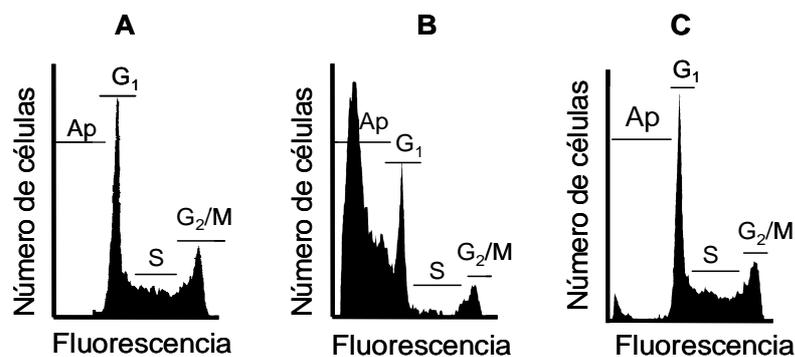


Figura 2. Células permeabilizadas y analizadas por citometría de flujo. Se representa el número de células frente la fluorescencia derivada de ioduro de propidio (IP). A) Células control. B) Células tratadas con H_2O_2 100 μM durante 14 h. C) Células tratadas con H_2O_2 2 mM durante 14 h (Ap: células apoptóticas).

Como las técnicas de análisis de la apoptosis (número de células con el contenido de DNA (sub- G_1) reducido y a través de la condensación/fragmentación de la cromatina) tienen una sensibilidad distinta, los datos obtenidos por cada método pueden ser cuantitativamente diferentes. Normalmente, la condensación de la cromatina se empieza a detectar antes que la presencia de células con contenido de DNA reducido.

3.- Necrosis: se muestran células no permeabilizadas y tratadas con ioduro de propidio (IP) analizadas por citometría de flujo.

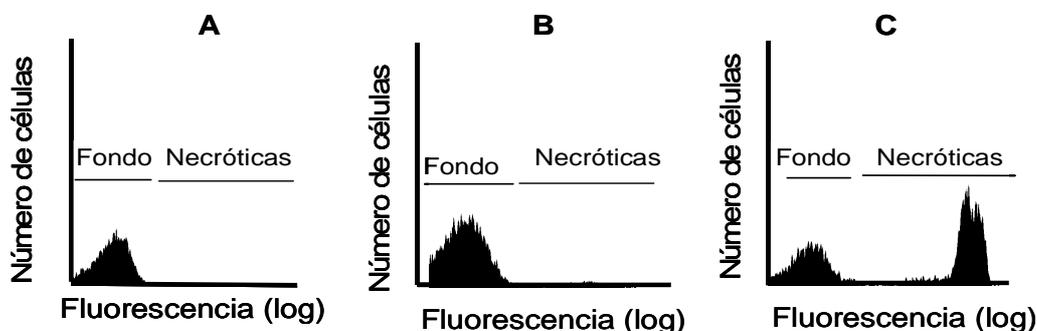


Figura 3. Células no permeabilizadas y analizadas por citometría de flujo. Se representa el número de células frente la fluorescencia derivada de ioduro de propidio (IP). A) Células control. B) Células tratadas con H_2O_2 100 μM durante 14 h. C) Células tratadas con H_2O_2 2 mM durante 14 h.

Como observamos en la Fig. 3, las células tratadas con H_2O_2 2 mM (C), sufren necrosis directa (lo que permite la entrada pasiva de IP) porque tienen dañada la membrana plasmática. Las células apoptóticas (B) siguen conservando la integridad de la membrana plasmática a corto plazo. No obstante, a largo período de tiempo les falla

la membrana plasmática por lo que entra IP. Se trataría entonces de una necrosis secundaria o apoptosis tardía.

Se observan resultados cualitativamente similares mediante tinción con azul de tripano y observación al microscopio.

4.- Medición de apoptosis mediante la técnica de anexina V fluoresceïnada/IP.

Las células son sometidas a doble tinción con anexina V y con IP y se determinan ambos parámetros por citometría de flujo (Fig. 4).

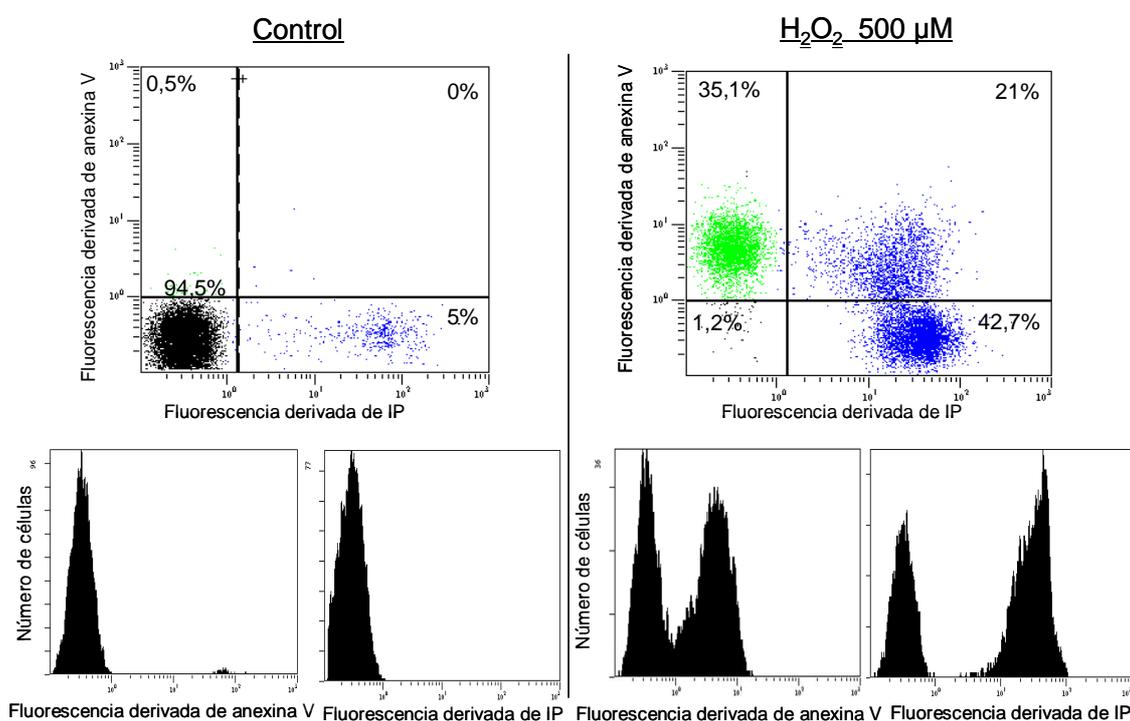


Figura 4. Se representa la fluorescencia derivada de anexina V frente a la fluorescencia derivada de ioduro de propidio (IP) de un control respecto a un tratamiento de H_2O_2 500 μM . En el cuadrado superior a la izquierda se representan las células que sufren apoptosis temprana, mientras que en el de la derecha se muestran las células que tienen apoptosis tardía. En el cuadrado inferior a la izquierda se representan las células viables, mientras que en el de la derecha se muestran las células que están en necrosis. Las células vivas se representan en verde y las células muertas (por apoptosis o por necrosis) en azul. Además, abajo se muestra para cada tratamiento el número de células frente la fluorescencia derivada de anexina/IP.

Definidos los criterios de apoptosis y necrosis, hacemos un estudio general de diferentes agentes fenólicos.

BLOQUE I. ACCIÓN CITOTÓXICA DE POLIFENOLES Y DE DROGAS CON DIANA MITOCONDRIAL

En primer lugar, realizamos un estudio general del efecto apoptótico de diferentes agentes fenólicos (genisteína, quercetina, ácido gálico, naringenina, epigallocatequina-3-galato, curcumina y resveratrol) por sí solos y en combinación con las drogas mitocondrióticas trióxido de arsénico y lonidamina en el modelo de células leucémicas mieloides U-937. El trióxido de arsénico se usó a una concentración de 2 μM (Fernandez et al., 2004), mientras que lonidamina se usó a 50 y a 100 μM , que son dosis terapéuticamente útiles (Di Cosimo et al., 2003), usadas previamente en el laboratorio. Hay que tener en cuenta que la toxicidad de los diferentes stocks de lonidamina varía considerablemente. En los estudios de cooperatividad se utilizaron dosis subcitotóxicas (que causan menos del 10% de apoptosis) de los agentes fenólicos. El estudio de genisteína y quercetina con ATO ya se describió en trabajos anteriores (Ramos and Aller, 2008; Sanchez et al., 2008). En este trabajo se extiende al estudio a la acción de la lonidamina, repitiéndose la combinación con ATO a modo de comparación. Cuando estudiamos los compuestos por sí solos y las combinaciones de las drogas mitocondrióticas con los agentes fenólicos se analizaron diferentes parámetros:

1.- Apoptosis: a saber, medida a las 24 horas por:

- a) fragmentación de cromatina;
- b) contenido sub-G₁ en DNA.

2.- Necrosis.

3.- Ciclo celular.

1.- APOPTOSIS

ACCIÓN DE GENISTEÍNA

La genisteína se usó directamente a una concentración de 50 μM , conforme a trabajos precedentes (Sanchez et al., 2008).

Los resultados obtenidos al combinar genisteína con ATO y lonidamina se presentan en la Fig. 5. La genisteína potencia fuertemente la acción citotóxica de ATO y de lonidamina, de forma más que aditiva.

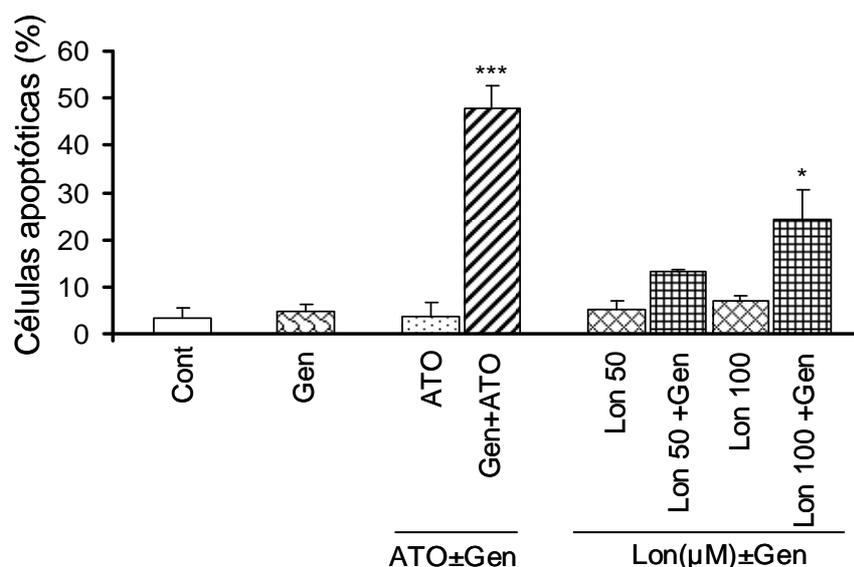


Figura 5. Inducción de apoptosis por genisteína (Gen), ATO y lonidamina (Lon) en células U-937 durante 24 h. Se representa la frecuencia de apoptosis de células sin tratar (Cont) y tratadas con los diferentes agentes, tomando como criterio la fracción sub-G₁ medida por citometría de flujo. Los resultados muestran la media \pm SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos muestran que el valor de significación de los tratamientos combinados es significativamente mayor que la suma de los valores de los correspondientes tratamientos individuales. ATO se usó a una concentración de 2 μ M, lonidamina a 50 y 100 μ M y genisteína a 50 μ M.

ACCIÓN DE QUERCETINA

La quercetina se usó a 5 y 10 μ M, conforme a trabajos precedentes (Ramos and Aller, 2008). Los resultados obtenidos al combinar quercetina con ATO y con lonidamina se expresan en la Fig. 6. Se observa una cooperatividad para inducir apoptosis de carácter más que aditivo cuando se usa quercetina a 10 μ M en combinación con ATO y con lonidamina cuando ésta es usada a 100 μ M.

ACCIÓN DE EPIGALOCATEQUINA-3- GALATO (EGCG)

La EGCG se usó a una concentración de 50 μ M, conforme a trabajos precedentes (Sanchez et al., 2009). Los resultados obtenidos al combinar EGCG con ATO y lonidamina se muestran en la Fig. 7. Se observa que la EGCG potencia fuertemente, con carácter más que aditivo, la generación de apoptosis por ATO y por lonidamina.

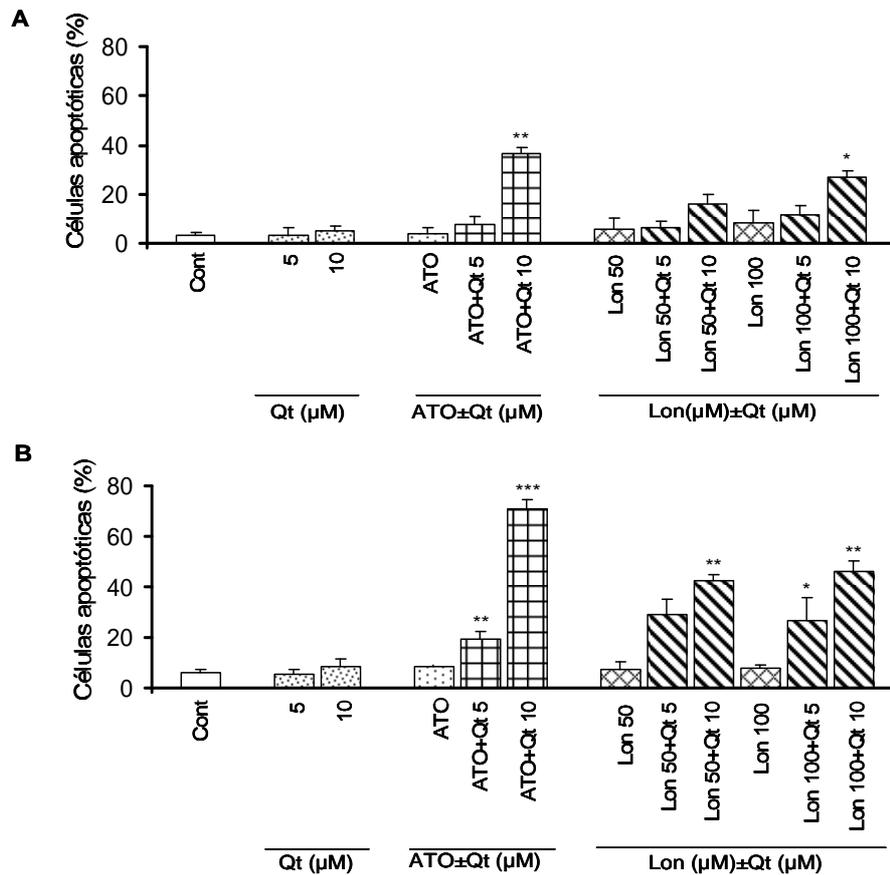


Figura 6. Inducción de apoptosis por quercetina (Qt), ATO y lonidamina (Lon) en células U-937 durante 24 h. Se representa la frecuencia de apoptosis de células sin tratar (Cont) y tratadas con los diferentes agentes tomando como criterio, A) el contenido sub-G₁ en DNA y citometría de flujo; y en B) la condensación/fragmentación de la cromatina. Los resultados muestran la media±SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos indican que el valor de significación de los tratamientos combinados es significativamente mayor que la suma de los valores de los correspondientes tratamientos individuales. ATO se usó a 2 µM, lonidamina a 50 y 100 µM y quercetina a 5 y 10 µM.

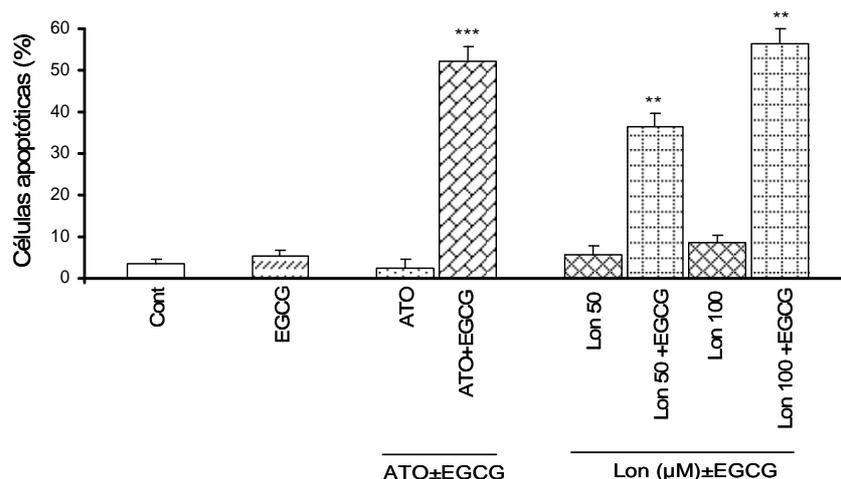


Figura 7. Inducción de apoptosis por EGCG, ATO y lonidamina (Lon) en células U-937 durante 24 h. Se representa la frecuencia de apoptosis de células sin tratar (Cont) y tratadas con los diferentes agentes, tomando como criterio la fracción sub-G₁ medida por citometría de flujo. Los resultados muestran la media±SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos muestran que el valor de significación de los tratamientos combinados es significativamente mayor que la suma de los valores de los correspondientes tratamientos individuales. ATO se usó a 2 µM, lonidamina a 50 y 100 µM y EGCG a 50 µM.

ACCIÓN DEL ÁCIDO GÁLICO

Como se observa en la Fig. 8, el ácido gálico hasta 20 μM es subcitotóxico, pero a partir de 40 μM es tóxico por sí solo. En combinación con ATO, tiene un efecto más que aditivo sobre la acción apoptótica. No se realizaron experimentos del ácido gálico en combinación con Ionidamina.

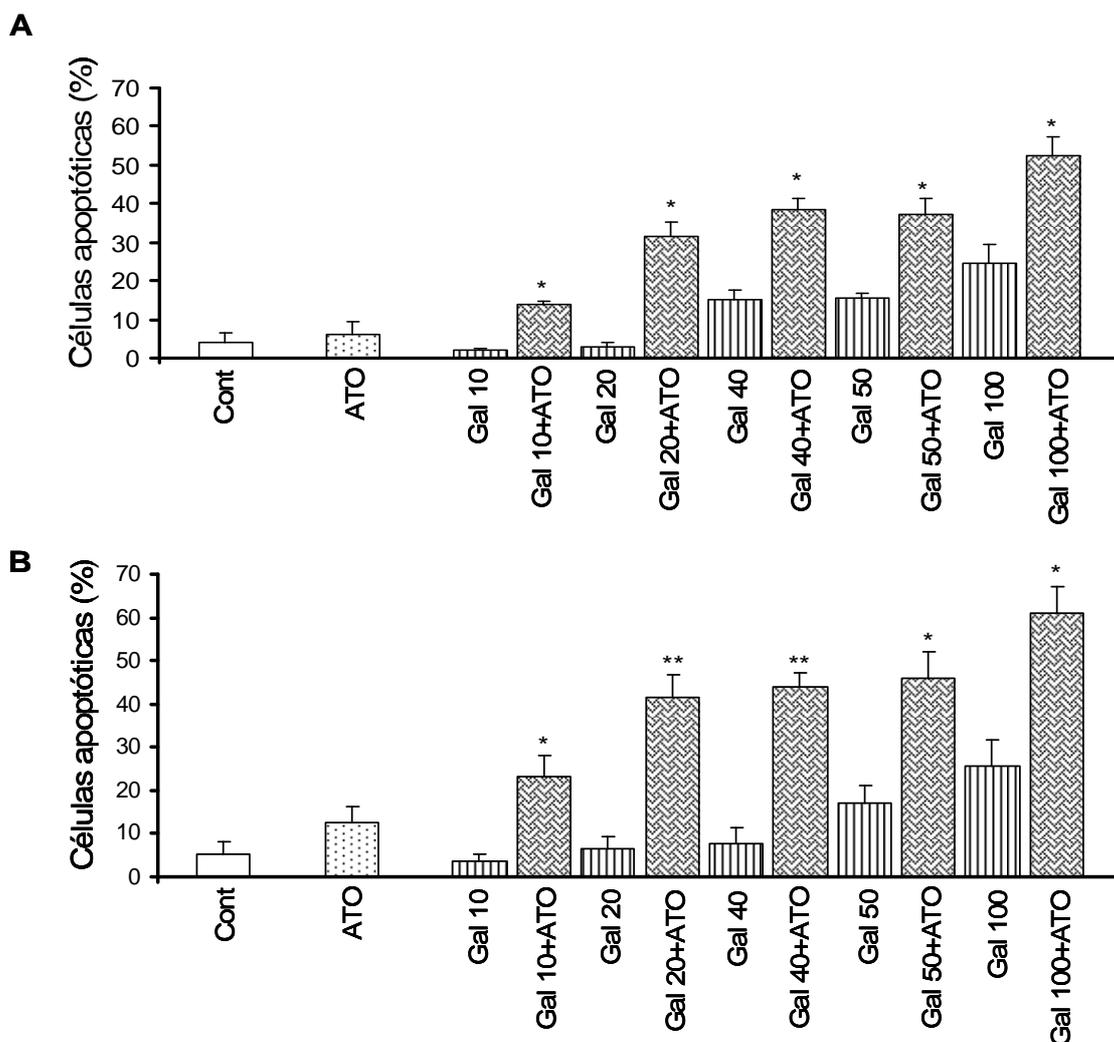


Figura 8. Inducción de apoptosis por ácido gálico (Gal) y ATO en células U-937 durante 24 h. Se muestra la frecuencia de apoptosis de cultivos sin tratar (Cont) y tratados con los diferentes agentes, A) determinada por la incorporación de IP y representada como contenido sub-G₁ en DNA; y en B) tomando como criterio la fragmentación/dispersión de la cromatina. Los resultados muestran la media \pm SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos muestran que el valor de significación de los tratamientos combinados es significativamente mayor que la suma de los valores de los correspondientes tratamientos individuales. ATO se usó a 2 μM y ácido gálico de 10 a 100 μM .

ACCIÓN DE NARINGENINA

Los resultados obtenidos combinando distintas dosis de naringenina con ATO y lonidamina se representan en la Fig. 9. La naringenina hasta 100 μM es inocua o moderadamente tóxica según la técnica usada, mientras que a concentraciones superiores es tóxica (resultados no mostrados). A las concentración de 20 μM no potencia la acción apoptótica del ATO, mientras que a 50 μM es igual a la aditividad y a 100 μM la potencia de forma más que aditiva. Asimismo, la naringenina coopera con lonidamina, pero de manera menos que aditiva.

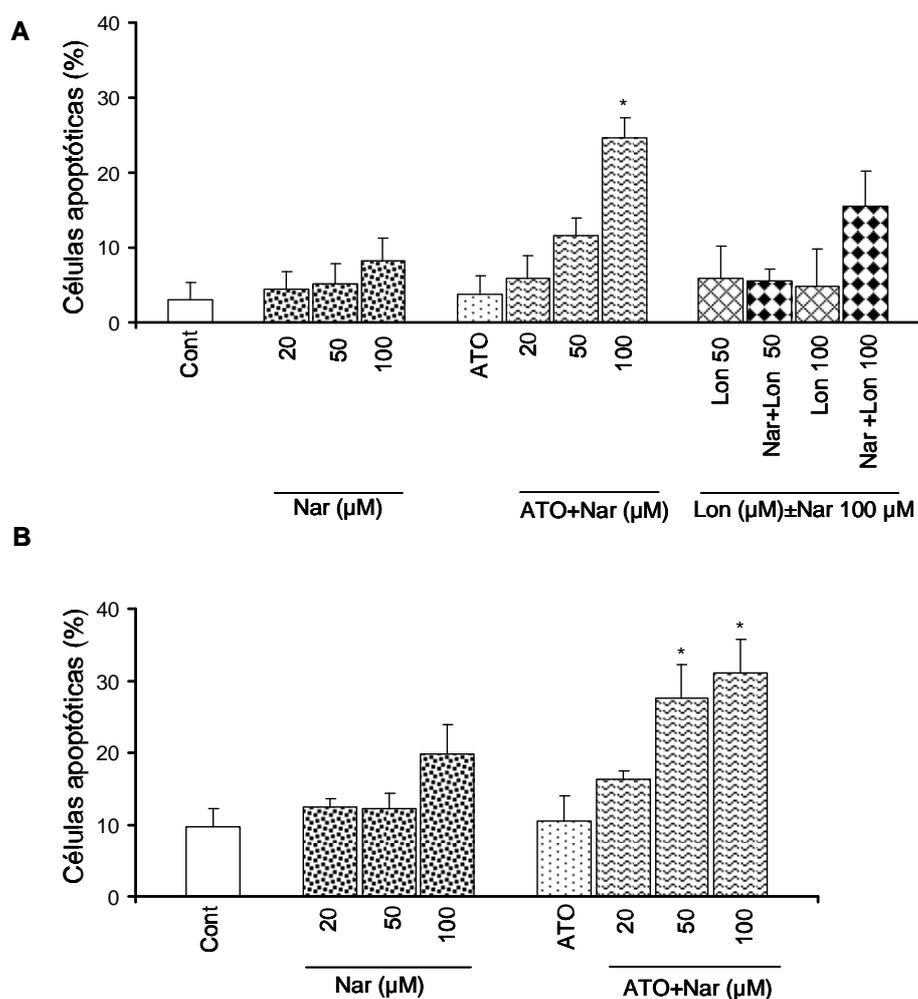


Figura 9. Inducción de apoptosis por naringenina (Nar), ATO y lonidamina (Lon) en células U-937 a las 24 h. Se representa la frecuencia de apoptosis de células sin tratar (Cont) y tratadas con los diferentes agentes, A) tomando como criterio la fracción sub- G_1 medida por citometría de flujo; y en B) por análisis de la fragmentación/dispersión de la cromatina. Con ambas técnicas, los resultados muestran la media \pm SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos muestran que el valor de significación de los tratamientos combinados es significativamente mayor que la suma de los valores de los correspondientes tratamientos individuales. ATO se usó a una concentración de 2 μM , lonidamina a 50 y 100 μM y naringenina de 20 a 100 μM .

Por comparación se incluyen aquí resultados con curcumina y resveratrol, aunque estos polifenoles se estudiarán con más detalle en un apartado posterior.

ACCIÓN DE CURCUMINA

La curcumina se usa en este apartado a la concentración de 7,5 μM , que es una dosis subcitotóxica, seleccionada después de realizar ensayos preliminares. Cuando se combina con ATO y con lonidamina coopera de forma más que aditiva para inducir apoptosis, como observamos en la Fig. 10.

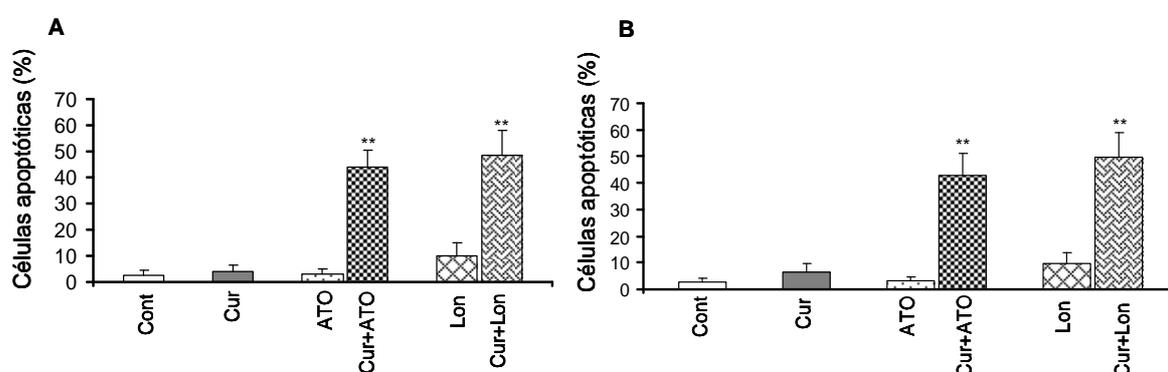


Figura 10. Inducción de apoptosis por curcumina, ATO y lonidamina (Lon) en células U-937 durante 24 h. Se representa la frecuencia de apoptosis de células sin tratar (Cont) y tratadas con los diferentes agentes, A) tomando como criterio la fracción sub- G_1 medida por citometría de flujo; y en B) por la fragmentación/dispersión de la cromatina. Los resultados muestran la media \pm SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos muestran que el valor de significación de los tratamientos combinados es significativamente mayor que la suma de los valores de los correspondientes tratamientos individuales. ATO se usó a 2 μM , lonidamina a 100 μM y curcumina a 7,5 μM .

ACCIÓN DE RESVERATROL

Se selecciona en este apartado la concentración de 50 μM de resveratrol, que es una dosis subcitotóxica. Como observamos en la Fig. 11, el co-tratamiento de resveratrol con ATO y lonidamina produce una fuerte potenciación de la apoptosis, con carácter más que aditivo.

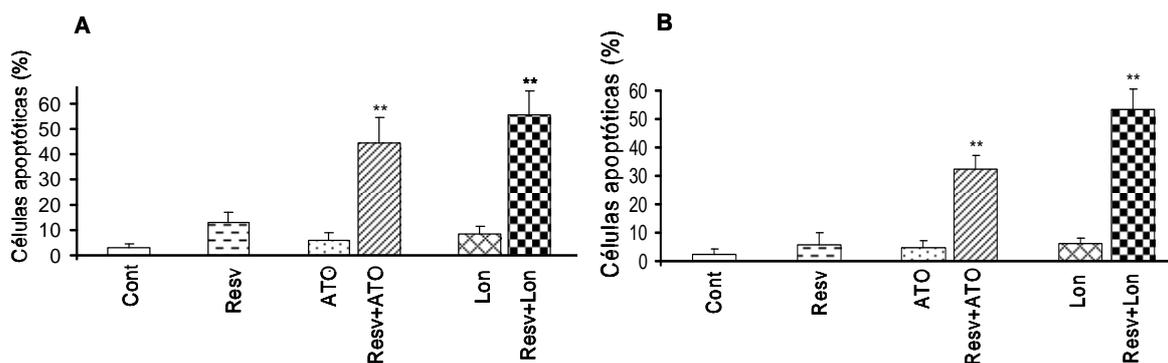


Figura 11. Inducción de apoptosis por resveratrol (Resv), ATO y lonidamina (Lon) en células U-937 durante 24 h. Se representan la frecuencia de apoptosis de células sin tratar (Cont) y tratadas con los diferentes agentes, A) tomando como criterio la fracción sub-G₁ medida por citometría de flujo; y en B) por la fragmentación/dispersión de la cromatina. Los resultados muestran la media±SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos muestran que el valor de significación de los tratamientos combinados es significativamente mayor que la suma de los valores de los correspondientes tratamientos individuales. ATO se usó a una concentración de 2 µM, lonidamina a 100 µM y resveratrol a 50 µM.

2.- NECROSIS

A las dosis ensayadas, ninguno de los polifenoles estudiados produce más de un 10% de necrosis a las 24 horas de tratamiento, por lo que se prescinde de su representación.

3.- CICLO CELULAR

Se analizaron los efectos del ATO, lonidamina y los diferentes polifenoles, usados separadamente, sobre la distribución de células en el ciclo proliferativo, mediante la técnica de citometría.

En vista de estos perfiles, el tratamiento con ATO, ácido gálico, quercetina, naringenina, epigallocatequina-3-galato y curcumina no causa modificaciones cualitativamente importantes en la distribución relativa de las fases del ciclo celular (G₁, S, G₂/M) a las 24 horas de tratamiento.

Por su parte, hay alteraciones en la distribución del ciclo celular en los tratamientos con lonidamina, genisteína y resveratrol.

La genisteína produce una parada del ciclo celular en la fase G₂/M. El resveratrol afecta a la transición de las células a lo largo de la fase S, provocando su acumulación en esta fase. El tratamiento con lonidamina por sí solo disminuye ligeramente la fase G₁ e incrementa G₂/M.

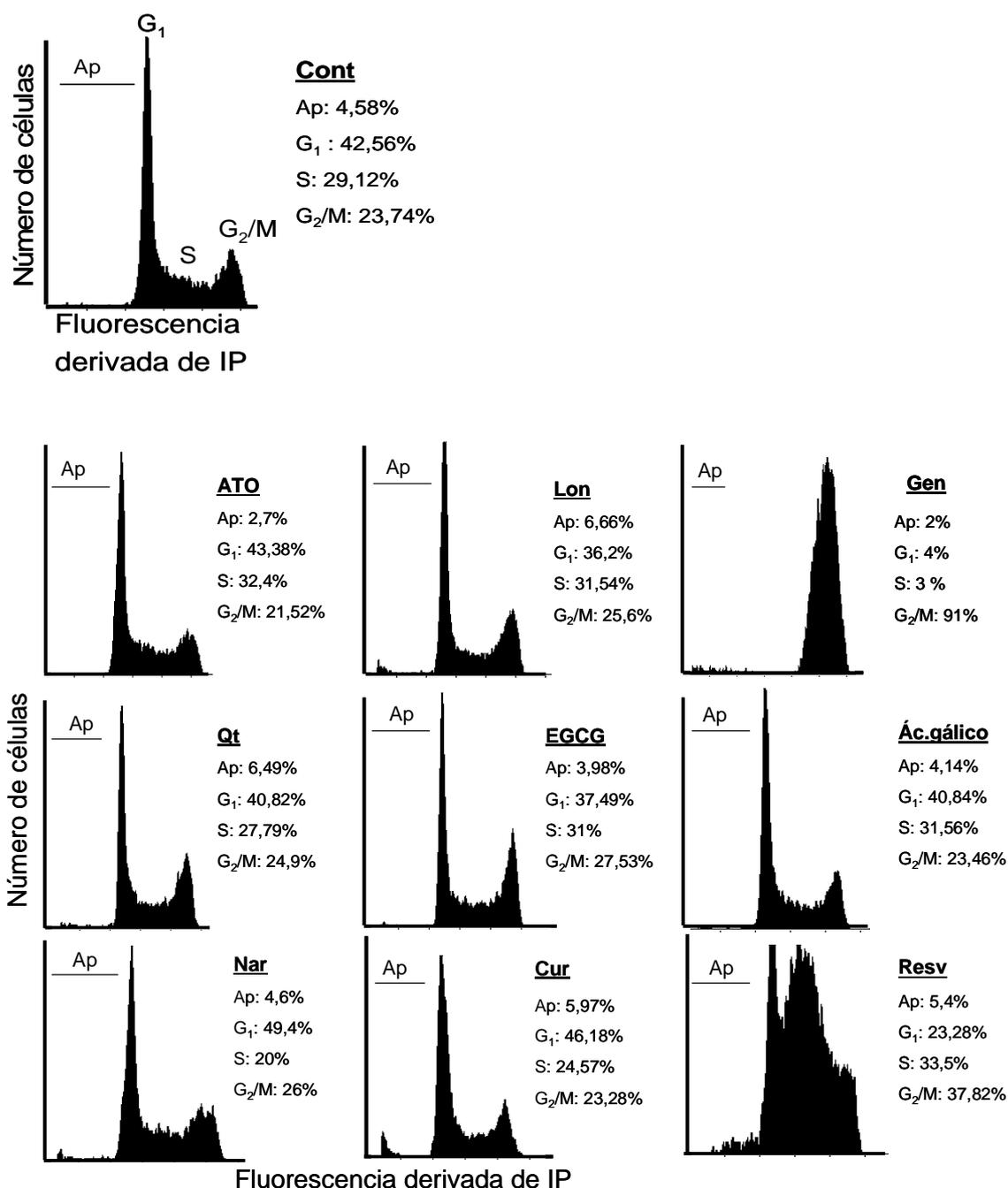


Figura 12. Se representa el número de células respecto a la fluorescencia derivada de yoduro de propidio (IP) de la distribución del ciclo celular en células no tratadas (Cont) y células tratadas durante 24 h con ATO 2 μ M, lonidamina (Lon) 100 μ M, genisteína (Gen) 50 μ M, quercetina (Qt) 10 μ M, epigallocatequina-3-galato (EGCG) 50 μ M, ácido gálico (20 μ M), naringenina (Nar) 100 μ M, curcumina (Cur) 7,5 μ M y resveratrol (Resv) 50 μ M. Se muestra el porcentaje de células apoptóticas (Ap) y en cada fase del ciclo: G₁, S y G₂/M.

El resumen de los datos estudiados se muestra en la Tabla 1.

	Ácido gálico (20-100µM)	Genisteína (50 µM)	Quercetina (5-10 µM)	Naringenina (20-100 µM)	EGCG (50 µM)	Curcumina (7,5 µM)	Resveratrol (50 µM)
Alteración ciclo	NO	SI (G ₂ /M)	NO	NO	NO	NO	SI (S)
Apoptosis: cooperación con:							
ATO(2µM)	SI*	SI *	SI*	SI*	SI*	SI*	SI*
Lon(100µM)	-	SI*	SI*	SI#	SI*	SI*	SI*

Tabla 1. Efecto de los polifenoles ácido gálico, genisteína, quercetina, naringenina, epigallocatequina-3-galato (EGCG), curcumina y resveratrol sobre el ciclo celular, y la cooperación de la apoptosis cuando se combinan con ATO y con lonidamina (Lon).

Símbolo *: Potenciación de carácter más que aditivo.

Símbolo #: Potenciación de carácter menos que aditivo.

BLOQUE II. ACCIÓN COMPARATIVA DE CURCUMINA Y RESVERATROL

Una vez examinados los diferentes agentes fenólicos nos centramos en el estudio mecanístico de resveratrol y curcumina, dado que son dos agentes de especial novedad y relevancia desde el punto de vista clínico (Kelkel et al., 2010). Se analizaron en primer lugar sus efectos en combinación con ATO y lonidamina en células U-937. Ulteriormente, a efectos de comparación, se analizará la acción apoptótica de las mismas combinaciones en otros modelos de células leucémicas, así como de la combinación de curcumina y resveratrol con otras drogas antitumorales distintas a ATO y lonidamina.

2.1.- APOPTOSIS, NECROSIS Y CITOTOXICIDAD

1.- APOPTOSIS

En primer lugar se hizo un estudio sobre la **producción de apoptosis** en diferentes condiciones (dosis y tiempo) con curcumina, resveratrol, ATO y lonidamina, solos o en combinación.

Como se había comentado anteriormente, se ensayaron dosis de ATO de 2-4 μM y de lonidamina de 25 a 100 μM , que son dosis consideradas fisiológicamente tolerables y alcanzables en plasma. Las dosis probadas de curcumina abarcan de 2 a 15 μM . Por su parte, el rango de concentraciones probado de resveratrol es de 5-50 μM . Normalmente en los ensayos combinados se usan varias dosis de lonidamina y resveratrol porque la toxicidad varía mucho según el stock utilizado.

Los resultados se obtuvieron mediante estudios de condensación/fragmentación de la cromatina, por citometría de flujo donde se considera que las células con contenido en DNA sub-G₁ son células apoptóticas y, puntualmente, para el caso de curcumina, mediante la unión de anexina V a la superficie celular.

A. Acción de la curcumina

Como se observa en la Fig. 13 en tratamientos de 24 horas la curcumina causa una mínima apoptosis (inferior al 10%) hasta la concentración de 7,5 μM . A concentraciones de 10 a 15 μM es tóxica (25% y 40% de apoptosis, respectivamente). Cuando se pone un co-tratamiento de curcumina con ATO se produce una fuerte

cooperación para producir apoptosis de manera más que aditiva a partir de una concentración de curcumina de 7,5 μM y ATO de 2 μM . Por su parte, la curcumina y la lonidamina cooperan para potenciar fuertemente la apoptosis; cuando se usa curcumina a 5 μM potencia la acción de lonidamina usada a 100 μM , mientras que si se usa a 7,5 μM , potencia la acción de lonidamina a partir de 50 μM .

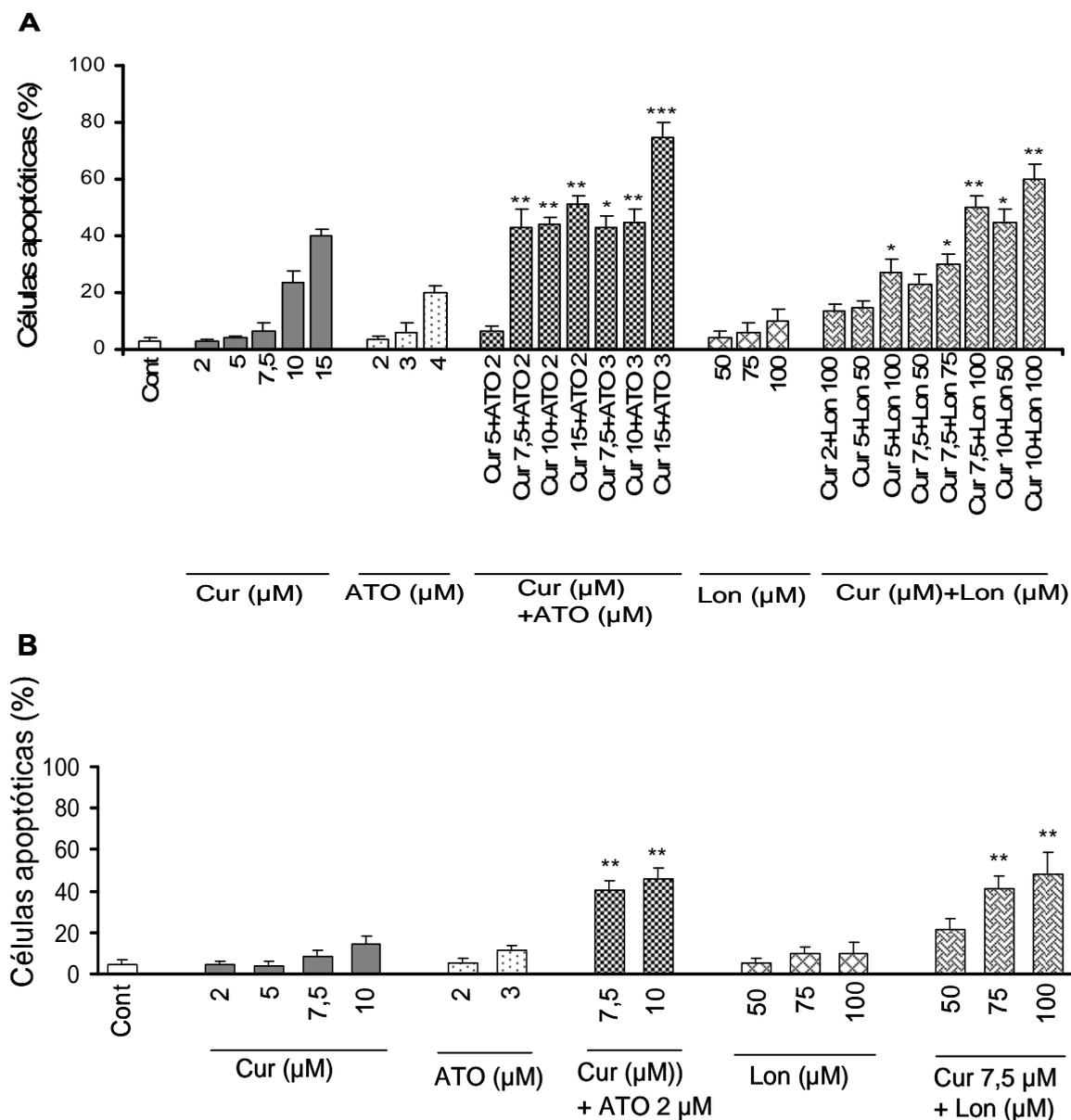


Figura 13. Inducción de apoptosis por curcumina (Cur), ATO y lonidamina (Lon) en células U-937 durante 24 h. Se representa la frecuencia de células apoptóticas en A) tomando como criterio la fracción sub-G₁ medida por citometría de flujo, de cultivos sin tratar (Cont) y cultivos tratados con las concentraciones indicadas de curcumina, ATO y lonidamina por sí solos, y las combinaciones de curcumina con ATO/lonidamina, y en B) tomando como criterio la fragmentación/dispersión de la cromatina. Los resultados muestran la media \pm SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos muestran que el valor de significación de los tratamientos combinados es significativamente mayor que la suma de los valores de los correspondientes tratamientos individuales. ATO se usó a una concentración de 2 a 4 μM , lonidamina de 50 a 100 μM y curcumina de 2 a 15 μM .

La técnica de anexina V se utilizó con curcumina 7,5 μM , ATO 2 μM y lonidamina 50 μM . Como observamos en la Fig. 14, las células no tratadas son negativas para la fluorescencia verde (correspondiente a la anexina V) y para la fluorescencia roja (correspondiente al IP). Es de resaltar que la curcumina produce por sí sola autofluorescencia (aproximadamente un 22 %) en FL3 (fluorescencia verde), que por tanto ha de tomarse como fondo inespecífico. En los co-tratamientos de curcumina con ATO y lonidamina hay un desplazamiento hacia la fluorescencia roja, lo que implicaría cierta frecuencia de respuesta apoptótica.

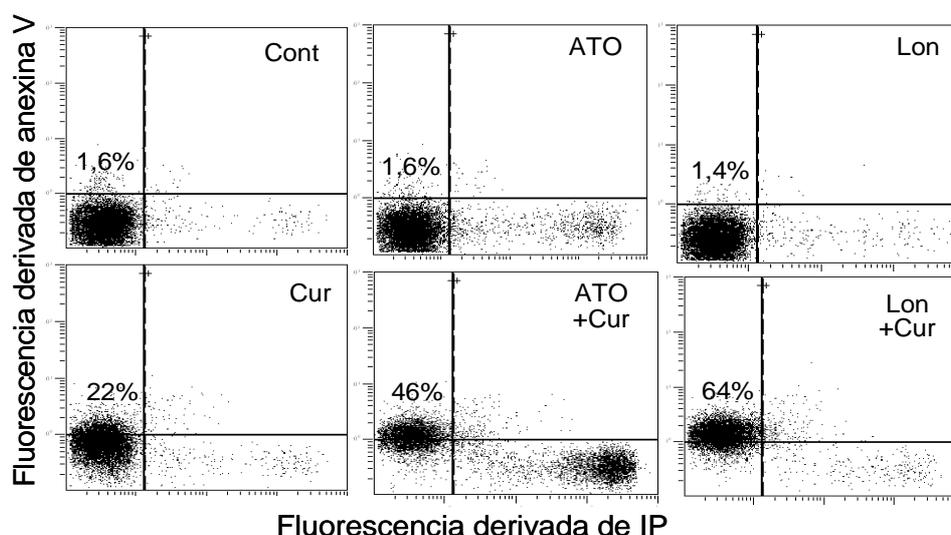


Figura 14. Análisis de la apoptosis producida por curcumina (Cur), ATO y lonidamina (Lon) y de la combinación de curcumina con ATO y con lonidamina en células U-937 mediante la técnica de anexina V a las 24 h. Se representa la fluorescencia derivada de anexina V frente a la fluorescencia derivada de IP. Se muestra la frecuencia de células que presentan translocación de fosfatidilserina, medida por la unión de anexina V a la superficie celular (fluorescencia verde), y la captura de IP (fluorescencia roja). Las células no tratadas son negativas para la fluorescencia verde y roja. Un fondo de aproximadamente un 22% de células con fluorescencia verde en cultivos tratados con curcumina se estimó que puede ser debido a la autofluorescencia del propio agente (ver apartado “Materiales y Métodos”). ATO se usó a una concentración de 2 μM , lonidamina a 50 μM y curcumina a 7,5 μM .

A la vista de todos estos resultados, para los estudios posteriores se escogió la concentración de curcumina de 7,5 μM , no tóxica y óptima para producir apoptosis en combinación con ATO y con lonidamina.

Finalmente, se observó que el co-tratamiento con el inhibidor de pan-caspasas z-VAD-fmk (z-VAD) reduce fuertemente la frecuencia de células con la cromatina fragmentada en los co-tratamientos de curcumina con ATO y con lonidamina (Fig. 15), por lo que podemos concluir que la muerte celular causada por curcumina es una apoptosis genuina, dependiente de caspasas.

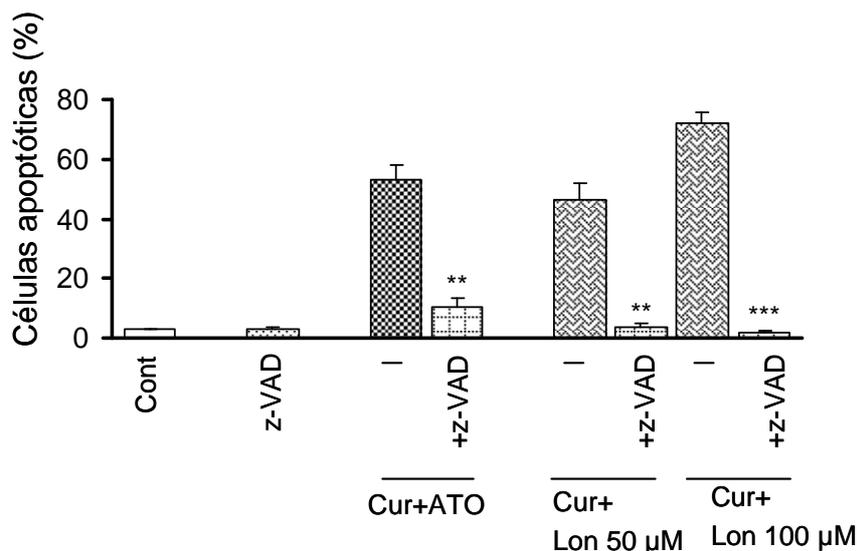


Figura 15. Efecto del inhibidor de caspasas z-VAD fmk (z-VAD) sobre la inducción de apoptosis producida por la combinación de curcumina (Cur) con ATO y lonidamina (Lon) en células U-937 durante 24 h. Se representan la frecuencia de células apoptóticas, tomando como criterio la fracción sub-G₁ medida por citometría de flujo. Los resultados muestran la media±SD de al menos 3 experimentos. z-VAD se aplicó 30 minutos antes de los co-tratamientos. ATO se usó a una concentración de 2 μM, lonidamina a 50 y 100 μM, curcumina a 7,5 μM y z-VAD a 50 μM.

Para caracterizar el proceso temporal de la ejecución de apoptosis hicimos un estudio de la progresión de la apoptosis a diferentes tiempos (6, 16 y 24 h) de tratamiento. La apoptosis empieza a ser detectada a partir de las 16 horas de tratamiento con curcumina en combinación con ATO o lonidamina (Fig. 16). Por tanto, fijamos ese tiempo como máximo para el estudio de los eventos reguladores, que se detallarán más adelante.

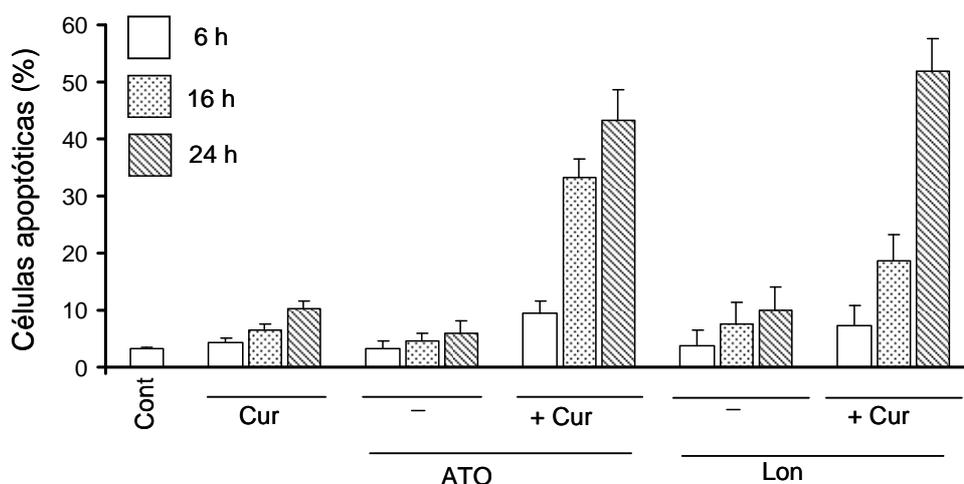


Figura 16. Se representa la ejecución de la apoptosis respecto al tiempo (6, 16 y 24 h) de curcumina (Cur) por sí sola y en combinación con ATO y lonidamina (Lon) en células U-937. Los resultados muestran la media±SD de al menos 3 experimentos. ATO se usó a 2 μM, lonidamina a 100 μM y curcumina a 7,5 μM.

B.- Acción del resveratrol

Como se observa en la Fig. 17 el resveratrol es subcitotóxico hasta 50 μM (causa una apoptosis igual o inferior al 10%). El resveratrol a partir de 10 μM en combinación con ATO y con lonidamina produce una potenciación de la apoptosis de manera más que aditiva. Estos resultados se obtuvieron a través de citometría de flujo (Fig. 17A) y mediante estudios de condensación/fragmentación de cromatina (Fig. 17B).

A la vista de estos resultados, se seleccionaron las concentraciones de resveratrol 25 y/o 50 μM para los tratamientos combinados y los siguientes experimentos.

El co-tratamiento de z-VAD-fmk sobre las combinaciones de resveratrol con ATO reduce fuertemente la frecuencia de células con la cromatina fragmentada, por tanto la muerte celular es una apoptosis dependiente de caspasas (Fig. 18A).

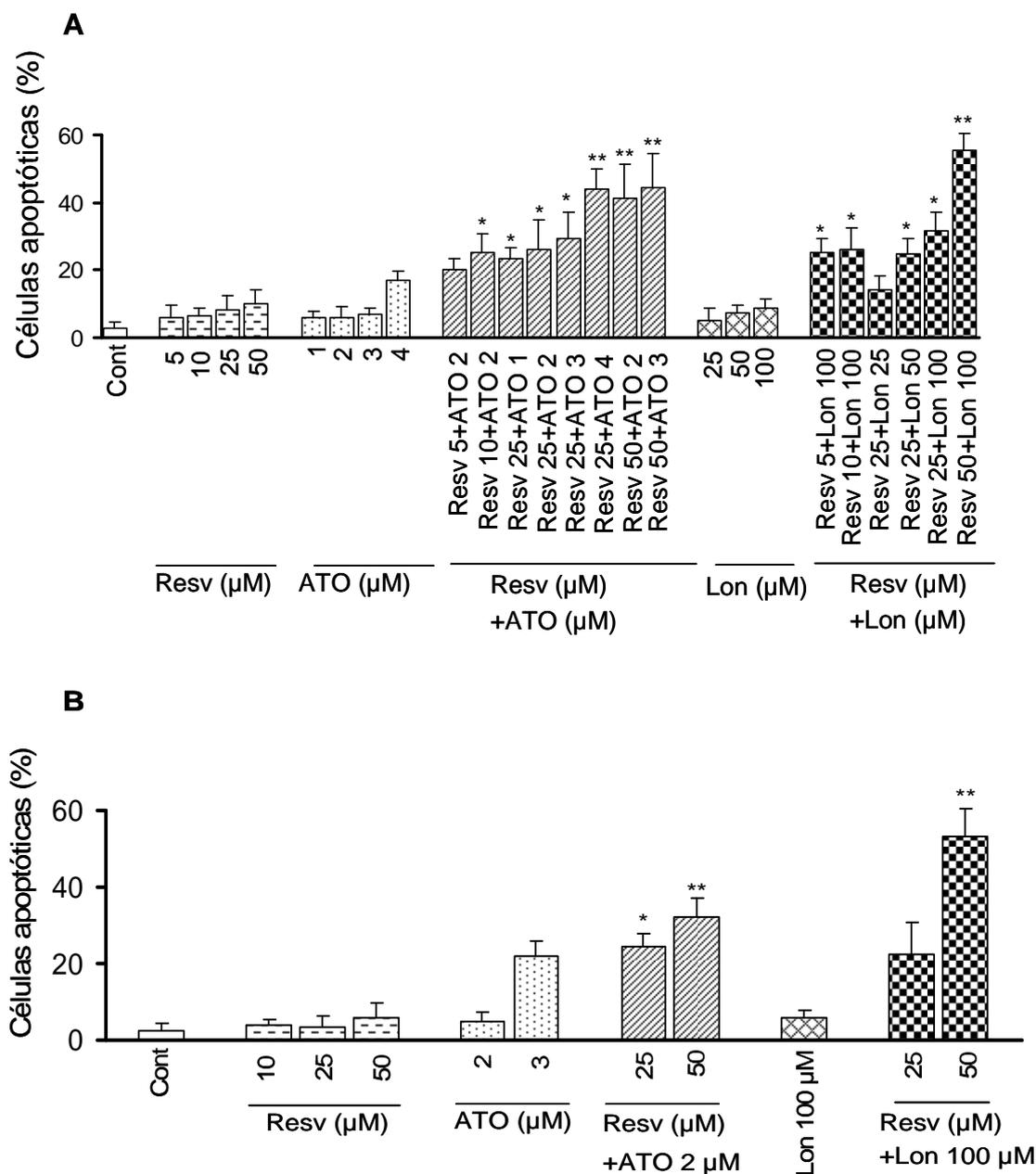


Figura 17. Inducción de apoptosis por resveratrol (Resv), ATO y lonidamina (Lon) en células U-937 durante 24 h. Se representa la frecuencia de células apoptóticas en A) tomando como criterio la fracción sub-G₁ medida por citometría de flujo, de cultivos sin tratar (Cont) y cultivos tratados con las concentraciones indicadas de resveratrol, ATO y lonidamina por sí solos, y las combinaciones de resveratrol con ATO/lonidamina, y en B) analizando la fragmentación/dispersión de la cromatina. Los resultados muestran la media±SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos muestran que el valor de significación de los tratamientos combinados es significativamente mayor que la suma de los valores de los correspondientes tratamientos individuales. ATO se usó a concentraciones de 1-4 μM, lonidamina de 25-100 μM y resveratrol de 5-50 μM.

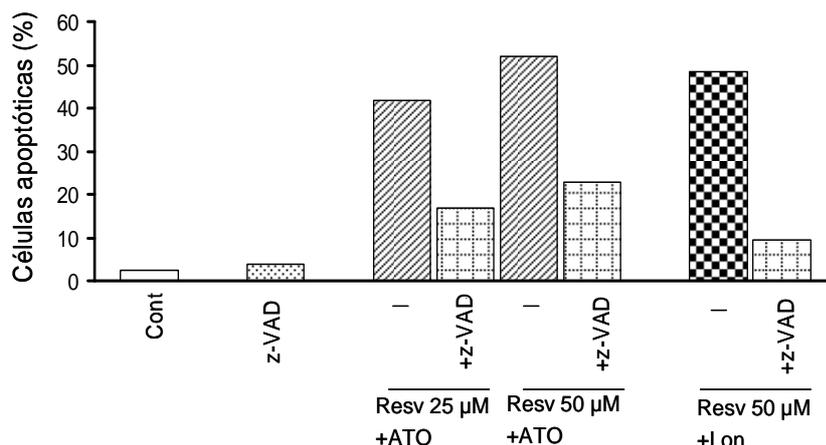


Figura 18. Efecto del inhibidor de caspasas z-VAD fmk (50 μ M) sobre la inducción de apoptosis producida por el co-tratamiento de resveratrol (Resv) con ATO y lonidamina (Lon) en células U-937. Se representa la frecuencia de células apoptóticas, tomando como criterio la fracción sub-G₁ medida por citometría de flujo. Estos datos son representativos de dos experimentos con resultados cualitativamente similares. z-VAD se aplicó 30 minutos antes de los co-tratamientos. Los tratamientos se aplicaron durante 24 h. ATO se usó a 2 μ M, lonidamina a 100 μ M y resveratrol a 25 y 50 μ M.

Se caracterizó el tiempo de ejecución de la apoptosis causada por resveratrol en el tiempo a 6, 16 y 24 horas. Cuando se combina el resveratrol con el ATO o lonidamina la apoptosis empieza a detectarse a partir de las 16 horas (Fig. 19).

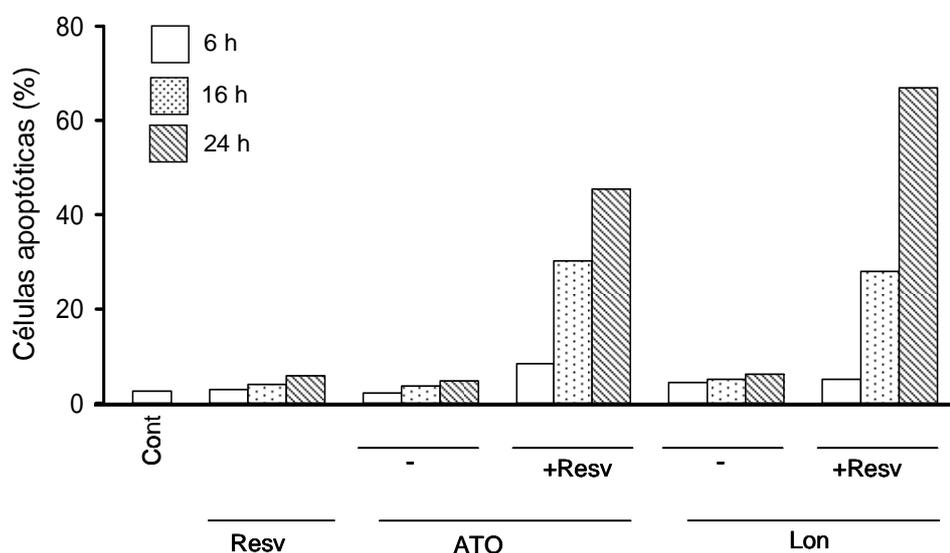


Figura 19. Se representa la ejecución de la apoptosis respecto al tiempo (6, 16 y 24 h) de resveratrol por sí solo y en combinación con ATO y lonidamina en células U-937. Los resultados son representativos de dos experimentos con resultados cualitativamente similares. ATO se usó a una concentración de 2 μ M, lonidamina a 100 μ M y resveratrol a 50 μ M.

2.- NECROSIS

Se analizó el efecto de los tratamientos de resveratrol sobre la permeabilidad de la membrana plasmática midiendo la penetración libre de IP. Para ello, se realizaron estudios de necrosis a las 16 y 24 horas. Como se observa en la Fig. 20, en los co-tratamientos de resveratrol con ATO y con lonidamina aumenta el número de células con penetración libre de IP de manera más que aditiva, a partir de las 16 horas. El z-VAD elimina la necrosis de los co-tratamientos de resveratrol en combinación con ATO y lonidamina de forma significativa, a las 24 horas. Este dato nos indica que se trata de una necrosis secundaria o apoptosis tardía.

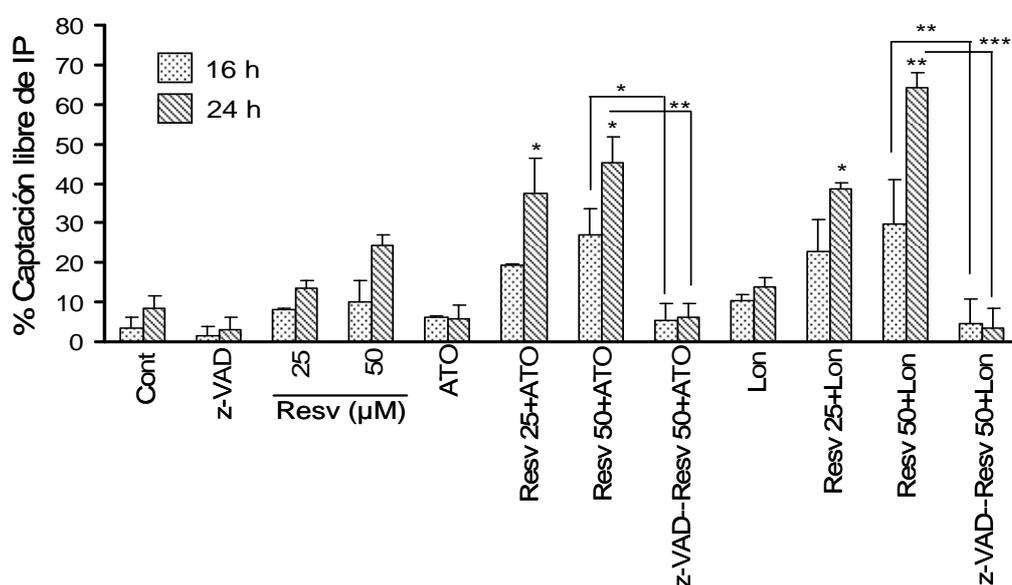


Figura 20. Se representa la captación libre de IP de resveratrol (Resv), ATO y lonidamina (Lon) por sí solos y de los co-tratamientos de resveratrol con ATO y lonidamina a las 16 y 24 h en células U-937. Los resultados muestran la media±SD de al menos 3 experimentos. z-VAD se aplicó 30 minutos antes de los co-tratamientos de resveratrol. Los asteriscos muestran que el valor de significación de los tratamientos combinados es significativamente mayor que la suma de los valores de los correspondientes tratamientos individuales, así como el de z-VAD respecto al co-tratamiento, a las 24 h de tratamiento. ATO se usó a 2 μ M, lonidamina a 100 μ M, resveratrol a 25 y 50 μ M y z-VAD a 50 μ M

3. – CITOTOXICIDAD

Como complemento, se hizo un estudio de citotoxicidad global usando la técnica de MTT en células U-937 en tratamientos de 24 horas con curcumina o resveratrol, ATO y lonidamina, solos o en combinación. Esta técnica mide la alteración en el número de células viables, como resultado conjunto de efectos en proliferación y viabilidad celular.

Como se observa en la Fig. 21 el tratamiento con curcumina, resveratrol, ATO y lonidamina produce una escasa disminución sobre la viabilidad celular. Por su parte, la curcumina y el resveratrol en combinación con ATO y con lonidamina disminuyen significativamente la viabilidad celular.

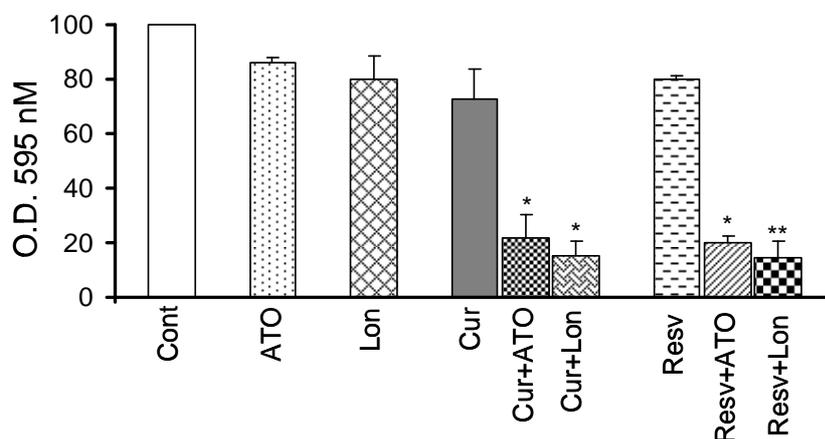


Figura 21. Análisis de citotoxicidad mediante MTT de curcumina (Cur), resveratrol (Resv), ATO y lonidamina (Lon) y de los co-tratamientos de curcumina/resveratrol con ATO y lonidamina a las 24 h en células U-937. Los valores de absorción se representan respecto a células no tratadas (Cont), a las que se le da el valor de 100. Los resultados muestran la media \pm SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos muestran que el valor de significación de los tratamientos combinados es significativamente mayor que la suma de los valores de los correspondientes tratamientos individuales. ATO se usó a una concentración de 2 μ M, lonidamina a 100 μ M, curcumina a 7,5 μ M y resveratrol a 25 μ M.

2.2.- CICLO CELULAR

Analizamos la distribución del ciclo celular. Dejando de lado la sub-población sub-G₁ (células apoptóticas), consideramos las fases G₁, S y G₂/M.

En la Fig. 22 y la Fig. 23 se muestran los perfiles correspondientes a curcumina (7,5 μ M) y de resveratrol a dos concentraciones (25 y 50 μ M); así como sus combinaciones con ATO y lonidamina.

En la Fig. 22 observamos que el tratamiento con ATO por sí solo no modifica el porcentaje de células en cada fase del ciclo respecto al control, mientras que el tratamiento con lonidamina por sí solo disminuye ligeramente la fase G₁ e incrementa G₂/M, como habíamos comentado en la Fig. 12. El tratamiento con curcumina produce una ligera disminución en la fase G₂/M. La combinación de curcumina con ATO y

lonidamina disminuye la acumulación de células en fase S y en G₂/M, lo cual es concomitante con el incremento en la apoptosis.

En la Fig. 23 observamos que el tratamiento con ATO no modifica el porcentaje de células mientras que lonidamina aumenta las células de G₁ y las disminuye en S. La no concordancia con la Fig. 22 radica en que se usan diferentes stocks de lonidamina, por tanto, hay variabilidad en los resultados, aparte de que se usan diferentes cultivos celulares aun siendo las mismas células.

Por su parte, el resveratrol produce una acumulación de células en la fase S y disminuye las células en fase G₂/M, siendo este efecto dependiente de la concentración. El efecto de parada de resveratrol sobre la fase S es disminuido o incluso eliminado cuando se pone en combinación con ATO y con lonidamina. Asimismo, el porcentaje de células en fase G₂/M es similar en los co-tratamientos a cuando se aplica resveratrol por sí solo.

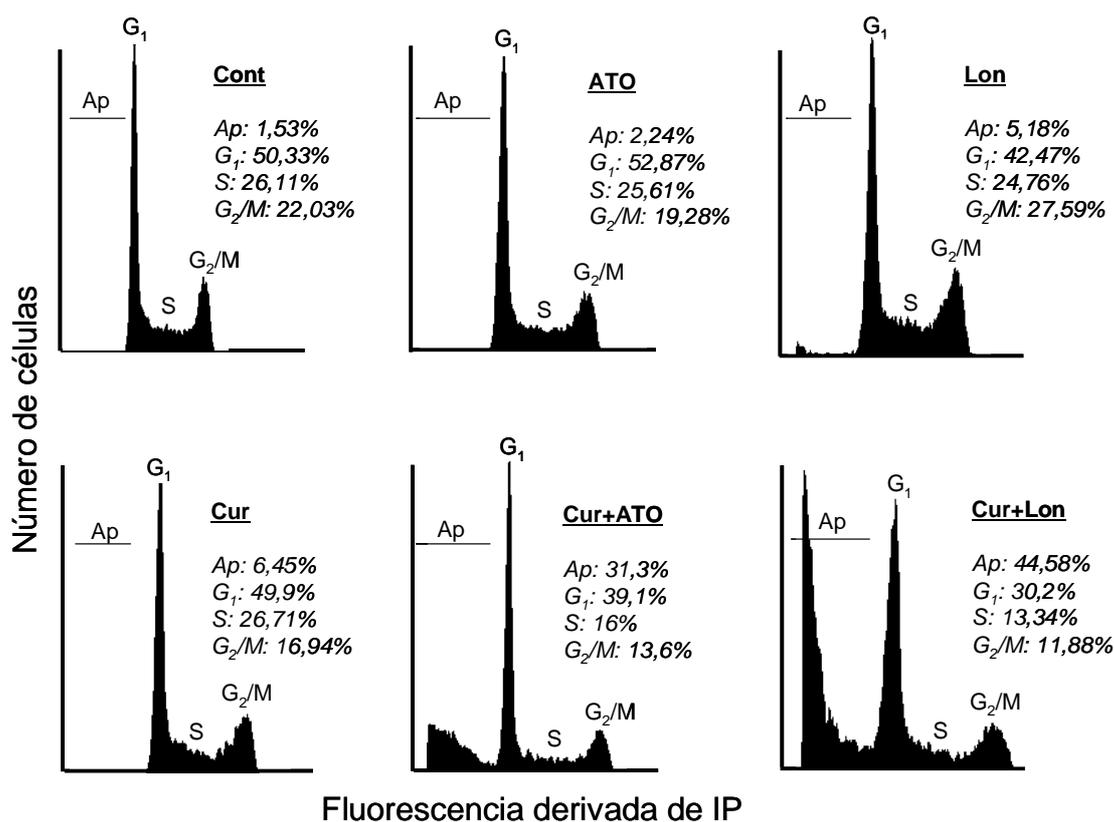


Figura 22. Análisis del efecto sobre la distribución del ciclo celular de ATO, lonidamina (Lon), curcumina (Cur), y de la combinación de curcumina con ATO y lonidamina respecto a células no tratadas (Cont) a las 24 h de tratamiento en células U-937. Se representa el número de células respecto a la fluorescencia derivada de yoduro de propidio (IP). Se muestra el porcentaje de células apoptóticas (Ap) y de células que hay en cada fase del ciclo. ATO se usó a una concentración de 2 μM, lonidamina a 100 μM y curcumina a 7,5 μM.

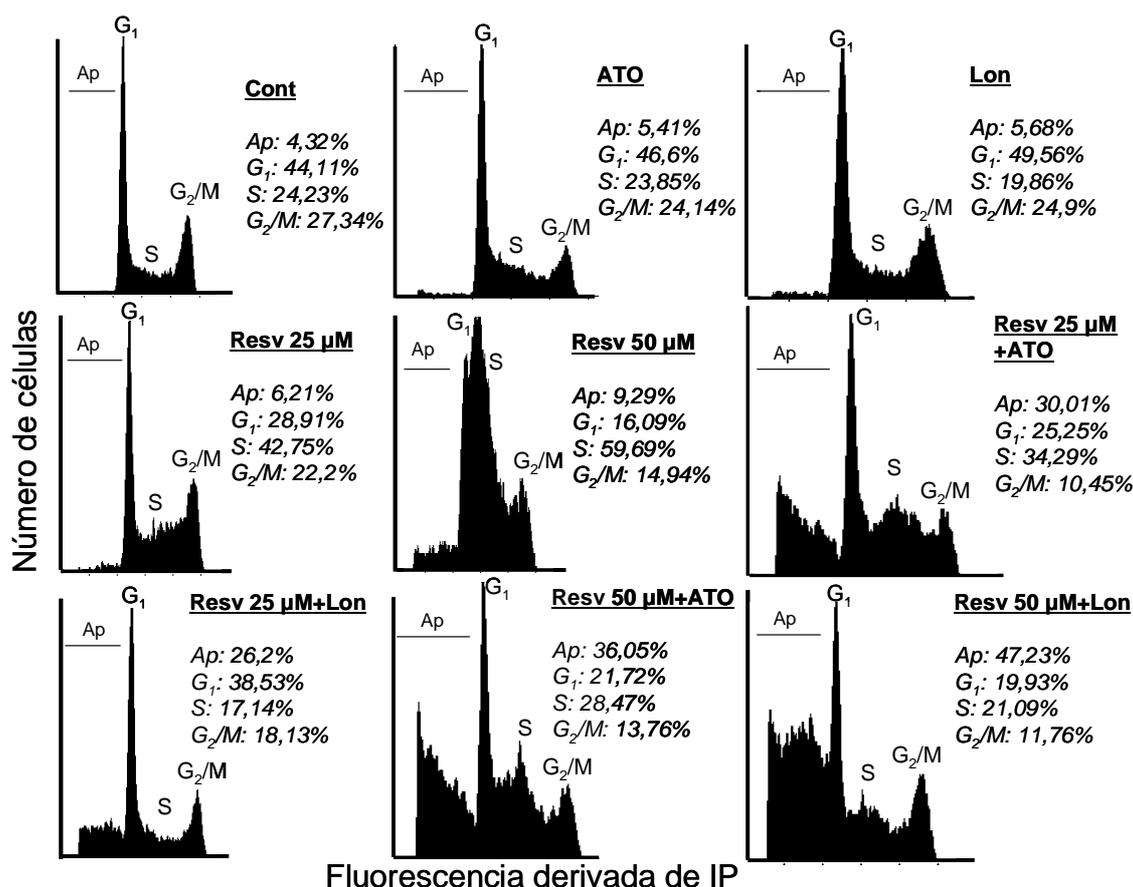


Figura 23. Análisis del efecto sobre la distribución del ciclo celular de ATO, Ionidamina (Lon), resveratrol (Resv), y de la combinación de resveratrol con ATO y Ionidamina respecto a células no tratadas (Cont) a las 24 h de tratamiento en células U-937. Se representa el número de células respecto a la fluorescencia derivada de yoduro de propidio (IP). Se muestra el porcentaje de células apoptóticas (Ap) y de células que hay en cada fase del ciclo. ATO se usó a una concentración de 2 μM, Ionidamina a 100 μM y resveratrol a 25 y 50 μM.

2.3.-ESTUDIO DE LA APOPTOSIS EN OTROS MODELOS CELULARES

Se estudiaron los efectos de curcumina, resveratrol, ATO y Ionidamina en las siguientes líneas celulares: mieloides agudas HL-60, promielocíticas NB4, linfoides Jurkat y RPMI, promonocíticas THP-1 y mieloides crónicas K562.

Los resultados de apoptosis fueron obtenidos a las 24 horas de tratamiento mediante citometría de flujo y ocasionalmente se corroboraron mediante fragmentación de cromatina (resultados no mostrados), observándose resultados cualitativamente similares.

A.-Resultados con curcumina

En células mieloides **HL-60** el efecto de los tratamientos con curcumina sobre generación de apoptosis (Fig. 24), viabilidad y distribución del ciclo celular (resultados no mostrados) fue similar al obtenido en células U-937. La curcumina, a partir de 5 μM , potencia la acción apoptótica de ATO y de lonidamina de manera más que aditiva (Fig. 24).

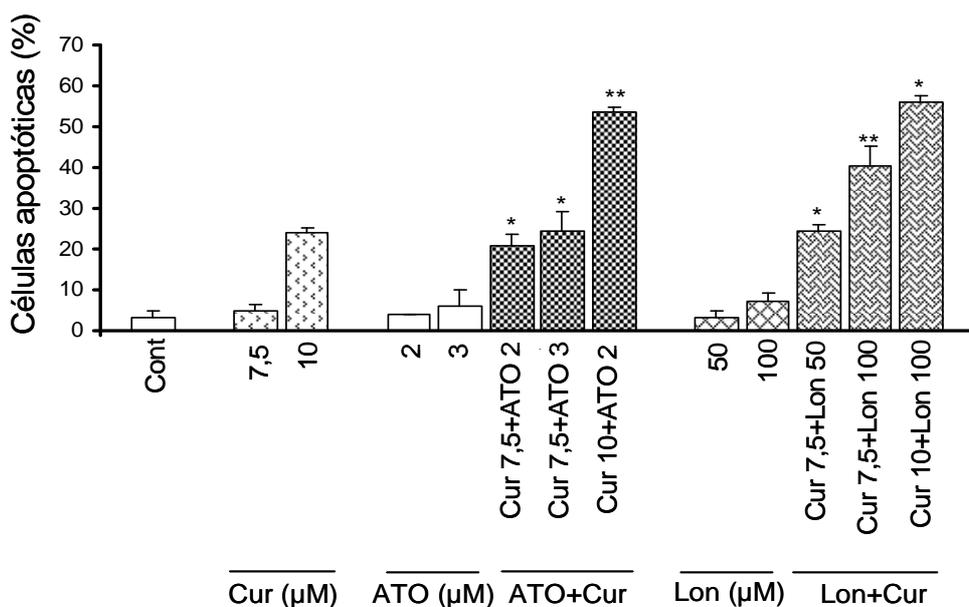


Figura 24. Inducción de apoptosis por curcumina (Cur), ATO y lonidamina (Lon) y células sin tratar (Cont) en células HL-60 durante 24 h de tratamiento. Se representa la frecuencia de apoptosis de células sin tratar (Cont) y tratadas con los diferentes agentes, tomando como criterio la fracción sub- G_1 medida por citometría de flujo. Los resultados muestran la media \pm SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos muestran que el valor de significación de los tratamientos combinados es significativamente mayor que la suma de los valores de los correspondientes tratamientos individuales. ATO se usó a una concentración de 2 y 3 μM , lonidamina a 50 y 100 μM y curcumina a 7,5 y 10 μM .

Las **células NB4** son más sensibles al ATO que otras células mieloides, por ello lo usamos a 0,5, 1 y 2 μM , mientras que son menos sensibles para la curcumina (a la concentración de 15 μM es subcitotóxica, a diferencia de las células U-937, donde es tóxica). La curcumina a partir de 7,5 μM potencia la acción apoptótica de ATO cuando éste se usa a 2 μM , así como la de lonidamina 100 μM (Fig. 25). Esta cooperación es más que aditiva aunque de menor intensidad que la mostrada en células U-937 y HL-60.

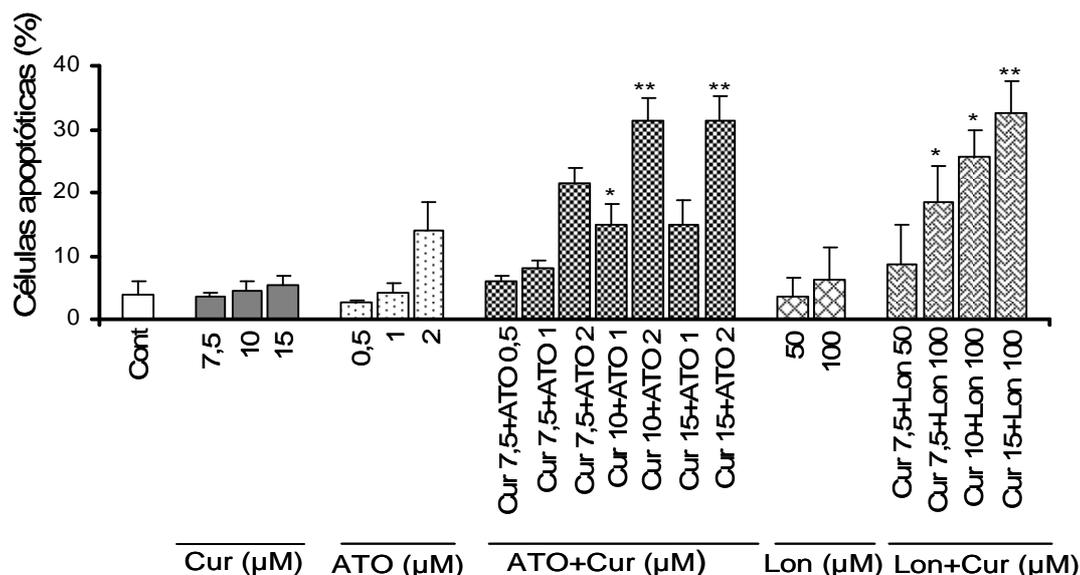


Figura 25. Inducción de apoptosis por curcumina (Cur), ATO y lonidamina (Lon) en células NB4. Se representa la frecuencia de apoptosis de células sin tratar (Cont) y tratadas con los diferentes agentes, tomando como criterio la fracción sub- G_1 medida por citometría de flujo. Los resultados muestran la media \pm SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos muestran que el valor de significación de los tratamientos combinados es significativamente mayor que la suma de los valores de los correspondientes tratamientos individuales. ATO se usó a concentraciones de 0,5 a 2 μ M, lonidamina a 50 y 100 μ M y curcumina de 7,5 a 15 μ M. Los tratamientos se aplicaron durante 24 h.

Las células Jurkat, THP-1 y sobre todo las células K562 son más resistentes a la acción del ATO, por lo que fue necesario incrementar la concentración de este agente.

En células **Jurkat** la curcumina coopera con ATO cuando éste se usa a 5 μ M y con lonidamina para producir apoptosis de manera más que aditiva (Fig. 26).

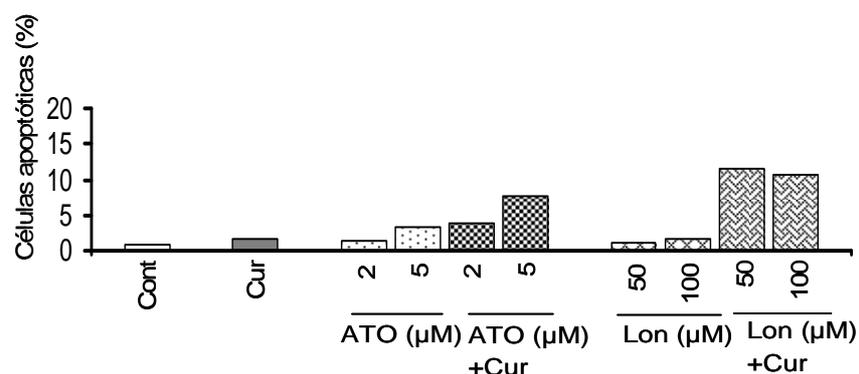


Figura 26. Inducción de apoptosis por curcumina (Cur), ATO y lonidamina (Lon) en células Jurkat. Se representa la frecuencia de apoptosis de células sin tratar (Cont) y tratadas con los diferentes agentes, tomando como criterio la fracción sub- G_1 medida por citometría de flujo. Es representativo de dos experimentos con resultados cualitativamente similares. ATO se usó a una concentración de 2 y 5 μ M, lonidamina a 50 y 100 μ M y curcumina a 7,5 μ M. Los tratamientos se aplicaron durante 24 h.

En las líneas K562 y THP-1 hay cooperación de curcumina con ATO y con lonidamina con carácter no superior a la aditividad.

En células **K562** se requiere una concentración de ATO de 10 μM para obtener potenciación de la apoptosis de curcumina sobre ATO y se produce de manera más que aditiva. La relativa resistencia de esta línea a ATO no se compensa con una respuesta necrótica; la necrosis a las 24 horas es de un 6%, porcentaje similar al control (resultado no mostrado). Sin embargo, la curcumina no potencia la acción apoptótica de lonidamina (Fig. 27A).

Cuando se analiza la distribución del ciclo celular mediante ensayos de citometría se observa que el ATO, incluso a menores concentraciones (5 μM) de aquellas en las que encontramos potenciación de la apoptosis, afecta a la proliferación celular, manifestada en la acumulación de células en las fases G_2/M (Fig. 27B). Esta respuesta citostática del ATO no fue observada claramente en las células U-937 y HL-60 incluso cuando ATO se eleva a concentraciones superiores en un período de 24 horas (resultados no mostrados). Como consecuencia de la parada en G_2/M , hay una disminución en el número de células viables, como se vio en estudios de MTT (Fig. 27C).

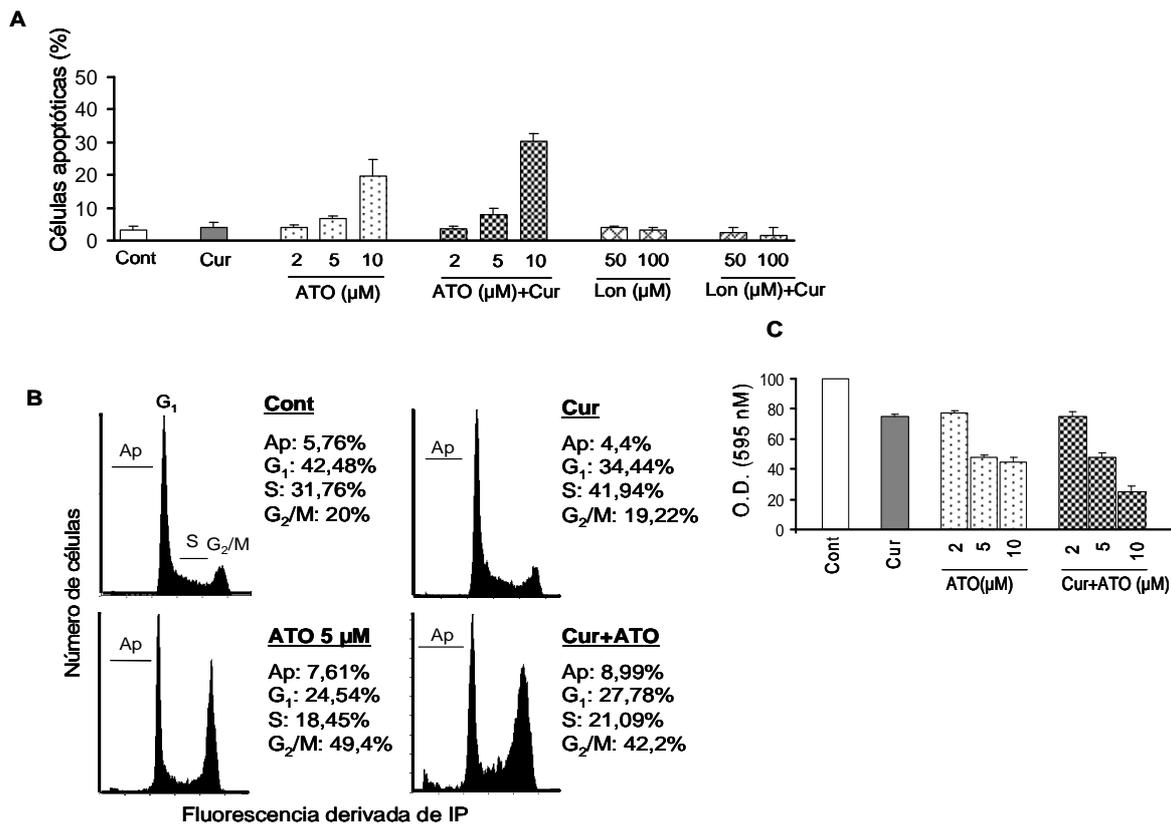


Figura 27. Inducción de apoptosis y alteraciones en viabilidad y ciclo celular por curcumina (Cur), ATO y lonidamina (Lon) en células K562 durante 24 h. En A) se representa la frecuencia de apoptosis, determinada por fragmentación/condensación de la cromatina. En B) se muestran los perfiles de distribución celular obtenidos mediante citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de células apoptóticas (Ap) y de células que hay en cada fase del ciclo. En C) se representa la citotoxicidad de los diferentes tratamientos. Los valores de absorción se representan respecto a células no tratadas (Cont), a las que se le da el valor de 100. En A) y C) los resultados muestran la media±SD de al menos tres experimentos. ATO se usó a una concentración de 2, 5 y 10 μM, lonidamina a 50 y 100 μM y curcumina a 7,5 μM.

En células THP-1 la curcumina coopera con ATO (usado a 3 y 4 μM) y con lonidamina pero de manera menos que aditiva (Fig. 28).

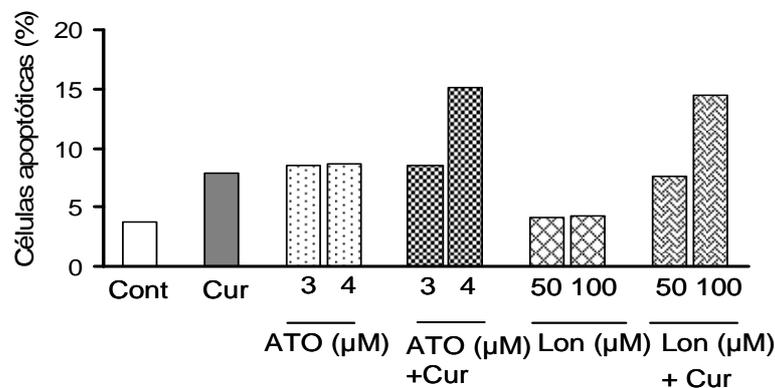


Figura 28. Inducción de apoptosis por curcumina (Cur), ATO y lonidamina (Lon) y células THP-1 durante un período de 24 h. Se representa la frecuencia de apoptosis tomando como criterio la condensación/fragmentación del DNA. Es representativo de dos experimentos con resultados cualitativamente similares. ATO se usó a una concentración de 3 y 4 μM, lonidamina a 50 y 100 μM y curcumina a 7,5 μM.

B.- Resultados con resveratrol

El efecto de resveratrol en células HL-60 sobre generación de apoptosis, viabilidad (Fig. 29) y distribución del ciclo celular (resultados no mostrados) es similar al obtenido en células U-937. El resveratrol a 50 μM coopera con ATO para potenciar la apoptosis de manera más que aditiva. Por su parte, el resveratrol a partir de 25 μM coopera con lonidamina para potenciar la apoptosis de manera más que aditiva (Fig. 29A)

Asimismo, el resveratrol coopera con ATO y con lonidamina para producir citotoxicidad celular, medida por la técnica de MTT (Fig. 29B).

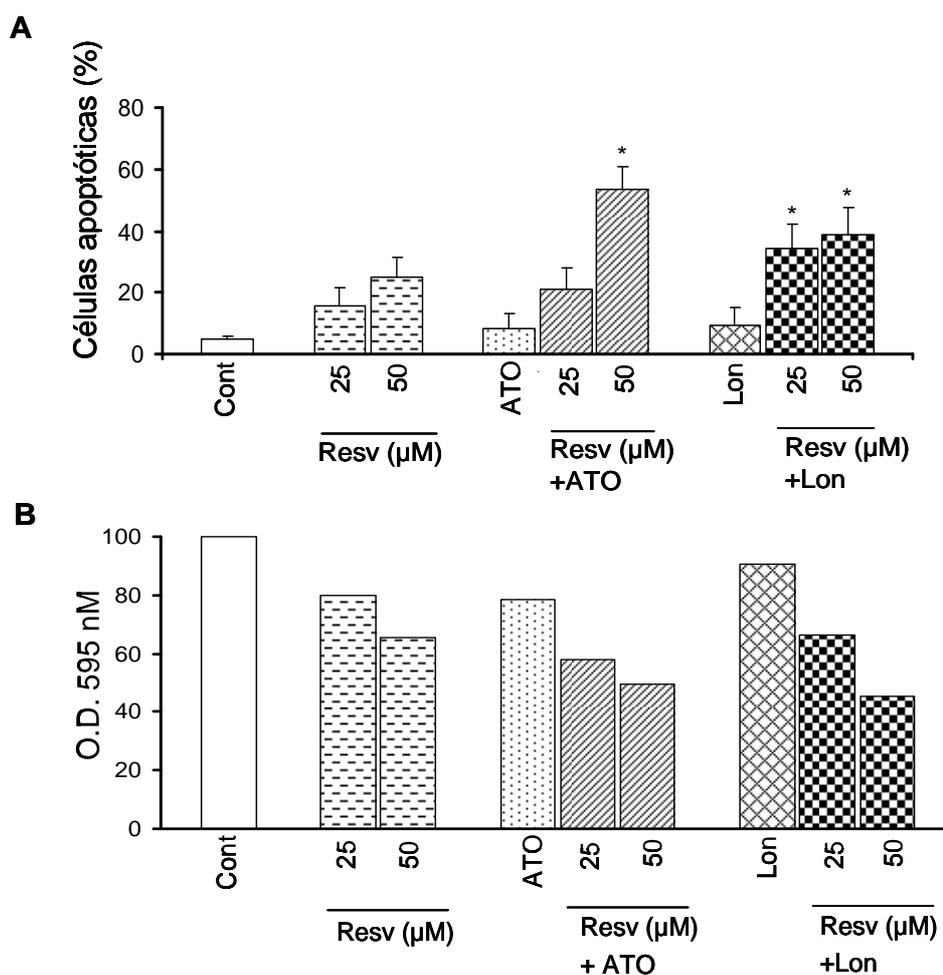


Figura 29. Inducción de muerte celular y citotoxicidad por resveratrol (Resv), ATO y lonidamina (Lon) y el co-tratamiento de resveratrol con ATO/lonidamina y células no tratadas (Cont) en células HL-60 a las 24 h de tratamiento. En A) se representan las células apoptóticas, tomando como criterio la fracción sub-G₁ medida por citometría de flujo. Los resultados muestran la media \pm SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos muestran que el valor de significación de los tratamientos combinados es significativamente mayor que la suma de los valores de los correspondientes tratamientos individuales. En B) se representa la citotoxicidad medida mediante MTT. Los valores de absorción se representan respecto a células no tratadas (Cont), a las que se le da el valor de 100. Los resultados son significativos de dos experimentos con resultados cualitativamente similares. ATO se usó a una concentración de 2 μM , lonidamina a 100 μM y resveratrol a 25 y 50 μM .

En células NB4, el resveratrol, cuando se usa a 50 μM , potencia la acción apoptótica de ATO y de lonidamina con carácter igual a la aditividad, pero con menor eficacia que en células U-937 y HL-60 (Fig. 30).

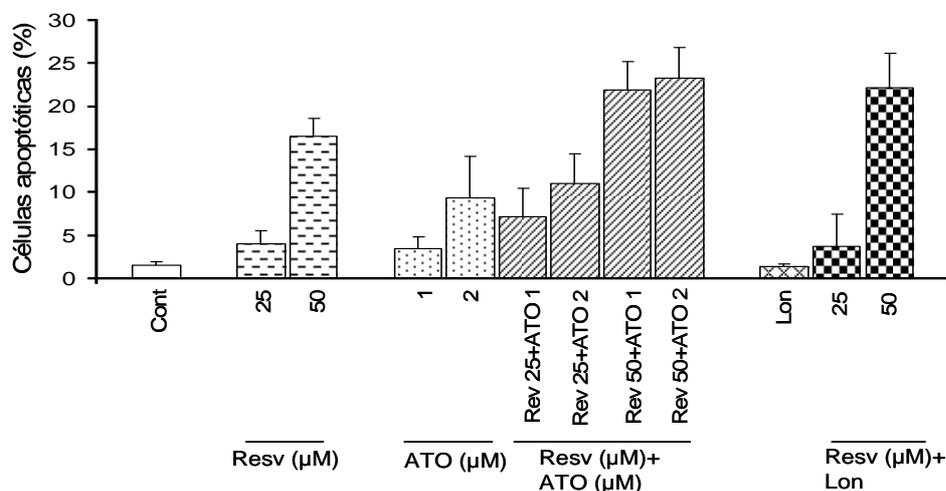


Figura 30. Inducción de apoptosis por resveratrol (Resv), ATO y lonidamina (Lon) en células NB4. Se representan las células apoptóticas, tomando como criterio la fracción sub- G_1 medida por citometría de flujo. Los resultados muestran la media \pm SD de al menos 3 experimentos. ATO se usó a una concentración de 1 y 2 μM , lonidamina a 100 μM y resveratrol a 25 y 50 μM . Los tratamientos se aplicaron durante 24 h.

El resveratrol no coopera con ATO y lonidamina para producir apoptosis ni citotoxicidad en células Jurkat, K562, THP-1 y RPMI 8866, independientemente de que las drogas produzcan efecto por sí solas.

Como ejemplo se exponen los resultados con las células K562, donde incluso se amplió el tiempo de tratamiento a 48 horas (Fig. 31). Observamos que el resveratrol (usado a 25 y 50 μM) no produce potenciación de la apoptosis de ATO (usada a 5 y 10 μM) ni de lonidamina a ninguno de los dos tiempos (Fig. 31A).

Se realizó una cuantificación aproximada de células en las fases S y G_2/M debido a las alteraciones producida por resveratrol solo. Se observó que el co-tratamiento suprime el efecto predominante de parada en fase S que produce el resveratrol (Fig. 31C).

Se realizaron ensayos de MTT (Fig. 31B). Cuando se examina la viabilidad a las 24 y 48 horas se observa una fuerte caída con ATO 10 μM solo o en combinación con resveratrol (de aproximadamente igual intensidad). Por su parte, el co-tratamiento de resveratrol con lonidamina disminuye ligeramente la viabilidad a las 48 horas.

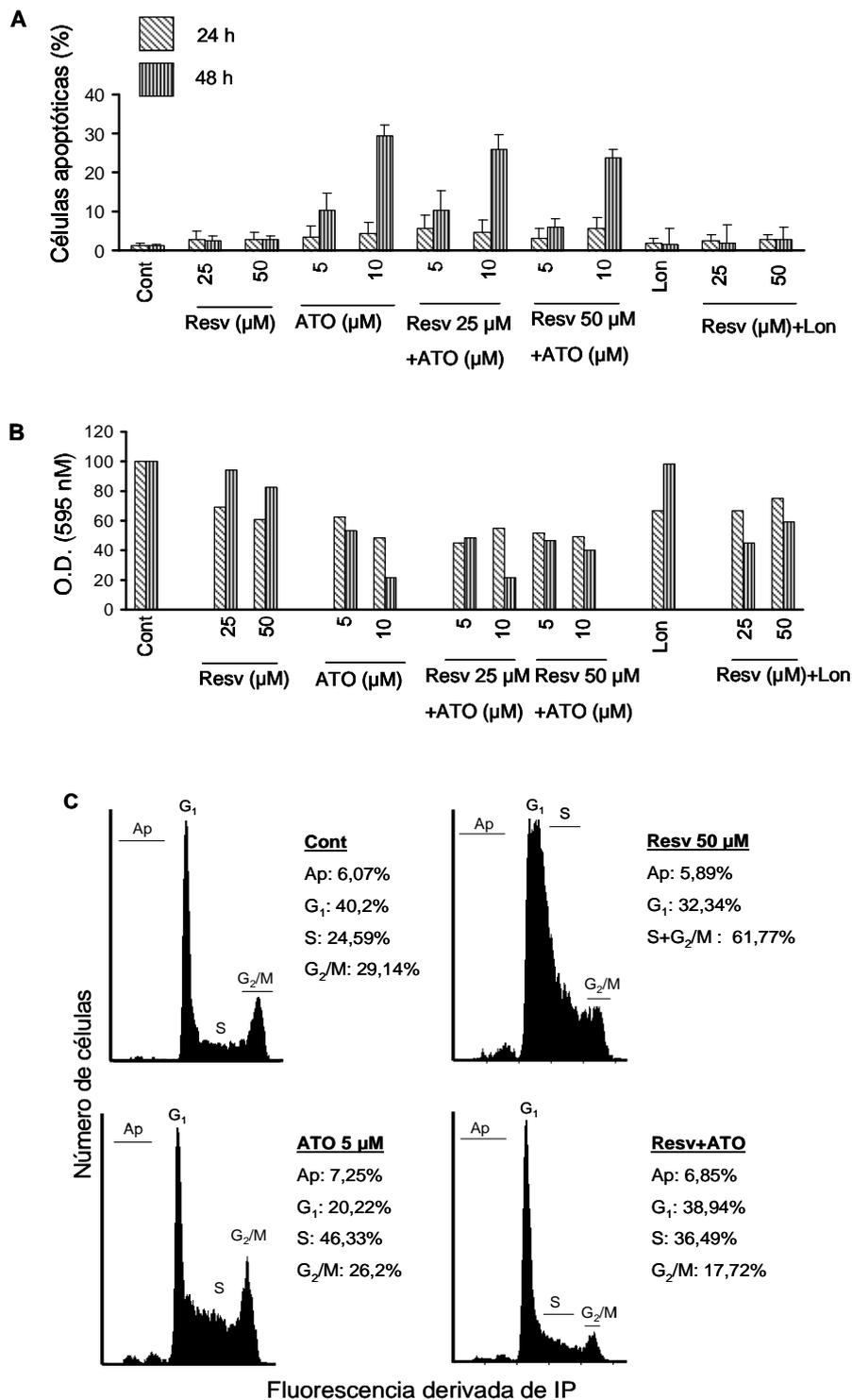


Figura 31. Inducción de apoptosis y citotoxicidad por resveratrol (Resv), ATO y lonidamina (Lon) a las 24 y 48 h en células K562. En A) se representan las células apoptóticas, tomando como criterio la fracción sub-G₁ medida por citometría de flujo. Los resultados muestran la media±SD de al menos 3 experimentos. En B) se muestran ensayos de MTT. Los valores de absorción se representan respecto a células no tratadas (Cont), a las que se le da el valor de 100. Estos resultados son representativos de dos experimentos con resultados cualitativamente similares. En C) se muestran los perfiles citométricos de distribución del ciclo celular con resveratrol, ATO 5 μM y el co-tratamiento a las 24 h y el porcentaje de células apoptóticas (Ap) y de células que hay en cada fase del ciclo. ATO se usó a una concentración de 5 y 10 μM, lonidamina a 100 μM y resveratrol a 25 y 50 μM.

2.4.-EFECTO DE CURCUMINA Y RESVERATROL EN COMBINACIÓN CON OTRAS DROGAS ANTITUMORALES

Por comparación, analizamos la capacidad de la curcumina para modular la inducción de apoptosis por otros agentes antitumorales, tales como cisplatino o citarabina (ara-C) para el caso de curcumina, o etopósido en el caso de resveratrol, que tienen su diana en el DNA y producen su rotura por diferentes mecanismos. Como ya se comentó, el cisplatino es un agente alquilante que daña el DNA por unión covalente y formación de enlaces intra o intercatenarios, ara-C es un inhibidor de la replicación del DNA mientras que etopósido se une a DNA topoisomerasa II y origina la escisión del DNA.

Se realizaron tratamientos a 24 horas. El cisplatino se usó a las concentraciones de 1 a 8 μM . Ara-C se usó a concentraciones desde 5 a 10 μM . El etopósido se usó a concentraciones que oscilan entre 0,05 y 1 μM .

El cisplatino por sí solo causa una mínima apoptosis (menos del 10%) hasta 4 μM , mientras que a 8 μM empieza a ser tóxico (Fig. 32A). Por su parte, ara-C hasta 10 μM produce una mínima apoptosis (inferior al 10%) (Fig. 33A), mientras que a 20 μM produce una apoptosis de un 30 % (resultado no mostrado). Por último, el etopósido hasta 0,1 μM causa una mínima apoptosis, mientras que a partir de 0,25 μM es tóxico (Fig. 36A).

A.- Resultados con curcumina

La curcumina coopera mínimamente con cisplatino (usada de 1-4 μM) para potenciar la apoptosis (el efecto es menos que aditivo) como se observa mediante experimentos de fragmentación de cromatina (Fig. 32A), por contenido en sub- G_1 (resultados no mostrados) y mediante la unión de anexina V (Fig. 32D). Por su parte, en experimentos con MTT se observa que la adición de curcumina disminuye muy levemente la viabilidad en relación al CDDP por sí solo (Fig. 32C).

La falta de respuesta apoptótica no implica una respuesta necrótica, como se observó mediante la incorporación de IP en ensayos de anexina V/IP (Fig. 32D) pues no hay incremento en células positivas para anexina en la combinación con CDDP respecto a cuándo se usa solo ni se observan apenas células teñidas para IP. Asimismo, en experimentos con azul de tripano hay ausencia de captación de dicho agente (resultado no mostrado).

Resultados

El cisplatino afecta a la transición celular a través de las fases S y G₂/M (Fig. 32B), como esperábamos según la literatura, lo cual podría explicar la reducción en el número total de células viables, como se vio por ensayos de MTT. Esta alteración en el ciclo celular fue atenuada en el co-tratamiento con curcumina (Fig. 32C).

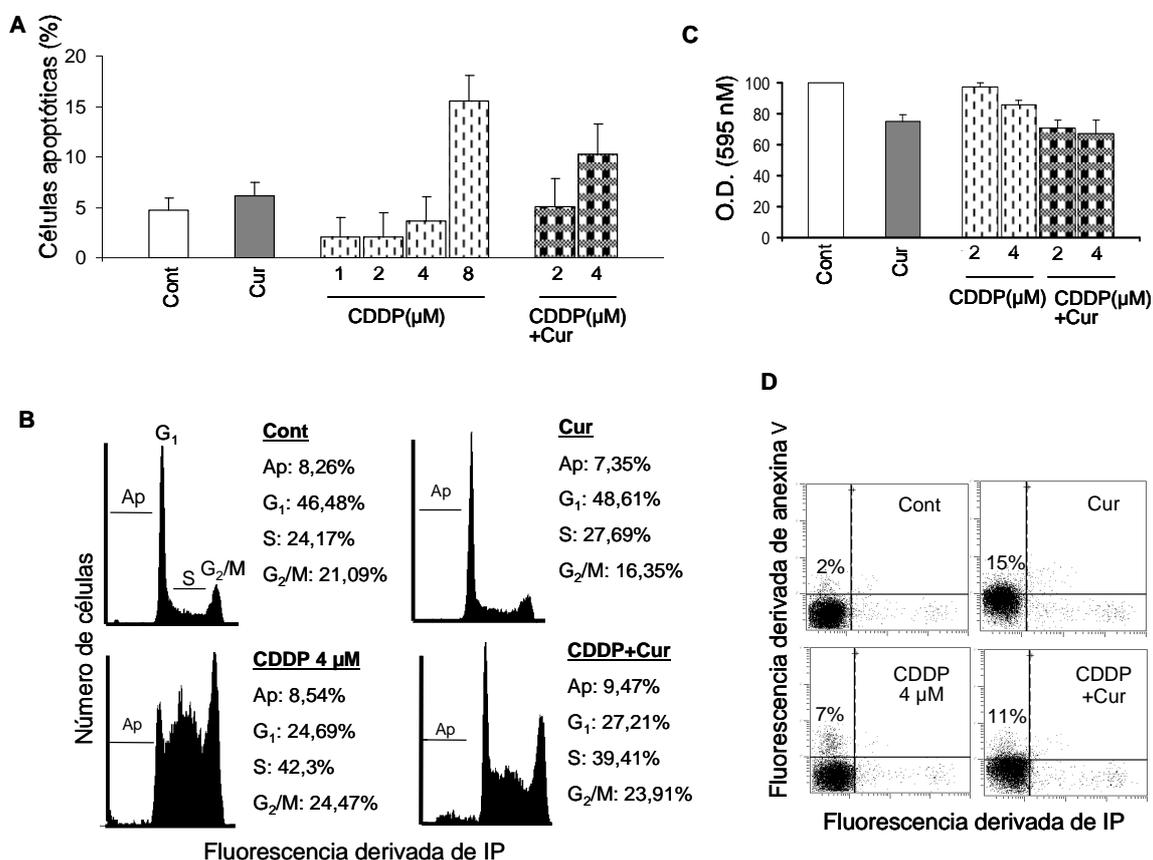


Figura 32. Inducción de apoptosis por curcumina (Cur) y cisplatino (CDDP) por sí solos, y la combinación de ambos en células U-937, a las 24 h de tratamiento. En A) se representan las células apoptóticas, tomando como criterio la condensación/fragmentación de la cromatina. En B) se muestra los perfiles de distribución del ciclo celular obtenidos por citometría de flujo de curcumina, CDDP 4 μM y la combinación de ambos. Se indica el porcentaje de células apoptóticas (Ap) y de células que hay en cada fase del ciclo. En C) se representa la viabilidad de los tratamientos, medida por MTT. Los valores de absorción se representan respecto a células no tratadas (Cont), a las que se le da el valor de 100. Los resultados muestran la media±SD de al menos 3 experimentos. En D) se representa un ensayo mediante anexina V de curcumina, CDDP 4 μM y el co-tratamiento. La curcumina se usó a 7,5 μM y CDDP a 1, 2, 4 y 8 μM.

Dado la escasa respuesta de cisplatino usada a bajas concentraciones a las 24 horas, se efectuaron nuevos ensayos sometiendo a las células U-937 a largos tratamientos (72 horas) con cisplatino (usado a una concentración de 2 μM). Bajo estas condiciones, el cisplatino causa una gran disminución en el número de células,

acumulación de células en la fase G₂/M, hipertrofia celular, apoptosis y necrosis (probablemente necrosis “secundaria”, derivada de apoptosis).

El co-tratamiento con curcumina a 2 y 4 μ M, el cual reduce por sí solo la proliferación celular pero sin causar muerte celular, no potencia sino que atenúa ligeramente la apoptosis provocada por cisplatino (Tabla 2).

Tratamiento	Número de células ^a	Células apoptóticas ^b	Células en G ₂ /M ^c
	% control		
Control	100	4 \pm 1	25 \pm 3
Curcumina 2 μ M	85 \pm 9	5 \pm 2	23 \pm 4
Curcumina 4 μ M	65 \pm 6	7 \pm 2	25 \pm 4
CDDP 2 μ M	15 \pm 3	43 \pm 6	44 \pm 5
CDDP 2 μ M+Cur 2 μ M	17 \pm 2	28 \pm 4	42 \pm 6
CDDP 2 μ M+Cur 4 μ M	15 \pm 5	35 \pm 6	45 \pm 7

Tabla 2. Modulación de la toxicidad provocada por cisplatino y curcumina, solos o en co-tratamiento, y parada en G₂/M, en tratamientos a largo plazo (72 h). Los valores representan la media de 3 determinaciones.

- Las células fueron sembradas a 10⁵ células/ml. La concentración final aproximada en el control fue 17x10⁵ células/ml.
- Medida de apoptosis por condensación/fragmentación de la cromatina.
- Número total de células en G₁+S+G₂/M (excluyendo a las células en sub-G₁).

Por otra parte, la curcumina no coopera con ara-C para potenciar la apoptosis, como se observa analizando el contenido en sub-G₁ (Fig. 33A). Ara-C por sí solo no causa modificaciones significativas en la citotoxicidad ni aumenta la citotoxicidad propia de la curcumina, según determinaciones mediante la técnica de MTT (Fig. 33B).

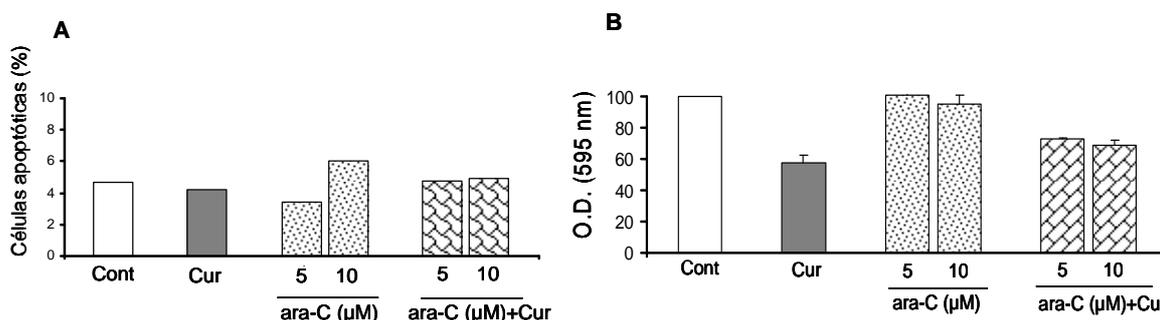


Figura 33. Inducción de apoptosis por curcumina (Cur) y citarabina (ara-C) por sí solos, y la combinación de ambos en células U-937, a las 24 h de tratamiento. En A) se representan las células apoptóticas, tomando como criterio la fracción sub-G₁ medida por citometría de flujo. Es representativo de dos experimentos con resultados cualitativamente similares. En B) se representa la citotoxicidad de los tratamientos, medida por MTT. Los valores de absorción se representan respecto a células no tratadas (Cont), a las que se le da el valor de 100. Los resultados muestran la media \pm SD de al menos 3 experimentos. La curcumina se utilizó a 7,5 μ M y ara-C a 5 y 10 μ M.

Además, se realizaron estudios de necrosis mediante penetración libre de IP con la curcumina en combinación con cisplatino y ara-C a las 24 horas de tratamiento. Como se observa en la Fig. 34, cisplatino y ara-C por sí solos o en combinación con curcumina no causan necrosis de importancia (valores no superiores al 12%).

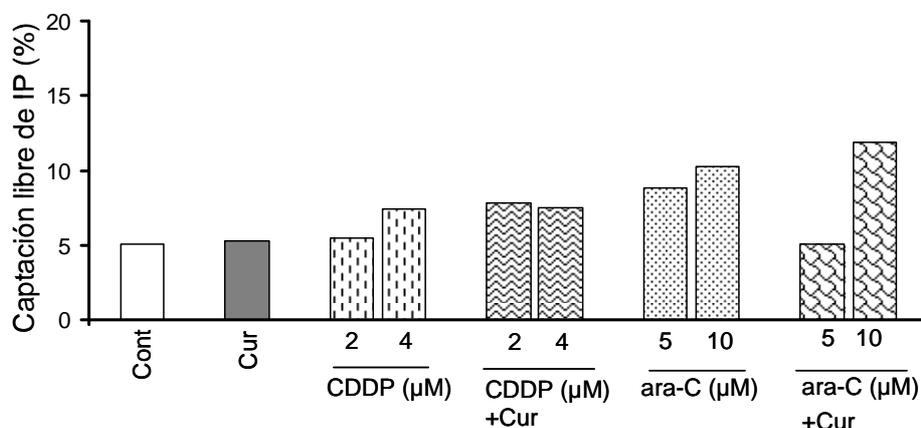


Figura 34. Se representa la frecuencia de necrosis de curcumina (Cur), cisplatino (CDDP), citarabina (ara-C) y la combinación de curcumina con ambos agentes a las 24 h de tratamiento. Es representativo de dos experimentos con resultados cualitativamente similares. La curcumina se puso a una concentración de 7,5 μM , CDDP a 2 y 4 μM y ara-C a 5 y 10 μM .

En resumen, la curcumina no potencia la toxicidad de las drogas con diana en el DNA estudiadas, cisplatino y ara-C.

B.- Resultados con resveratrol

Se analizó la capacidad de resveratrol para modular la acción apoptótica de cisplatino y de etopósido.

Como se observa en la Fig. 35 el cisplatino a 2 y 4 μM causa una mínima apoptosis. Cuando se pone un co-tratamiento de resveratrol con cisplatino no hay cooperación para producir apoptosis.

En cuanto al ciclo celular, aunque una cuantificación exacta no fue posible debido al solapamiento entre diferentes fases (S o G_2/M), parece que la combinación de resveratrol con cisplatino atenúa ligeramente la parada en la fase S producida por el cisplatino cuando se usa solo (Fig. 35B).

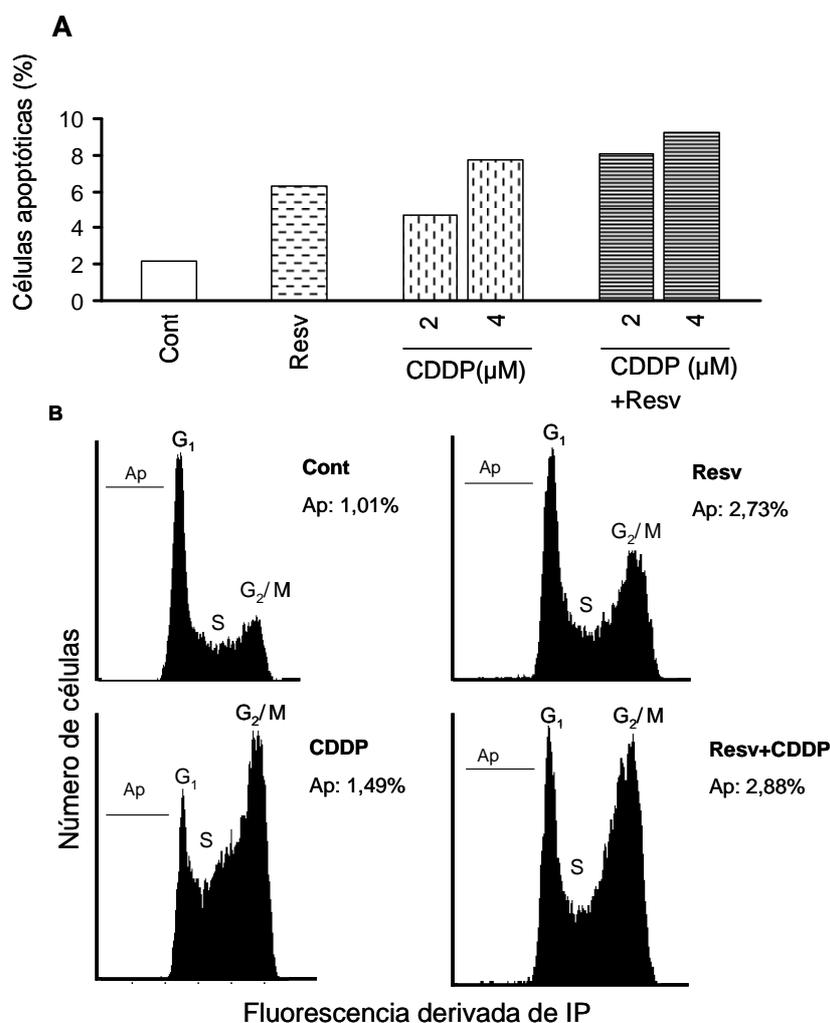


Figura 35. Inducción de apoptosis por resveratrol (Resv) y cisplatino (CDDP), por sí solos, y el co-tratamiento en células U-937, a las 24 h de tratamiento. En A) se representa la frecuencia de apoptosis de cultivos sin tratar (Cont) y tratados con los agentes indicados, tomando como criterio la fracción sub- G_1 medida por citometría de flujo. Es representativo de dos experimentos con resultados cualitativamente similares. En B) se muestra los perfiles de distribución del ciclo celular obtenido por citometría de flujo de resveratrol, CDDP 4 μ M y la combinación de ambos, así como el porcentaje de células apoptóticas (Ap) de los diferentes tratamientos. El resveratrol se usó a 25 μ M y CDDP a 2 y 4 μ M.

Por otra parte, el resveratrol a 25 μ M potencia la acción apoptótica de etopósido, cuando éste se usa a concentraciones subcitotóxicas de 0,05 y 0,1 μ M, pero no así cuando se usa a dosis superiores (Fig. 36A). El etopósido, cuando se usa a dosis a partir de 0,25 μ M, disminuye ligeramente la viabilidad media como se observó por MTT. Cuando se realizan co-tratamientos de resveratrol con etopósido observamos que la viabilidad no disminuye respecto a cuando se ponen ambos agentes por separado (Fig. 36B).

No fue posible estimar el porcentaje de células en cada fase del ciclo debido a las profundas alteraciones producidas por etopósido y resveratrol en la distribución del

mismo. A pesar de esto, observamos que el etopósido produce parada en G₂/M y cuando se combina con el resveratrol domina el efecto de éste, es decir, hay una acumulación de células en fase S (Fig. 36C).

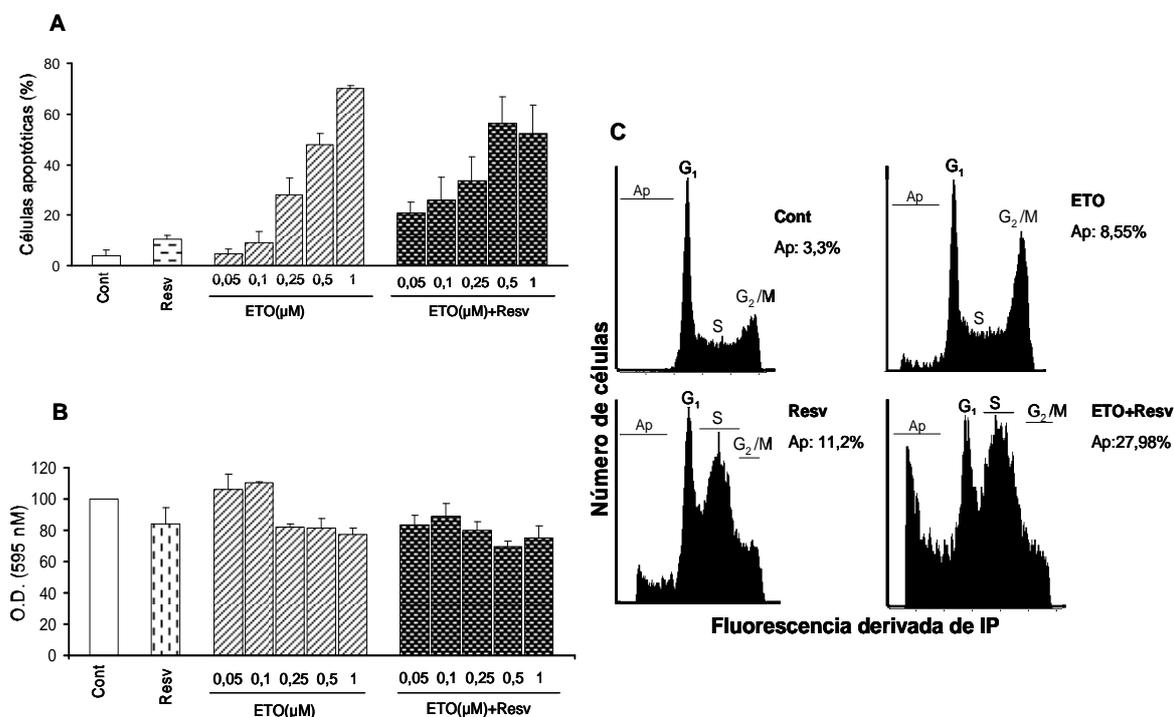


Figura 36. Inducción de apoptosis por resveratrol (Resv) y etopósido (ETO), por sí solos, y la combinación de ambos en células U-937, a las 24 h de tratamiento. En A) se representa la frecuencia de apoptosis de cultivos sin tratar (Cont) y tratados con los agentes indicados, tomando como criterio la fracción sub-G₁ medida por citometría de flujo. En B) se representa la viabilidad de los tratamientos, medida por MTT. Los valores de absorción se representan respecto a células no tratadas (Cont), a las que se le da el valor de 100. Los resultados muestran la media±SD de al menos 3 experimentos. En C) se muestra los perfiles de distribución del ciclo celular obtenida por citometría de flujo de resveratrol, etopósido 0,1 μM y la combinación de ambos, así como el porcentaje de apoptosis (Ap) de los diferentes tratamientos. El resveratrol se puso a una concentración de 25 μM y etopósido a 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 y 1 μM.

En resumen, el resveratrol no potencia la acción apoptótica de las drogas con diana en el DNA cisplatino y etopósido.

2.5.-EVENTOS MITOCONDRIALES

Dado que ATO y lonidamina son drogas con diana en la mitocondria procedemos a analizar parámetros de disfunción mitocondrial: modulación de proteínas reguladoras de la apoptosis en la vía intrínseca (mitocondrial), y potencial de membrana.

1.- Proteínas de la vía mitocondrial

Analizamos algunas de las proteínas que regulan la ejecución de la apoptosis en la vía intrínseca, a saber:

- Familia Bcl-2 (proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L y pro-apoptóticas Bax y Bid). La activación de Bax se detecta por su translocación a la membrana mitocondrial (incrementa su cantidad en la fracción mitocondrial y disminuye en la fracción citosólica). La activación de Bid es consecuencia de su rotura proteolítica y se detecta por una disminución en la cantidad de la pro-forma de Bid de 23 kDa (el anticuerpo usado no detecta la forma activa).

- Extrusión de citocromo *c* de la mitocondria al citoplasma, el cual es requerido para la formación del apoptosoma. Se demostró usando extractos de proteínas citosólicas.

- Extrusión de Omi/HtrA2, proteína mitocondrial, que tras su liberación de la mitocondria se une y dirige la degradación de XIAP. Como en el caso de citocromo *c*, se analizó usando extractos citoplásmicos. Se analizó sólo con resveratrol.

- Expresión de XIAP (inhibidor de apoptosis). Dado que las XIAP son proteínas inhibidoras de las caspasas, cuando disminuye su expresión, las caspasas se activan.

- Caspasa-9, una caspasa iniciadora en la ruta mitocondrial y caspasa-3, ejecutora. Se mide su fragmentación/activación. Con el resveratrol, se midió también la expresión de caspasa-8.

Los experimentos se realizaron a las 16 horas, cuando la apoptosis empieza a ser detectada.

1.1.-Curcumina

Los resultados se reflejan en la Fig. 37.

a) Los tratamientos no modifican sustancialmente la expresión total de Bcl-2, excepto una ligera disminución en el co-tratamiento de curcumina con lonidamina.

b) Los tratamientos causan la activación de las proteínas pro-apoptóticas Bid y Bax, aunque la expresión total de esta última no se modifica (resultado no mostrado).

c) Los tratamientos estimulan la liberación de citocromo *c* de la mitocondria al citosol.

d) Los tratamientos disminuyen la expresión de XIAP, probablemente debido a su degradación.

e) Los tratamientos producen la rotura/activación de caspasa-9, así como de caspasa-3.

En general, las alteraciones de mayor intensidad se produjeron en los tratamientos combinados (curcumina en combinación con ATO o lonidamina), lo cual es consistente con la mayor tasa de generación de apoptosis (véase Fig. 13).

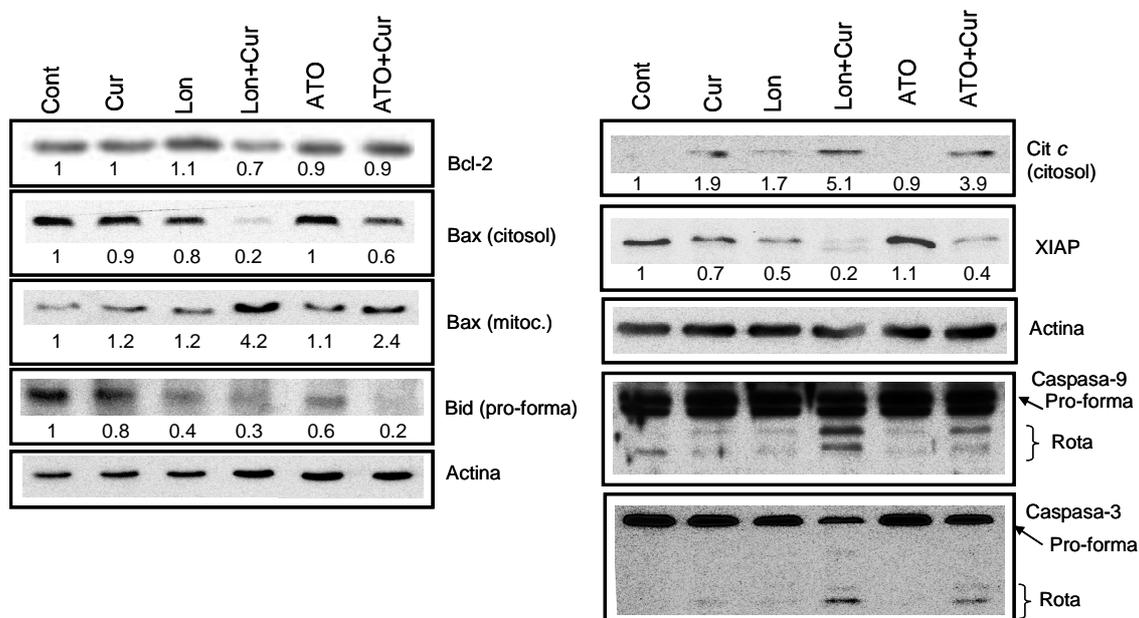


Figura 37. Expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis producida por curcumina. Las células U-937 fueron tratadas durante 16 h con curcumina 7,5 μ M, ATO 2 μ M y lonidamina 100 μ M, solos o en combinación. Las figuras muestran los niveles relativos de Bcl-2, Bid (pro-forma de 21 Kda) y XIAP, determinadas por inmunotransferencia; la liberación de citocromo *c* al citosol, determinada por el incremento en extractos citosólicos; translocación de Bax a la mitocondria, determinado por el incremento en fracción mitocondrial y disminución en extractos citosólicos; y maduración de procaspasa -9 y -3, como revela la aparición de fragmentos derivados de su rotura. Los números debajo de cada *blot* indican la intensidad de las bandas en relación al control (valor arbitrario de 1), determinado por densitometría. Los niveles totales de β -actina fueron medidos como control interno.

1.2.-Resveratrol

Los ensayos de *Western blot* se realizaron con dos concentraciones de resveratrol: 25 y 50 μM . La Fig. 38 muestra los resultados.

a) Respecto a Bcl-2, el resveratrol por sí solo, la lonidamina y el co-tratamiento de resveratrol 25 μM con ATO y con lonidamina aumenta su expresión mientras que los co-tratamientos con resveratrol 50 μM apenas la incrementan.

b) El resveratrol, sobre todo a 25 μM , aumenta la expresión de Bcl-X_L. En las combinaciones de resveratrol con ATO y lonidamina hay disminución en la expresión de Bcl-X_L.

c) Los tratamientos no modifican la expresión total de Bax (resultado no mostrado). El co-tratamiento de resveratrol con ATO y con lonidamina produce la translocación de la proteína pro-apoptótica Bax a la fracción mitocondrial, ya que observamos un aumento en la expresión de esta proteína.

d) El resveratrol, solo y en los co-tratamientos, apenas modifica la expresión de la pro-forma de Bid.

e) Los tratamientos de resveratrol con ATO y con lonidamina estimulan la liberación de citocromo *c* de la mitocondria al citosol.

f) El co-tratamiento de resveratrol con ATO y con lonidamina produce generalmente una disminución en los niveles de XIAP.

g) Los co-tratamientos estimulan la liberación de Omi/HtrA2 de la mitocondria al citosol. Esto se corresponde, en general, con la disminución en los niveles de XIAP.

h) El co-tratamiento de resveratrol con ATO y con lonidamina producen la rotura/activación de caspasa-3.

En general, las alteraciones de mayor intensidad se produjeron en los tratamientos combinados (resveratrol más ATO o lonidamina), lo cual es consistente con la mayor tasa de generación de apoptosis (véase Fig. 17).

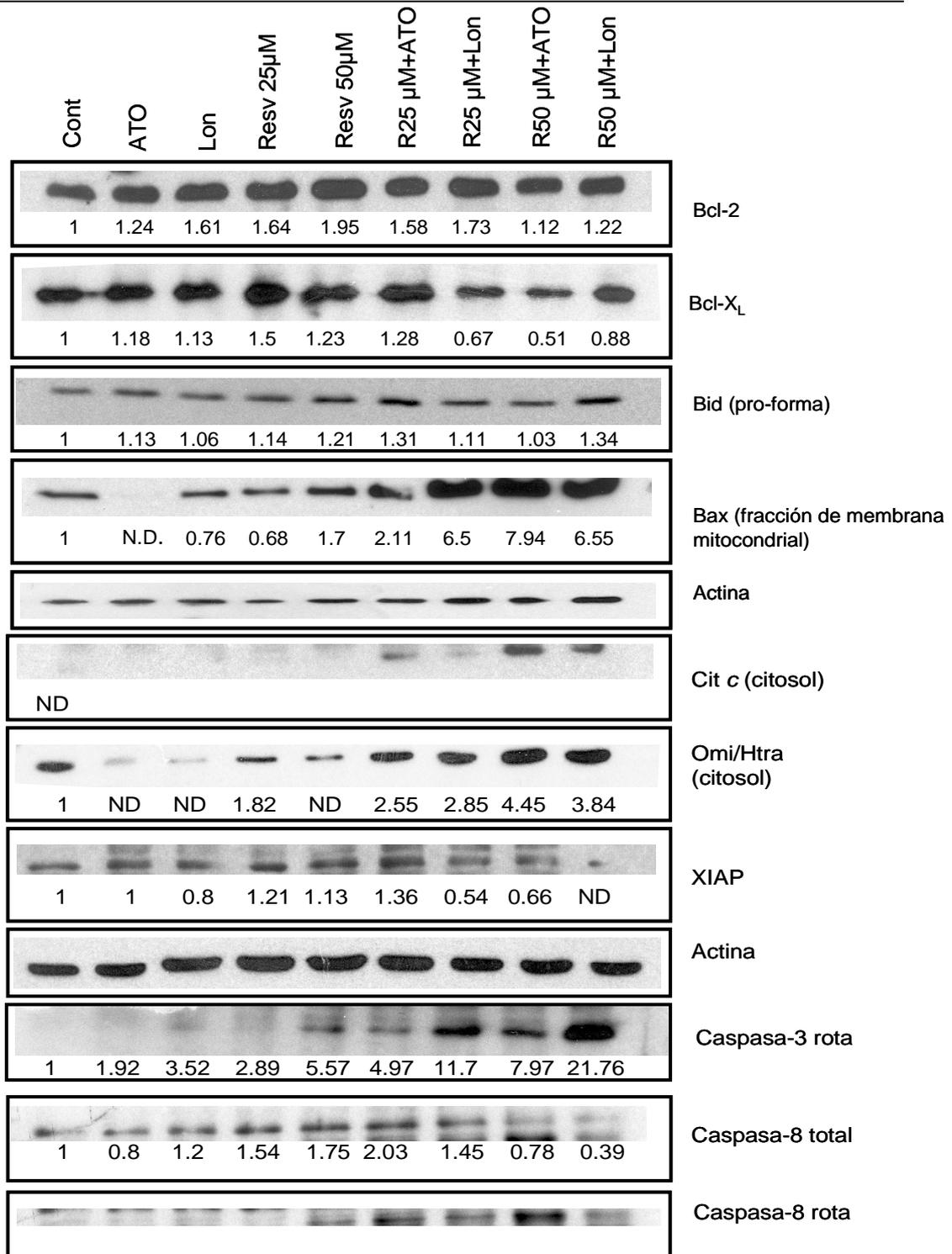


Figura 38. Expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis producida por resveratrol. Las células U-937 fueron tratadas durante 16 h con resveratrol 25 o 50 µM, ATO 2 µM y lonidamina 100 µM, solos o en combinación. Las figuras muestran los niveles relativos de Bcl-2, Bcl- X_L, Bid (pro-forma de 21 Kda) y XIAP determinados por inmunotransferencia; presencia de Bax en la fracción de membrana mitocondrial determinado por incremento en la fracción mitocondrial; liberación de citocromo c y Omi/Htra2 al citósol, determinada por el incremento en extractos citosólicos; maduración de procaspasa-3, como revela la aparición de fragmentos derivados de su rotura y la expresión de la forma total (57 Kda) y rota (41 Kda) de caspasa-8. Los números debajo de cada blot indican la intensidad de las bandas en relación al control (valor arbitrario de 1), determinado por densitometría. Los niveles totales de β-actina fueron medidos como control interno. N.D.: no densitometrable por defectos técnicos de irregularidades en la transferencia o niveles de expresión bajos no superiores al background.

Como se observa en la Fig. 38, el resveratrol por sí solo y en combinación con ATO y con lonidamina produce rotura de caspasa-8.

La caspasa-8 se puede activar como consecuencia de la vía ejecutora extrínseca o bien como consecuencia secundaria de la activación de la vía intrínseca o mitocondrial. Por ello, se hicieron experimentos con células U-937 transfectadas con Bcl-2, en las cuales está suprimida la activación de la vía mitocondrial. Observamos que en estas células se inhibe por completo la inducción de apoptosis (Fig. 39). Estos resultados sugieren que la inducción de apoptosis se lleva a cabo sólo por activación de la vía mitocondrial y que la activación de caspasa-8 es un evento secundario derivado de ésta.

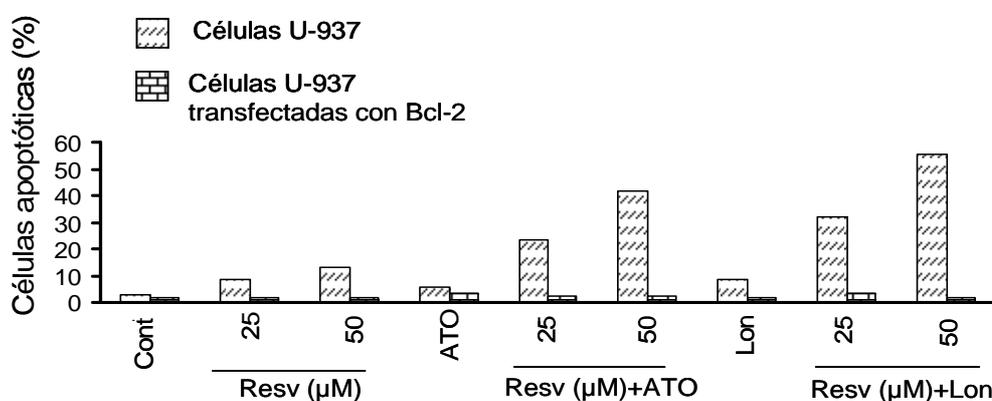


Figura 39. Inducción de apoptosis por resveratrol (Resv), ATO y lonidamina (Lon) en células U-937 normales y células U-937 transfectadas con Bcl-2. Se representan las células apoptóticas, tomando como criterio la fracción sub-G₁ medida por citometría de flujo. Los resultados son representativos de varios experimentos con resultados cualitativamente similares. ATO se usó a una concentración de 2 μM, lonidamina a 100 μM y resveratrol a 25 y 50 μM. Los tratamientos se aplicaron durante 24 h.

2.- Potencial de membrana mitocondrial

Se analizó la disfunción mitocondrial mediante dos parámetros: caída del potencial de membrana ($\Delta\psi_m$), y apertura de poro mediante la técnica de calceína.

El potencial de membrana se mide normalmente usando agentes catiónicos, como rodamina, JC-1 o DiOC₆, los cuales emiten en FL1. Como observamos en la Fig. 14, la curcumina produce autofluorescencia verde en FL1. Por tanto, con curcumina no se pudo usar ninguna de estas dos sondas. Empleamos la sonda DiIC₁ (5), que emite en FL3, para medir el potencial de membrana con la curcumina.

Se analizó la capacidad de los tratamientos para causar disipación del potencial de membrana mitocondrial a dos tiempos: antes de la ejecución de la apoptosis (6 horas) y cuando se empieza a producir la misma (16 horas).

En las gráficas del potencial de membrana observamos una población principal correspondiente a las células con alto potencial de membrana y, ocasionalmente, otra población secundaria correspondiente a las células con bajo potencial de membrana, que consideramos separadamente.

2.1.-Curcumina

Representamos el potencial de membrana analizando en primer lugar la población total de células y comparando cada tratamiento respecto al control y, por otra parte, la proporción de células que tienen bajo $\Delta\psi_m$.

-Analizando la población total de células (Fig. 40A), la curcumina por sí sola y en combinación con ATO y con lonidamina no modifica sustancialmente el potencial de membrana a ninguno de los tiempos de tratamiento.

- Cuando analizamos la población de células con bajo potencial de membrana (Fig. 40B, C y D), observamos que la curcumina, el ATO y la lonidamina no producen variaciones. Por su parte, el co-tratamiento de curcumina con ATO y con lonidamina produce un incremento de la sub-población de células con un reducido potencial de membrana, que se aprecia por la reducción de la fluorescencia derivada de DilC₁ (5) a las 16 horas de tratamiento. Esta población presumiblemente se corresponde con las células que están ejecutando la apoptosis (véase Fig. 16). En la Fig. 40C y D se representan los perfiles obtenidos por citometría de flujo a las 6 y 16 horas.

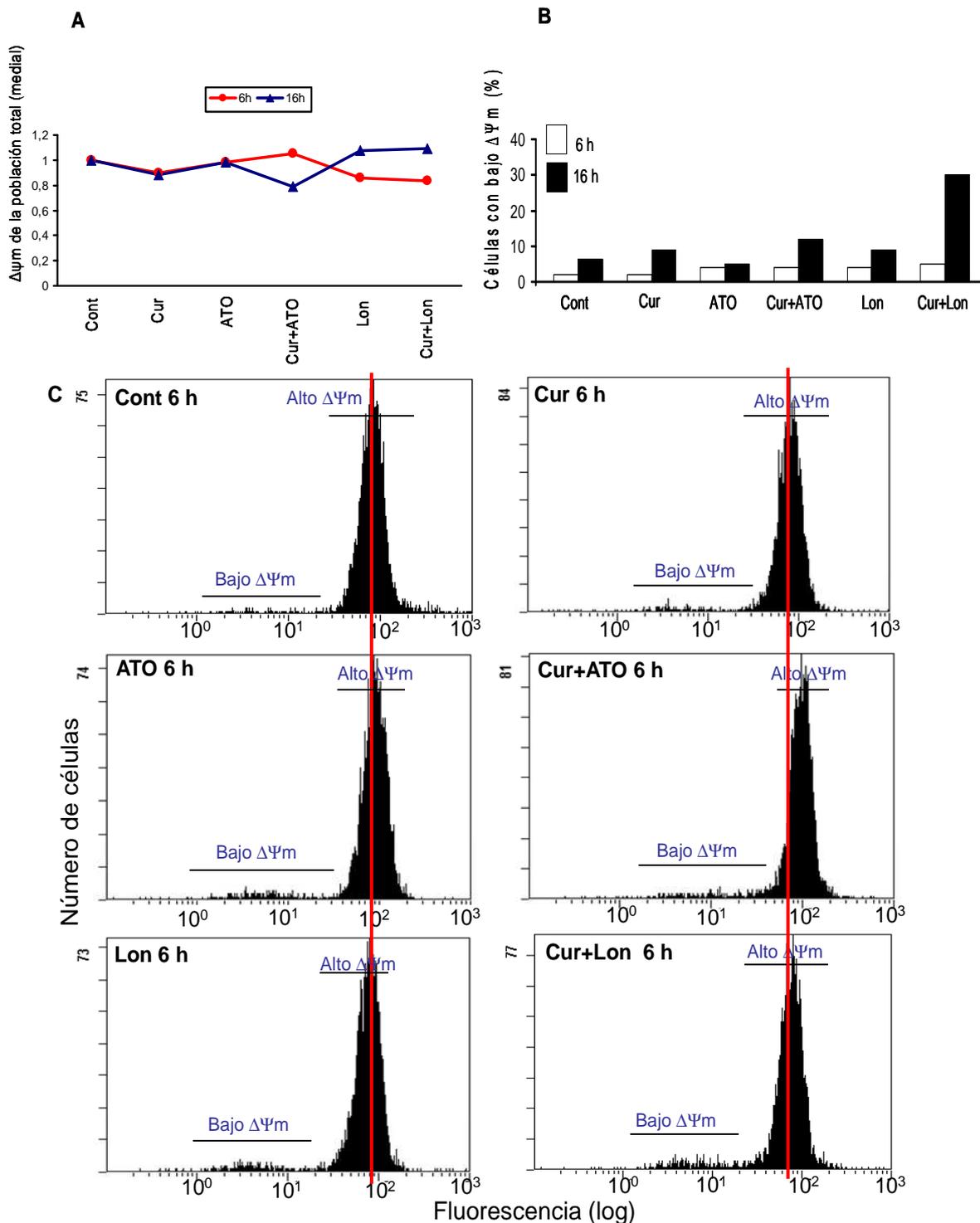


Figura 40. Disipación del potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) en células U-937 tratadas a los tiempos indicados con ATO 2 μM o lonidamina 100 μM , solos o en combinación con curcumina 7,5 μM a las 6 y 16 h. Las alteraciones en $\Delta\psi_m$ fueron determinadas por marcaje con DiIC₁ (5) y citometría de flujo. En A) se representa el $\Delta\psi_m$ medio de la población total de células en relación con el control (Cont), al que se le da el valor arbitrario de 1. B) muestra la frecuencia de células con bajo $\Delta\psi_m$. En A) y B) los datos son representativos de dos experimentos con resultados cualitativamente similares. C) muestra las gráficas con los diferentes tratamientos determinados por citometría de flujo a las 6 h. La línea roja vertical muestra el valor medio de fluorescencia en el control, para identificar el desplazamiento producido por los tratamientos.

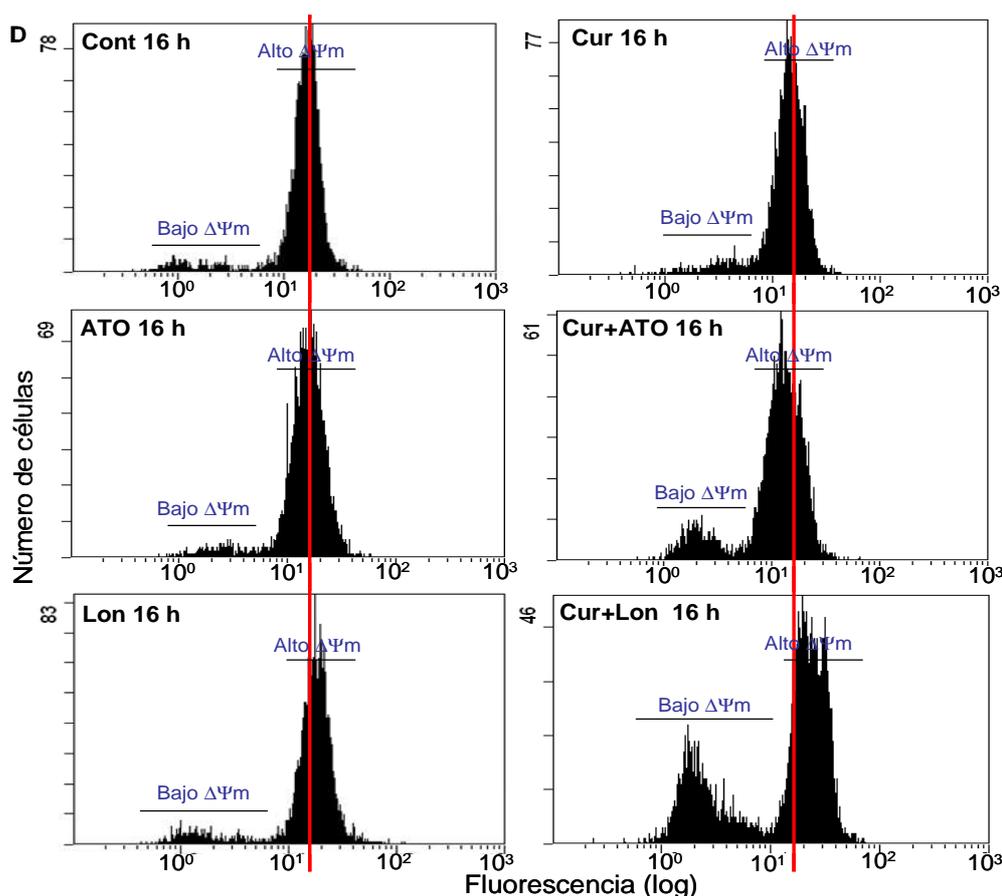


Figura 40. D) muestra las gráficas con los diferentes tratamientos determinados por citometría de flujo a las 16 h. La línea roja vertical muestra el valor medio de fluorescencia en el control, para identificar el desplazamiento producido por los tratamientos.

Se realizaron experimentos con varios agentes para analizar la relación entre la caída del potencial de membrana y la apoptosis. Por un parte, ciclosporina A (CsA), un inhibidor del poro de transición mitocondrial (mPTP) por unión a ciclofilina D y, por otra parte, el inhibidor de pan-caspasas z-VAD-fmk.

Como observamos en la Fig. 41, el co-tratamiento con CsA (se probó su eficacia de 2-7 μM y se seleccionó a 5 μM) no evita la disipación del $\Delta\psi\text{m}$ ni la ejecución de la apoptosis. Por su parte, z-VAD inhibe la apoptosis y previene la aparición de células con bajo potencial de membrana. La reducción del potencial de membrana parece una respuesta dependiente de caspasas puesto que es revertida por z-VAD. Por tanto, la aparición de esa población de células es un evento tardío, se trata de las células que están ejecutando la apoptosis.

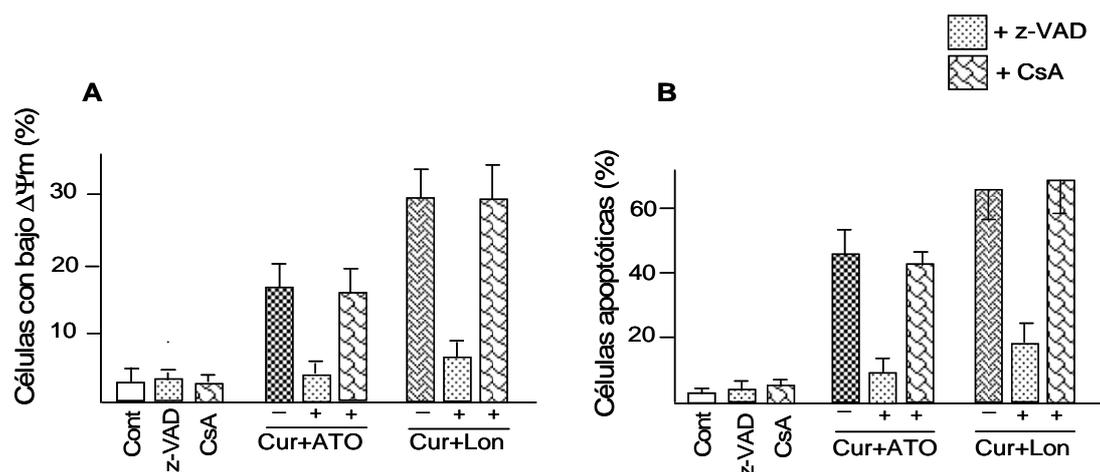


Figura 41. Efecto de inhibidores de caspasas y de mPTP sobre el potencial de membrana en células U-937. Se representa la frecuencia de células con bajo $\Delta\psi_m$ (A) y la frecuencia de células apoptóticas (B) una vez que se han tratado las células durante 16 h con un co-tratamiento de curcumina más ATO/lonidamina, bien en ausencia (-) o en presencia de 50 μM z-VAD-fmk (+z-VAD) o 5 μM CsA (+CsA). Los inhibidores se aplicaron 2 h antes de los tratamientos. ATO se usó a una concentración de 2 μM , lonidamina a 100 μM y curcumina a 7,5 μM .

2.2.- Resveratrol

Se midió el potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) a las 6 y 16 horas mediante marcaje con las sondas DilC1 (5) y rodamina y citometría de flujo. Se emplearon dos concentraciones de resveratrol: 25 y 50 μM .

Representamos el potencial de membrana analizando en primer lugar la población principal (total) de células y comparando cada tratamiento respecto al control y, por otra parte, la proporción de células que tienen bajo $\Delta\psi_m$.

a) DilC₁(5)

En el co-tratamiento de resveratrol con ATO y con lonidamina se utilizó la concentración de 25 μM .

- Analizando la población total de células (Fig. 42A), se observa que el resveratrol no modifica el potencial de membrana a las 6 y 16 horas. El co-tratamiento de resveratrol con ATO y lonidamina induce hiperpolarización en la membrana mitocondrial a las 16 horas.

- Cuando analizamos la población de células con bajo potencial de membrana por citometría de flujo (Fig. 42B, C y D) observamos que el resveratrol aumenta dicha población a las 16 horas. El ATO no modifica esta población, mientras que lonidamina la aumenta ligeramente a las 16 horas. El resveratrol en combinación con ATO y con

lonidamina aumenta la población de células con bajo potencial de membrana a partir de las 6 horas de tratamiento en comparación a los tratamientos individuales, siendo el incremento más notorio en el caso del co-tratamiento con lonidamina.

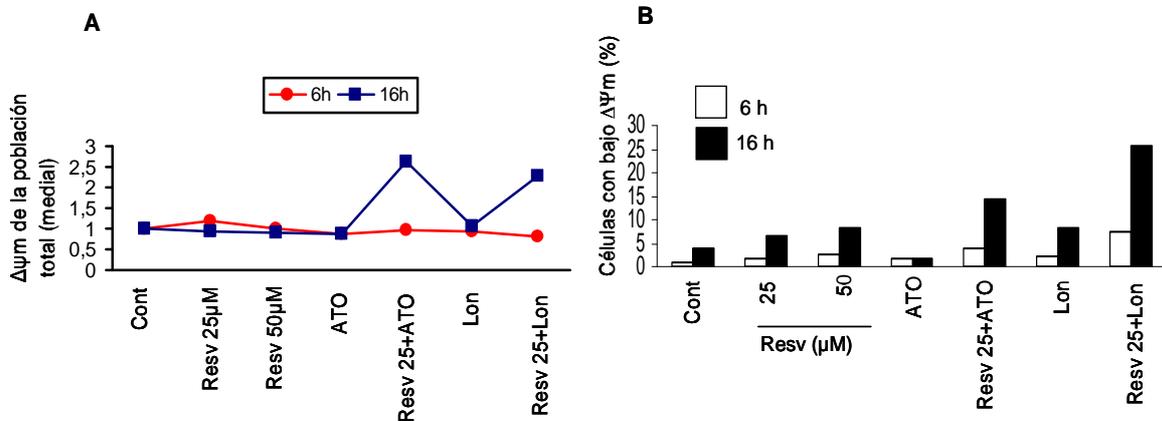
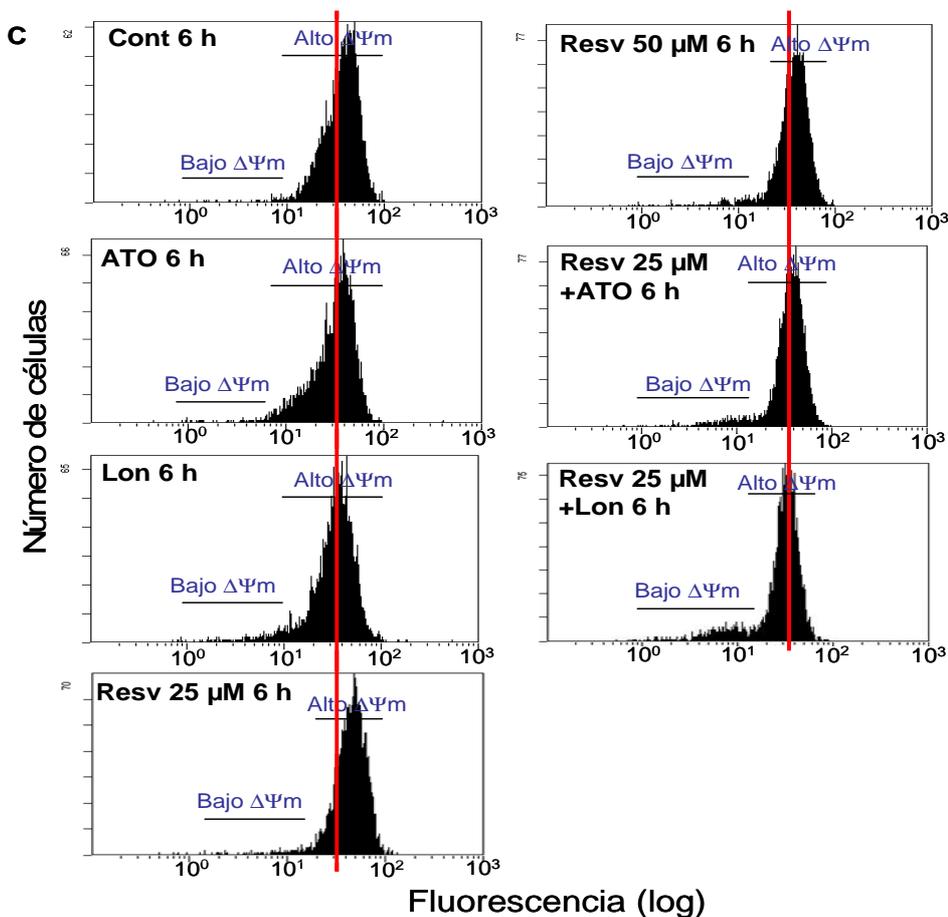


Figura 42. Disipación del potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) en células U-937 tratadas a los tiempos indicados con resveratrol (25 y 50 μM), ATO 2 μM , lonidamina 100 μM y el co-tratamiento de resveratrol a 25 μM con ATO y lonidamina. Las alteraciones en $\Delta\psi_m$ fueron determinadas por marcaje con DiI_{C1} (5) y citometría de flujo. En A) se representa el $\Delta\psi_m$ medio en relación con el control (Cont), al que se le da el valor arbitrario de 1. En B) se representa el porcentaje de células con bajo $\Delta\psi_m$. A) y B) son representativos de dos experimentos con resultados cualitativamente similares.



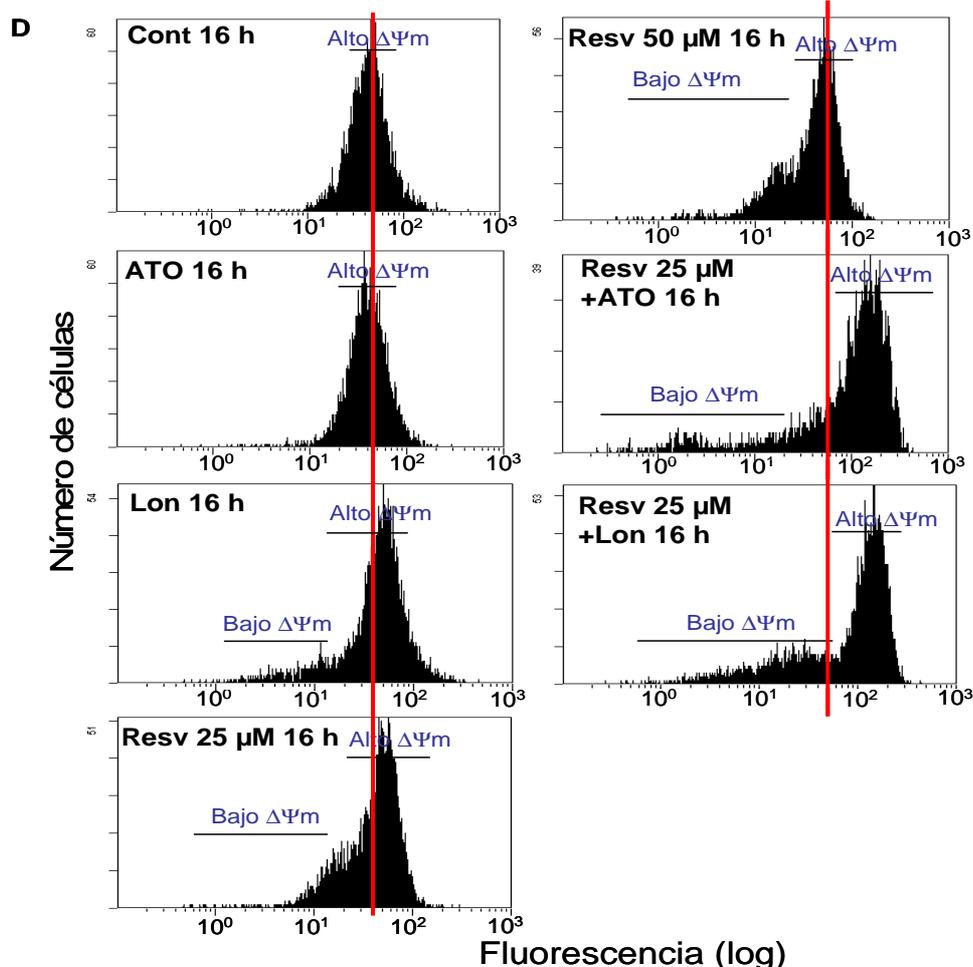


Figura 42. C) y D) muestran las gráficas obtenidas por citometría de flujo con los diferentes tratamientos a las 6 y 16 h. La línea roja vertical muestra el valor medio de fluorescencia en el control, para así identificar el desplazamiento producido por los tratamientos.

b) Rodamina 123

Cualitativamente los resultados de potencial de membrana se corroboraron usando la sonda rodamina 123 y análisis por citometría de flujo.

- Analizando la población total de células (Fig. 43A), observamos que ATO por sí solo y el resveratrol en combinación con ATO y lonidamina producen una despolarización de membrana a las 16 horas de tratamiento.

- Cuando analizamos la población de células con bajo potencial de membrana (Fig. 43B) observamos que el resveratrol, ATO y lonidamina apenas la modifican. Por su parte, el co-tratamiento de resveratrol con ATO y con lonidamina produce un incremento de la población de células con bajo potencial de membrana.

En la Fig. 43C y D se muestran las alteraciones en $\Delta\Psi_m$ por citometría de flujo. Aparecen dos sub-poblaciones celulares, a saber, una población con alto potencial de membrana y otra población con bajo potencial de membrana.

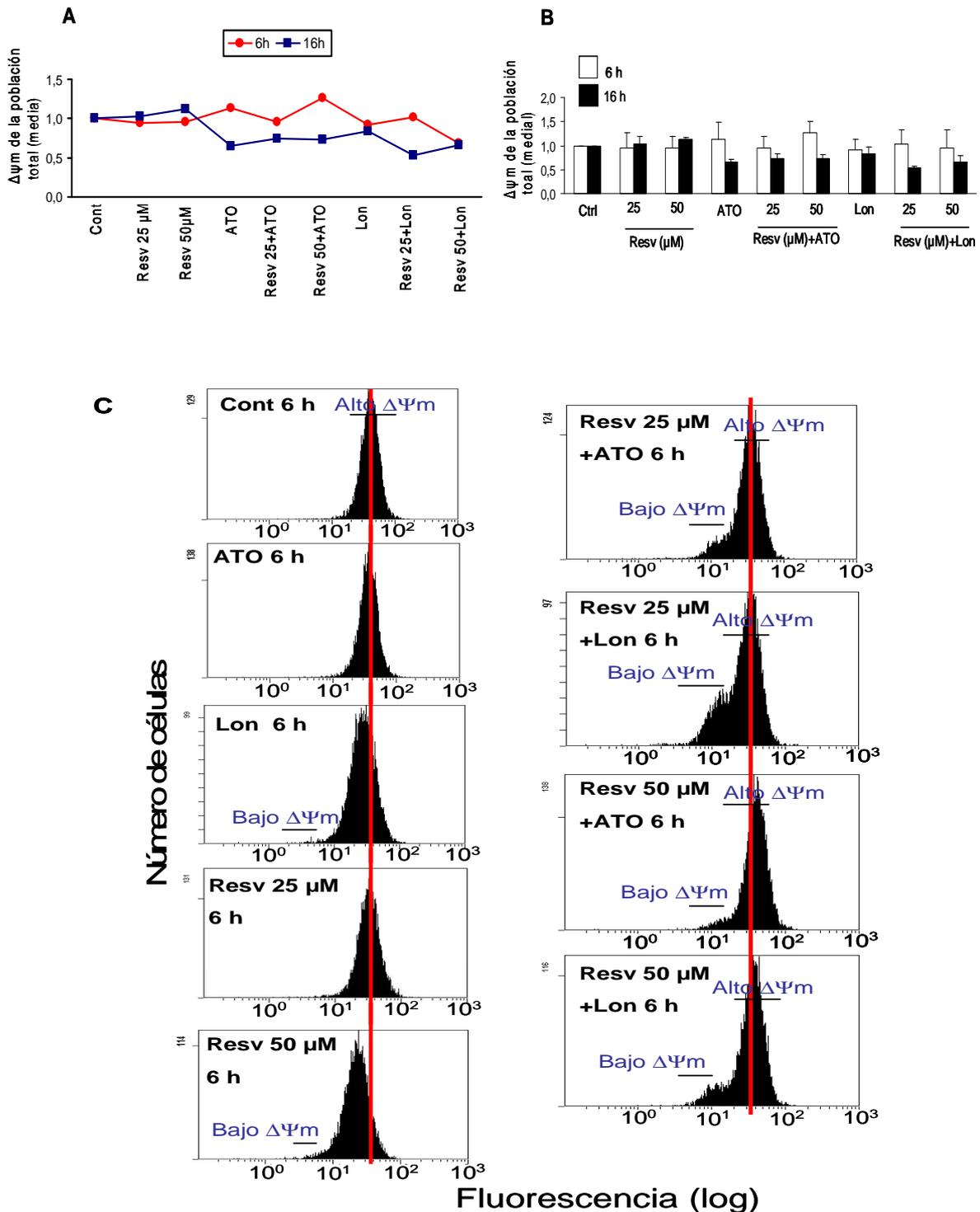


Figura 43. Disipación del potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) en células U-937 tratadas a los tiempos indicados con resveratrol (25 y 50 μM), ATO 2 μM , lonidamina 100 μM y el co-tratamiento de resveratrol a 25 μM con ATO y lonidamina. Las alteraciones en $\Delta\psi_m$ fueron determinadas por marcaje con rodamina 123 y citometría de flujo. En A) se representa el $\Delta\psi_m$ medio en relación con el control (Cont), al que se le da el valor arbitrario de 1. Los resultados son representativos de varios experimentos con resultados cualitativamente similares. En B) se representa el porcentaje de células con bajo $\Delta\psi_m$.

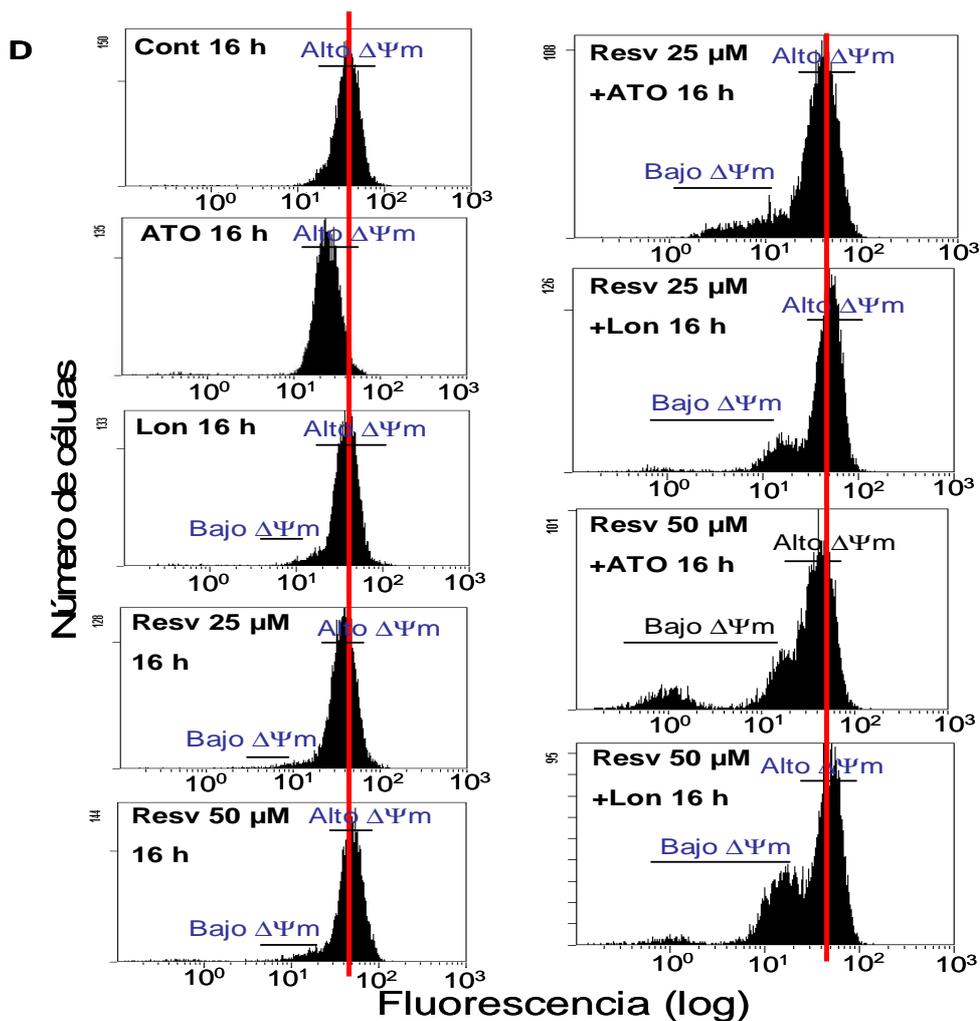


Figura 43. C) y D) muestran las gráficas con los diferentes tratamientos por citometría de flujo a las 6 y 16 h, respectivamente. La línea roja vertical muestra el valor medio de fluorescencia en el control, para así identificar el desplazamiento producido por los tratamientos.

Usando la sonda rodamina 123, el inhibidor de caspasas z-VAD reduce la población de células con bajo potencial de membrana de los co-tratamientos de resveratrol con ATO y con lonidamina a las 16 horas (Fig. 44). Por tanto, al igual que sucedía con curcumina, la aparición de esa población de células es un evento tardío, es decir, son las células que están ejecutando la apoptosis (véase Fig. 15).

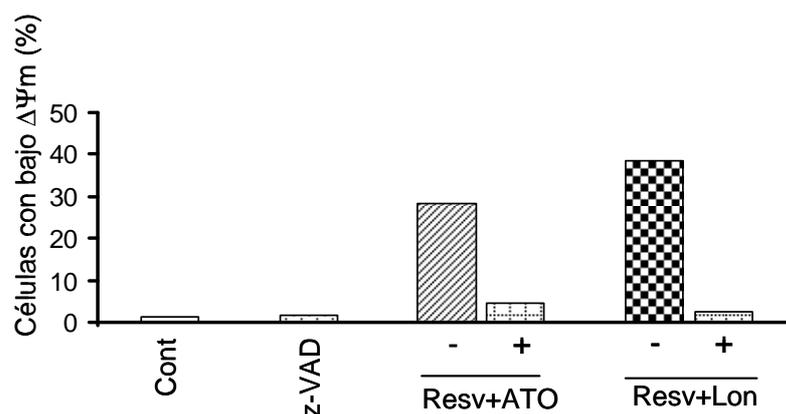


Figura 44. Efecto del inhibidor de caspasas z-VAD-fmk (z-VAD) sobre el potencial de membrana en células U-937. Se representa la frecuencia de células con bajo $\Delta\psi_m$ (A) una vez que se han tratado las células durante 16 h con un co-tratamiento de resveratrol con ATO/lonidamina, bien en ausencia (-) o en presencia de z-VAD (+). z-VAD se aplicó 2 h antes de los tratamientos. ATO se usó a una concentración de 2 μM , lonidamina a 100 μM , resveratrol a 50 μM y z-VAD a 50 μM .

3.- Estudios con calceína

Como método alternativo de medida directa de la permeabilización de la membrana interna mitocondrial (mIMP), se midió la captación de la sonda calceína-AM/ CoCl_2 con el resveratrol. La medida se realizó a tiempos cortos de 3 y 6 horas.

A estos tiempos, el resveratrol (usado a 25 y 50 μM) por sí solo y en combinación con ATO provoca una ligera disminución en el mIMP, pero no significativa (Fig. 45).

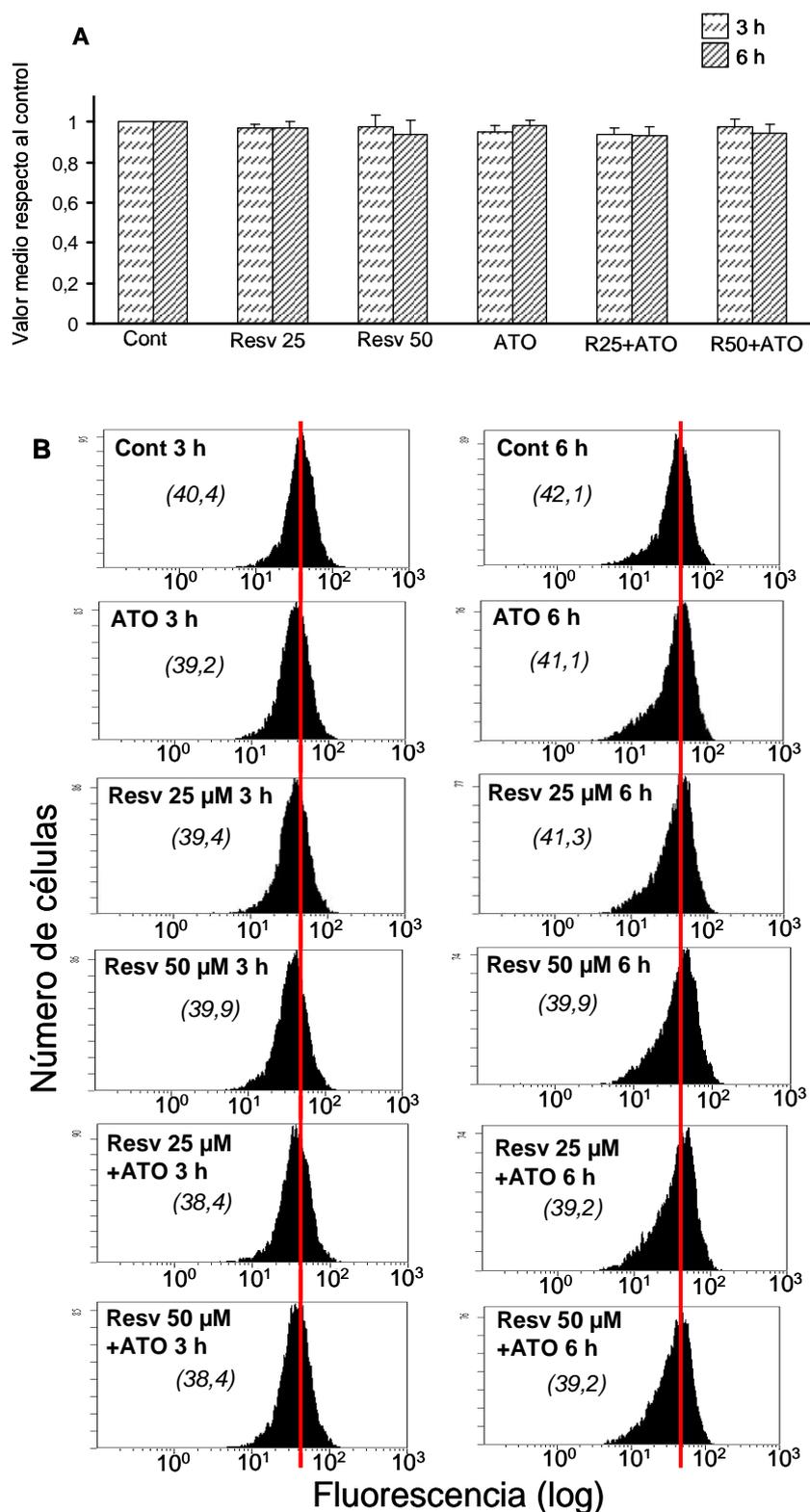


Figura 45. Análisis de permeabilización de la membrana interna mitocondrial usando la sonda calceína-AM/CoCl₂. Las células fueron tratadas con ATO 2 μ M, resveratrol (25 y 50 μ M), solos y en co-tratamiento, a 3 y 6 h. En A) se muestran los valores de los tratamientos respecto al control, al que se le da el valor arbitrario de 1. Los resultados muestran la media \pm SD de al menos 3 experimentos. B) muestra un ejemplo de la fluorescencia de los diferentes tratamientos. Los números entre paréntesis indican el valor de fluorescencia. La línea roja vertical muestra el valor medio de fluorescencia en el control, para identificar el posible desplazamiento producido por los tratamientos.

2.6.- ESTRÉS OXIDATIVO

A pesar de que los polifenoles han sido considerados durante muchos años como antioxidantes, publicaciones recientes muestran que pueden provocar estrés oxidativo, al menos en condiciones *in vitro*, lo cual puede ser importante para la apoptosis (Galati and O'Brien, 2004). Estudiamos si la curcumina y el resveratrol causan incremento en la producción de ROS y/o bajada en los niveles de GSH que pudiera explicar el aumento de la toxicidad de ATO y de lonidamina.

1.- Producción de ROS y efecto de antioxidantes

1.- En primer lugar, se realizaron experimentos para examinar la importancia del ambiente oxidante sobre la toxicidad de ATO y de lonidamina en células U-937. Para ello, las células fueron co-incubadas con ATO o lonidamina más una concentración baja de H₂O₂, un agente pro-oxidante paradigmático, o 2-metoxiestradiol (2-ME), el cual incrementa la acumulación intracelular de anión superóxido por inhibición de la actividad superóxido dismutasa (Huang et al., 2000).

H₂O₂, usada a concentraciones subcitotóxicas de 20 y 40 µM, potencia la acción apoptótica de ATO de manera más que aditiva, y de lonidamina, con menor intensidad (Fig. 46A).

2-ME se usó a tres concentraciones subcitotóxicas: 0,1, 0,25 y 0,5 µM. Existe cierta cooperatividad cuando se combina 2-ME a 0,5 µM con ATO. Cuando se realiza un co-tratamiento de 2-ME a 0,5 µM con lonidamina existe una cooperación para producir apoptosis de manera más que aditiva (Fig. 46B).

Por otro lado, como observamos en la Fig. 46C, los agentes pro-oxidantes 2-ME y H₂O₂ no afectan a la toxicidad del cisplatino (para el caso de 2-ME) o causan un efecto menos que aditivo (en el caso de H₂O₂), un resultado paralelo a la incapacidad de curcumina para potenciar la apoptosis provocada por cisplatino (ver Fig. 32).

Hay que señalar que existe variabilidad cuantitativa entre los resultados obtenidos con H₂O₂ y 2-ME en los estudios en combinación con ATO o lonidamina respecto a los análisis con CDDP porque se hicieron en momentos separados en el tiempo y con diferentes stocks.

En resumen, el incremento de ROS favorece la acción apoptótica de ATO y de lonidamina.

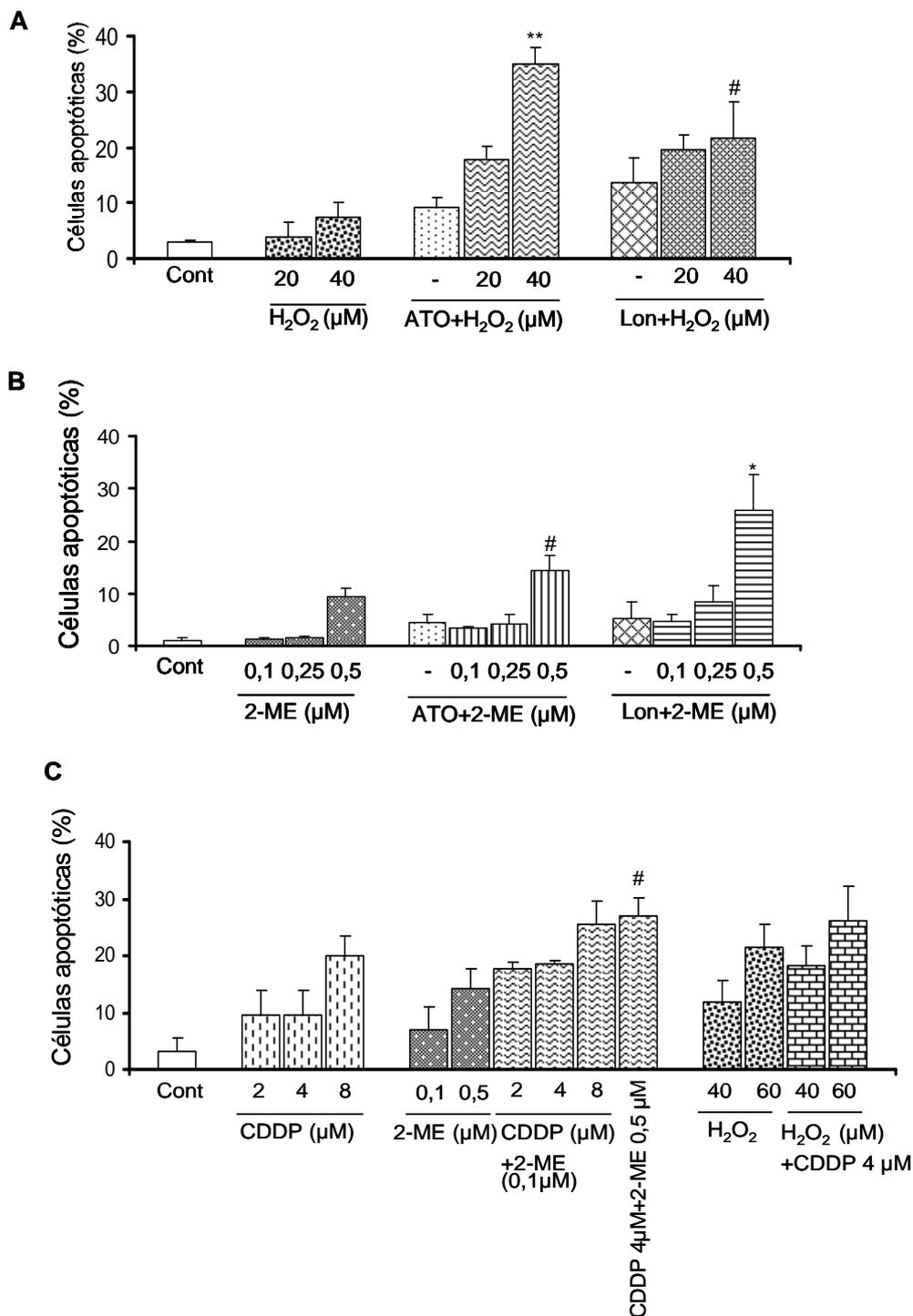


Figura 46. Inducción de apoptosis por H₂O₂, 2-ME, CDDP, ATO y lonidamina en células U-937. Se representa la frecuencia de células apoptóticas, tomando como criterio la fracción sub-G₁ medida por citometría de flujo, A) de H₂O₂, ATO y lonidamina y el co-tratamiento de H₂O₂ con ATO y con lonidamina, B) de 2-ME, ATO y lonidamina y el co-tratamiento de 2-ME con ATO y con lonidamina y C) de 2-ME, H₂O₂ y CDDP y el co-tratamiento de CDDP con 2-ME/ H₂O₂. Los resultados muestran la media±SD de al menos 3 experimentos. Los símbolos indican que los valores en los tratamientos combinados (ATO+H₂O₂, Lon+H₂O₂, ATO+2-ME, Lon+2-ME, CDDP+2-ME) son equivalentes (#) o significativamente más altos (asteriscos) que la suma de los valores en los correspondientes tratamientos simples. ATO se usó a 2 μM, lonidamina a 100 μM, H₂O₂ a 20, 40 y 60 μM, 2-ME a 0,1, 0,25 y 0,5 μM y CDDP a 2, 4 y 8 μM. Los tratamientos se aplicaron durante 24 h.

2.- En segundo lugar, se midió la producción de ROS por curcumina y por resveratrol usando sondas fluorescentes. La sonda H_2DCFDA es la sonda más comúnmente usada, pues tiene un amplio espectro para ROS. Previamente, se realizaron ensayos de autofluorescencia de algunos polifenoles, así como de ATO y lonidamina, a las longitudes de onda en que emite la sonda H_2DCFDA . En efecto, dada la estructura de los polifenoles cabría la posibilidad de que puedan presentar autofluorescencia en los rangos usuales de emisión y excitación del citómetro de flujo.

Por ello, se midió la autofluorescencia de ATO, lonidamina, curcumina, resveratrol, y por comparación quercetina, genisteína, EGCG y naringenina, y se comparó con el control a las 6 horas de tratamiento (Fig. 47). De todos los polifenoles utilizados, observamos que la quercetina y la curcumina producen autofluorescencia en FL1 a 525 nm (ya se había comentado anteriormente al analizar los experimentos con anexina V en el caso de curcumina).

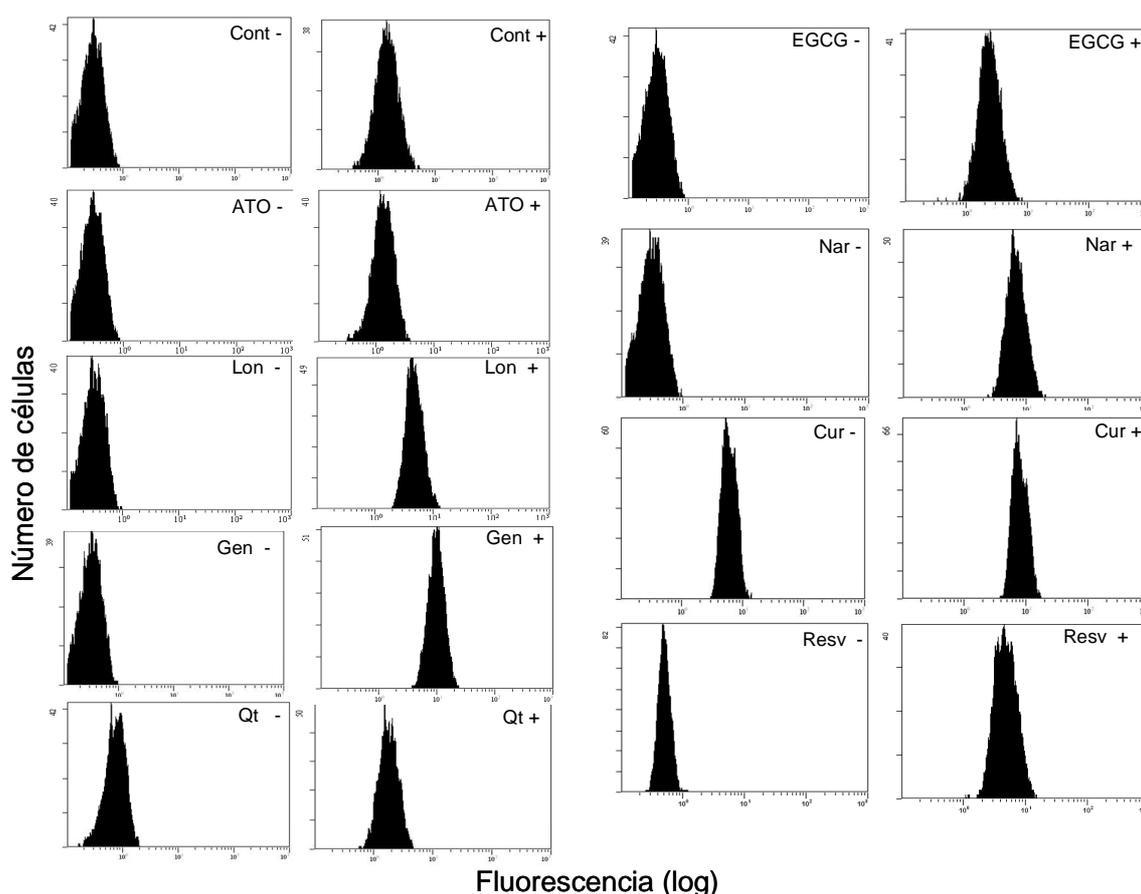


Figura 47. Se representa la autofluorescencia de ATO 2 μM , lonidamina (Lon) 100 μM , genisteína (Gen) 50 μM , quercetina (Qt) 10 μM , epigallocatequina-3-galato (EGCG) 50 μM , naringenina (Nar) 100 μM , curcumina (Cur) 7,5 μM y resveratrol (Resv) 25 μM usando la sonda H_2DCFDA y comparándolo con un control (Cont), en células U-937 tratadas durante 6 h. La autofluorescencia viene medida por el tratamiento sin sonda y + indica que se puso la sonda.

1.1.-Resultados de producción de ROS con curcumina

Dado que la curcumina produce autofluorescencia en FL1 y no podemos emplear H₂DCFDA, usamos la sonda DHE, sensible al anion superóxido (emite en FL3 a 630 nm). A esa longitud de onda la curcumina no produce autofluorescencia (resultado no mostrado).

Los ensayos de oxidación se realizaron a 3 y 6 horas, tiempo previo a la ejecución de la apoptosis. Como observamos en la Fig. 48, la curcumina (7,5, 15 y 30 μ M) produce un aumento significativo en los niveles de ROS de manera dosis-dependiente, a ambos tiempos de tratamiento.

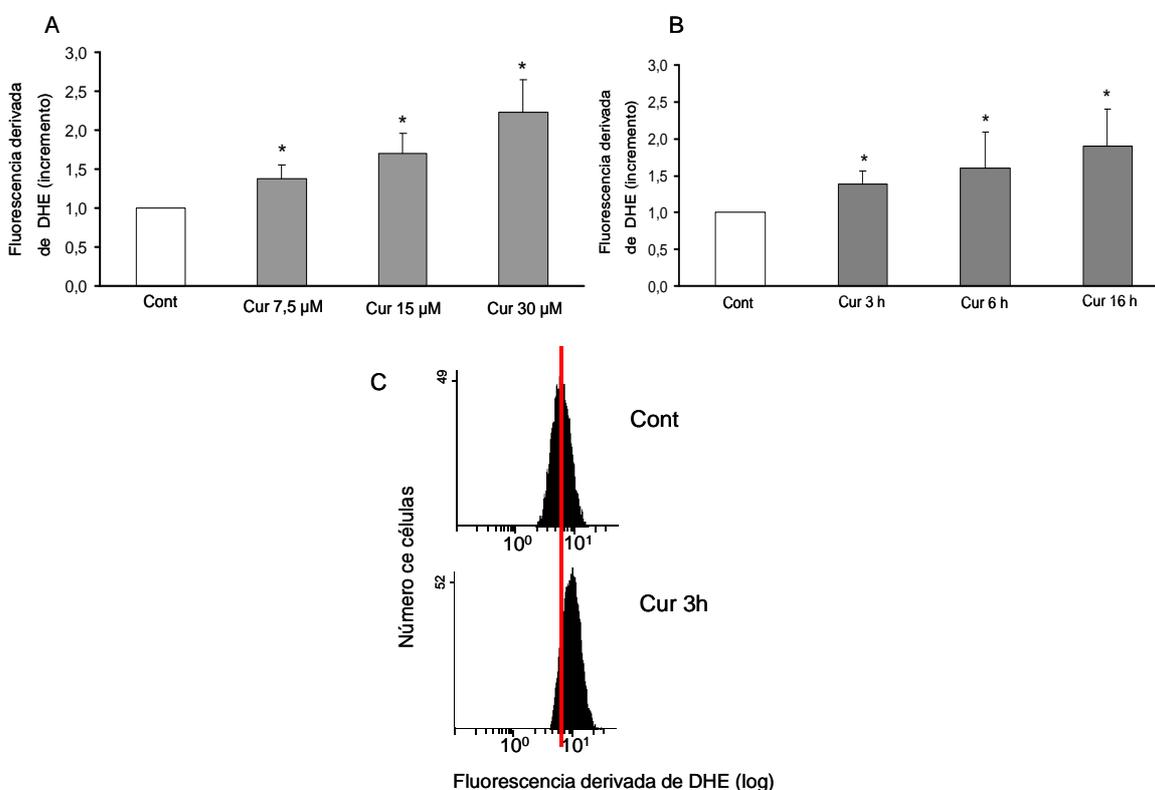


Figura 48. Se representa la acumulación intracelular de ROS producida por curcumina determinada por la fluorescencia derivada de DHE en células U-937. En A) se usó curcumina a diferentes concentraciones (7,5, 15 y 30 μ M), a las 3 h de tratamiento. En B) se representa el tratamiento con curcumina a 7,5 μ M a 3, 6 y 16 h. En A) y C) los resultados se representan en relación a un control de células no tratadas (valor 1). Los resultados muestran la media \pm SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos muestran que el valor es significativamente mayor que el control. En C) se muestra un ejemplo de la distribución celular de acuerdo a la fluorescencia de la sonda DHE de células no tratadas (Cont) y tratadas con curcumina 7,5 μ M. La línea vertical roja indica el valor medio en el control, con el fin de discernir mejor el desplazamiento producido por curcumina.

Para estudiar la importancia de la producción de ROS en la potenciación de la apoptosis provocada por curcumina, se realizaron experimentos con los antioxidantes NAC (10 mM), BHA (50 μ M), la máxima concentración que por sí sola no resultó ser tóxica según indicaron experimentos anteriores no mostrados, y Mn-TBAP (5 a 100 μ M). El NAC es un agente que contiene grupos tioles y posee una actividad eliminadora de ROS y reductora, y funciona como donador de cisteínas para la síntesis de GSH (Zafarullah et al., 2003). El BHA es un fenol sintético con actividad eliminadora de ROS de amplio espectro (Festjens et al., 2006). Por su parte, MnTBAP es un agente permeable mimético a superóxido dismutasa (Liu et al., 2013).

Como se observa en la Fig. 49, el NAC atenúa la toxicidad de curcumina cuando se usa a alta concentración (20 μ M), así como del co-tratamiento de curcumina usada a 7,5 μ M con ATO y de curcumina con lonidamina (50 y 100 μ M). BHA atenúa también la toxicidad del co-tratamiento de curcumina con ATO y con lonidamina (50 y 100 μ M).

Observamos que MnTBAP atenúa la generación de apoptosis por curcumina, cuando se usa a concentraciones tóxicas (15 y 20 μ M). Asimismo, el antioxidante atenúa la apoptosis causada por los co-tratamientos de curcumina con ATO (de manera dependiente de la dosis usada de MnTBAP) y con lonidamina (en este caso sólo cuando MnTBAP se usa a una concentración de 100 μ M).

Asimismo, como observamos en la Fig. 50, NAC atenúa la disipación del $\Delta\psi_m$ y la liberación de citocromo *c* en los co-tratamientos de curcumina con ATO y con lonidamina.

Por tanto, la apoptosis provocada por curcumina se media en parte por la producción de ROS.

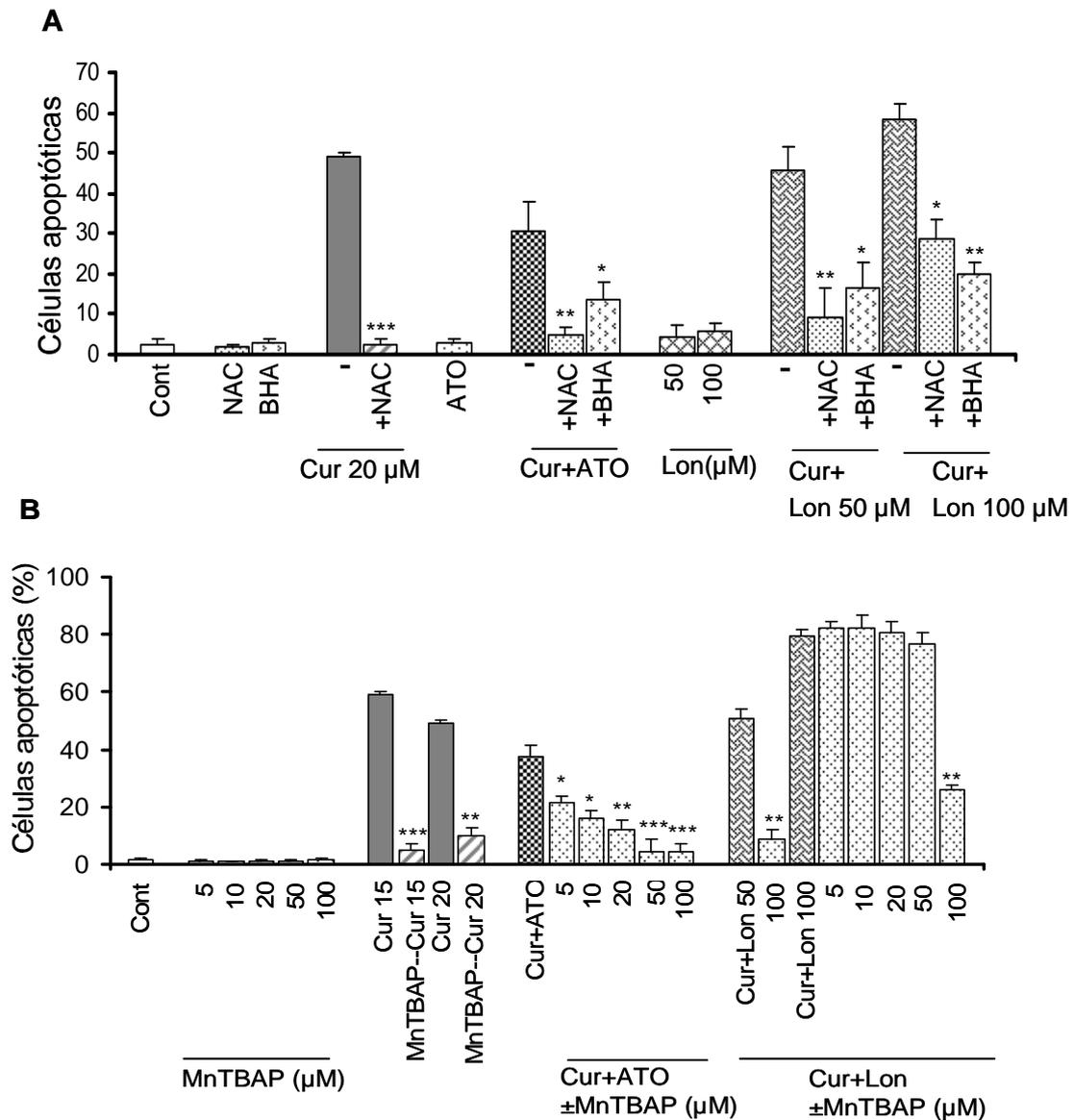


Figura 49. Efecto de antioxidantes sobre la apoptosis producida por curcumina usada a una alta concentración y sobre los co-tratamientos de curcumina con ATO o lonidamina. En A) se muestra el efecto de NAC y BHA. En B) se muestra el efecto de MnTBAP. En ambos casos se usó como criterio la fracción sub- G_1 medida por citometría de flujo. Los resultados muestran la media \pm SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos muestran que el valor del tratamiento con el antioxidante es significativamente más alto respecto al valor del tratamiento combinado o bien respecto a curcumina por sí sola. Los antioxidantes se aplicaron 2 h antes de los co-tratamientos. ATO se usó a 2 μ M, lonidamina a 50 y 100 μ M, curcumina a 7,5, 15 y 20 μ M (cuando no se indica concentración se refiere a que se usa a 7,5 μ M), NAC a 10 mM, BHA a 50 μ M y MnTBAP de 5 a 100 μ M.

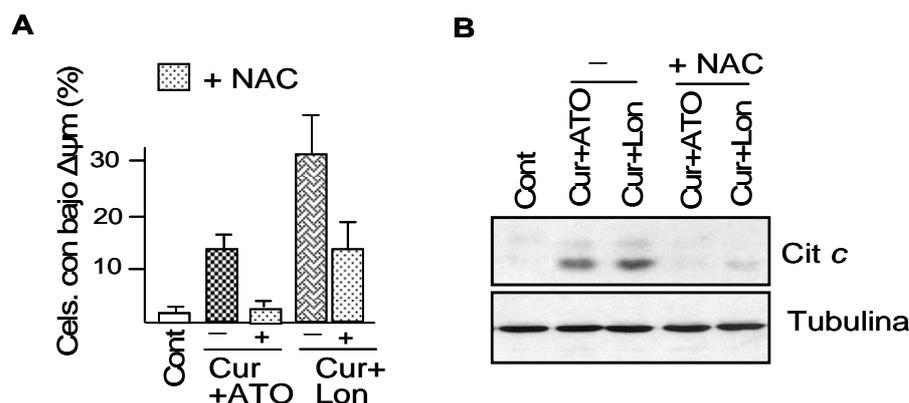


Figura 50. A) Se representa el porcentaje de células con bajo potencial de membrana. Los resultados muestran la media \pm SD de al menos 3 experimentos. B) muestra la liberación del citocromo *c* al citosol. Tubulina se usó como control de carga en el experimento de detección de citocromo *c*. ATO se usó a 2 μ M, lonidamina a 100 μ M, curcumina a 7,5 μ M y NAC a 10 mM. NAC se aplicó 2 h antes de los tratamientos mostrados.

1.2.- Resultados de producción de ROS con resveratrol

Dado que el resveratrol no produce autofluorescencia en FL1, se realizaron experimentos con la sonda H₂DCFDA. Como observamos en la Fig. 51A a las 3 horas el resveratrol a 25 μ M no modifica los niveles de ROS mientras que a 50 μ M disminuye ROS de forma significativa. A las 6 horas, el resveratrol a ninguna de las concentraciones modifica ROS.

Cuando usamos la sonda DHE, se observa que a las 3 horas el resveratrol no modifica los niveles de anión superóxido, mientras que a 6 horas los aumenta ligeramente pero de forma no significativa (Fig. 51B).

En la Fig. 51C observamos las variaciones en el desplazamiento producido por el resveratrol a la concentración de 50 μ M respecto al control en el ejemplo de 3 horas. Cuando usamos la sonda H₂DCFDA hay una caída en los niveles de fluorescencia, lo que indica que disminuye ROS. Sin embargo, con la sonda DHE no observamos modificación apreciable en los niveles de fluorescencia.

No se realizaron experimentos con antioxidantes puesto que el resveratrol no produce ROS de forma significativa.

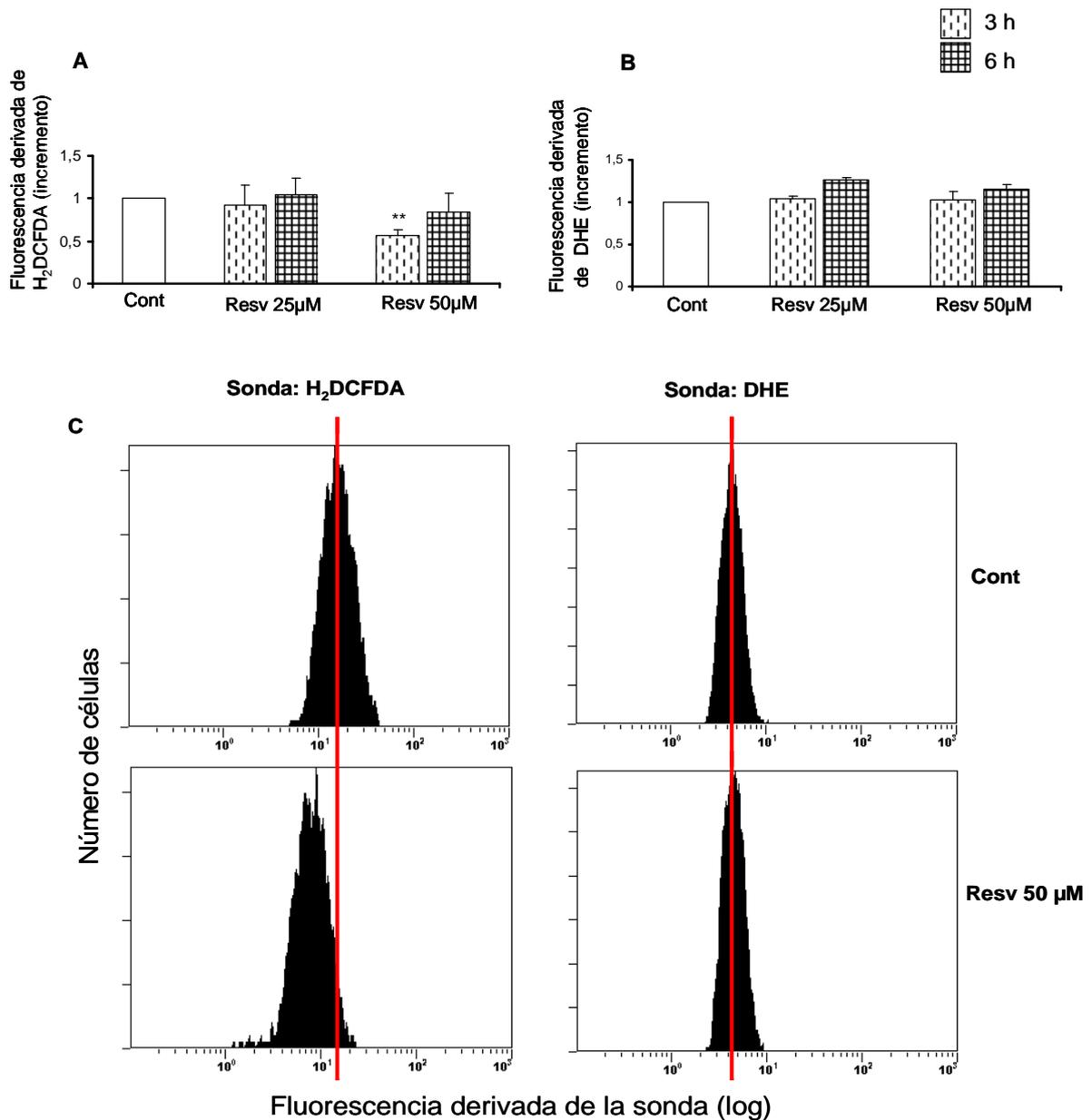


Figura 51. Acumulación intracelular de ROS producida por resveratrol (25 y 50 µM) a 3 y 6 h de tratamiento en células U-937, en A) determinada por la fluorescencia derivada de H₂DCFDA y en B) determinada por la fluorescencia derivada de DHE. Los resultados se representan en relación a células no tratadas (valor 1). Los resultados muestran la media±SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control. En C) se muestra un ejemplo de la distribución celular de acuerdo a la fluorescencia de las sondas de células no tratadas (Cont) y tratadas con resveratrol 50 µM a las 3 h. La línea vertical roja indica el valor medio en el control, con el fin de discernir mejor el desplazamiento producido por el resveratrol.

2.- Niveles de GSH intracelular y efecto de GSH-OEt.

En primer lugar, para examinar la posible importancia del GSH en la toxicidad de los agentes estudiados, se realizó un experimento con BSO, una molécula inhibidora de la enzima limitante de la biosíntesis de glutatión, la glutamilcisteína sintetasa, por lo que es un depletor de los niveles de GSH (Bailey, 1998). BSO se combinó con ATO y con lonidamina, así como con curcumina y resveratrol.

Como se observa en la Fig. 52, la toxicidad de ATO se incrementa muy significativamente en combinación con BSO, mientras que la toxicidad de lonidamina no se modifica cuando se combina con BSO. Por su parte, la curcumina es significativamente sensible a los niveles de GSH. BSO incrementa la toxicidad del resveratrol, cuando se usa a una concentración de 50 μM , aunque no de forma estadísticamente significativa.

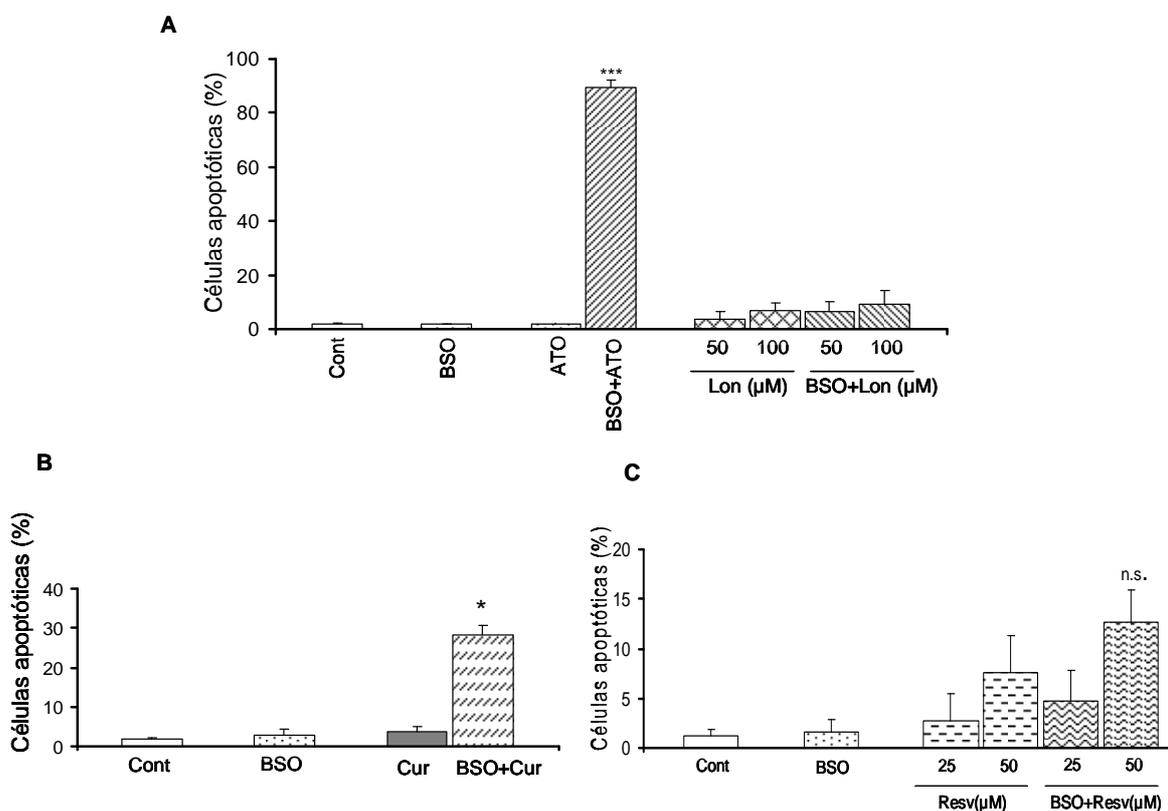


Figura 52. Efecto del BSO sobre la inducción de apoptosis por ATO, lonidamina, curcumina y resveratrol en células U-937 a las 24 h de tratamiento. Se representan las células apoptóticas, tomando como criterio la fragmentación de la cromatina, de A) BSO, ATO, lonidamina por sí solos y el co-tratamiento de BSO con ATO/lonidamina; B) BSO, curcumina y la combinación de ambos; y C) BSO, resveratrol y su co-tratamiento. Los resultados muestran la media \pm SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos muestran el valor de significación de los tratamientos combinados BSO+ATO y BSO+Cur respecto a la suma de los valores de los tratamientos individuales. n.s.: indica “no significativo”. ATO se usó a una concentración de 2 μM , lonidamina a 100 μM , BSO a 1 mM, curcumina a 7,5 μM y resveratrol a 25 y 50 μM .

Dada la importancia del GSH en la toxicidad de las drogas, medimos los niveles de GSH intracelular mediante la sonda monoclorobimane y fluorimetría. Como control interno del experimento usamos BSO.

2.1.- Resultados con curcumina

Se midieron los niveles de GSH a los tiempos de 16 y 24 horas.

Como observamos en la Fig. 53 la curcumina por sí sola y en combinación con ATO incrementa ligeramente pero no de forma significativa los niveles de GSH. ATO no modifica los niveles de GSH mientras que lonidamina por sí sola y en combinación con curcumina los disminuye.

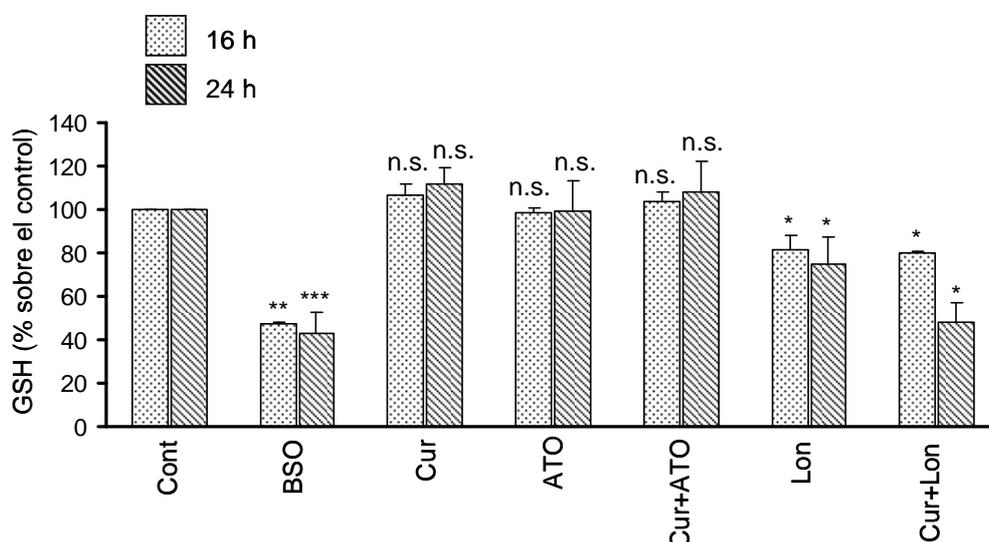


Figura 53. Niveles de GSH intracelular de curcumina y su combinación con ATO y lonidamina a las 16 y 24 h de tratamiento medidos por la sonda monoclorobimane y fluorimetría. BSO es el control interno del experimento. Los resultados se representan en relación al control (con un contenido en GSH intracelular de aproximadamente $9,5 \text{ nM}/10^6$ células), que recibe el valor arbitrario de 100. Se muestran los niveles de GSH de curcumina, ATO y lonidamina por sí solos así como del co-tratamiento de curcumina con ATO/lonidamina. Los resultados muestran la media \pm SD de al menos 3 experimentos. Estos valores fueron corregidos mediante la valoración del contenido de proteínas. Los asteriscos muestran el valor de significación. n.s.: indica "no significativo". ATO se usó a una concentración de $2 \mu\text{M}$, lonidamina a $100 \mu\text{M}$, curcumina a $7,5 \mu\text{M}$ y BSO a 1 mM .

De todo ello se deduce que el incremento en toxicidad de la combinación de curcumina con lonidamina se puede deber en parte a la bajada de GSH que produce lonidamina ya que la curcumina es sensible a la caída de los niveles de GSH.

Para corroborar la posible importancia de la modulación por GSH se hicieron experimentos usando GSH-OEt, forma permeable de GSH, el cual eleva los niveles de

GSH intracelular. Se observó que GSH-OEt atenúa la toxicidad de curcumina a dosis alta (20 μM) así como la de curcumina cuando se usa a una concentración de 7,5 μM en combinación con lonidamina (50 y 100 μM) (Fig. 54).

No se hicieron experimentos de GSH-OEt en combinación con ATO puesto que puede producirse interacción directa entre GSH-ATO (III) en solución (Scott et al., 1993).

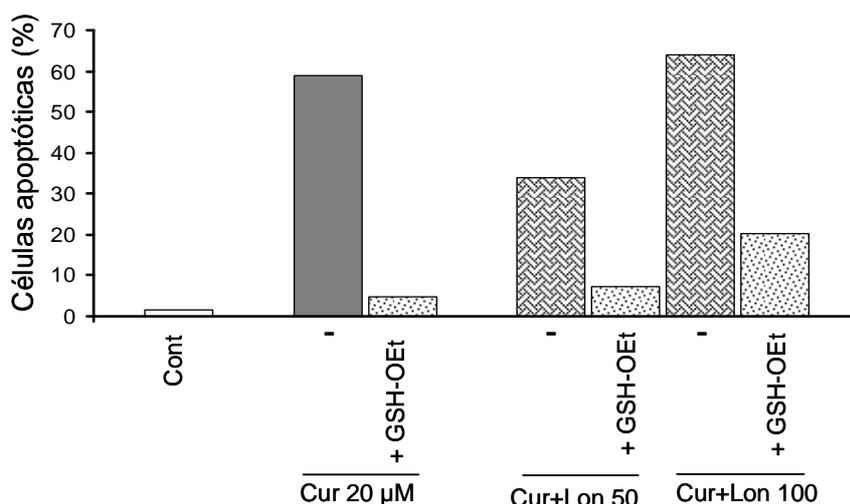


Figura 54. Efecto de GSH-OEt sobre la frecuencia de células apoptóticas producida por la curcumina por sí sola y sobre el co-tratamiento de curcumina con lonidamina. Se tomó como criterio la fracción sub- G_1 medida por citometría de flujo. Los resultados son representativos de dos experimentos con resultados cualitativamente similares. Los resultados se representan en relación al control (con un contenido en GSH intracelular de aproximadamente 9,5 nM/ 10^6 células). La lonidamina se usó a 50 y 100 μM , curcumina a 7,5 μM en la combinación con lonidamina y a 20 μM cuando se usa por sí solo, y GSH-OEt a 5 μM . GSH-OEt se aplicó 1 hora antes del tratamiento individual o combinados de curcumina.

2.2.- Resultados con resveratrol

Se midió la producción de GSH intracelular a las 24 horas de tratamiento. Como se observa en la Fig. 55, el resveratrol a 25 μM y en combinación con ATO no altera los niveles de GSH respecto al control. El resveratrol a 50 μM produce una ligera caída, aunque no estadísticamente significativa, de los niveles de GSH, mientras que en combinación con ATO produce una caída significativa de los mismos.

La conocida dependencia inversa de la toxicidad del ATO respecto al contenido celular en GSH permite concluir que la potenciación de la toxicidad del ATO por resveratrol puede deberse, al menos en parte, a la depleción parcial de GSH.

Por las razones explicadas anteriormente, no se puede usar GSH-OEt para corroborar el valor funcional de estas alteraciones en la combinación de resveratrol con ATO.

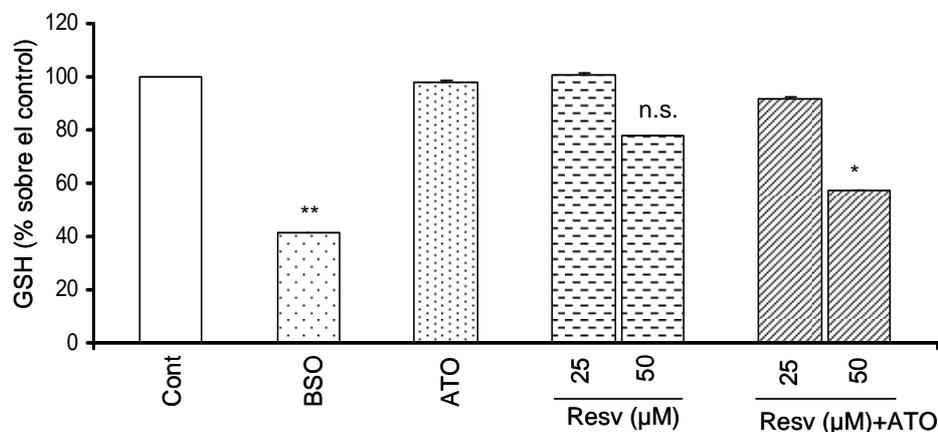


Figura 55. Se muestran los niveles de GSH de resveratrol y su combinación con ATO a las 24 h de tratamiento medidos por la sonda monoclorobimane y fluorimetría. BSO es el control interno del experimento. Los resultados se representan en relación al control (con un contenido en GSH intracelular de aproximadamente 9,5 nM/10⁶ células), que recibe el valor arbitrario de 100. Los resultados muestran la media±SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos indican en el caso de resveratrol a 50 μM que la disminución de GSH es estadísticamente significativa en relación al control; en el caso del co-tratamiento de resveratrol 50 μM con ATO se compara con respecto a los tratamientos individuales. n.s.: indica “no significativo”. ATO se usó a una concentración de 2 μM, BSO a 1 mM y resveratrol a 25 y 50 μM.

3.- Estudios complementarios de oxidación con flavonoides

Dada la potencial importancia del estrés oxidativo como causa de toxicidad, decidimos realizar algunos estudios complementarios con algunos de los flavonoides estudiados inicialmente, a saber, genisteína, quercetina y naringenina.

Con la quercetina no se pudo medir ROS con la sonda H₂DCFDA puesto que emite autofluorescencia en FL1 (ver Fig. 47). Observamos que genisteína y naringenina, solas y en combinación con ATO, producen sobreacumulación de ROS a partir de las 3 horas (Fig. 56) mientras que la quercetina no altera los niveles de ROS. Además, en experimentos con los antioxidantes NAC y BHA observamos que reducen la toxicidad de los co-tratamientos de genisteína y naringenina en combinación con ATO (resultados no mostrados). Por tanto, podemos concluir que la genisteína y la naringenina potencian la apoptosis del ATO debido, al menos en parte, al incremento en ROS.

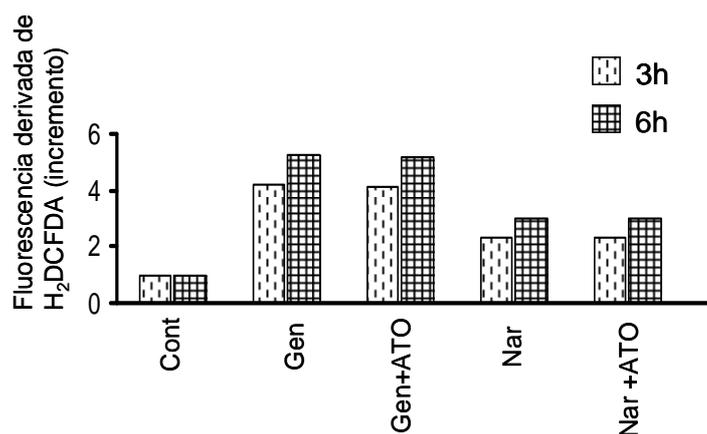


Figura 56. Acumulación intracelular de ROS determinada por la fluorescencia derivada de H₂DCFDA producida por genisteína (Gen) 50 μ M y naringenina (Nar) 100 μ M por sí solos y en combinación con ATO 2 μ M células U-937 tratadas durante 3 y 6 h. Se usó la sonda H₂DCFDA y se comparó con un control, al que se le da el valor relativo de 1. Los resultados son representativos de 2 experimentos con resultados cualitativamente similares.

Dado que con la quercetina no medimos los niveles de ROS, decidimos analizar su capacidad para afectar los niveles de GSH. Como observamos en la Fig. 57, la quercetina por sí sola o en combinación con ATO o lonidamina disminuye significativamente los niveles de GSH. Por su parte, la genisteína, usada a modo de comparación, no produce cambios en los niveles de GSH.

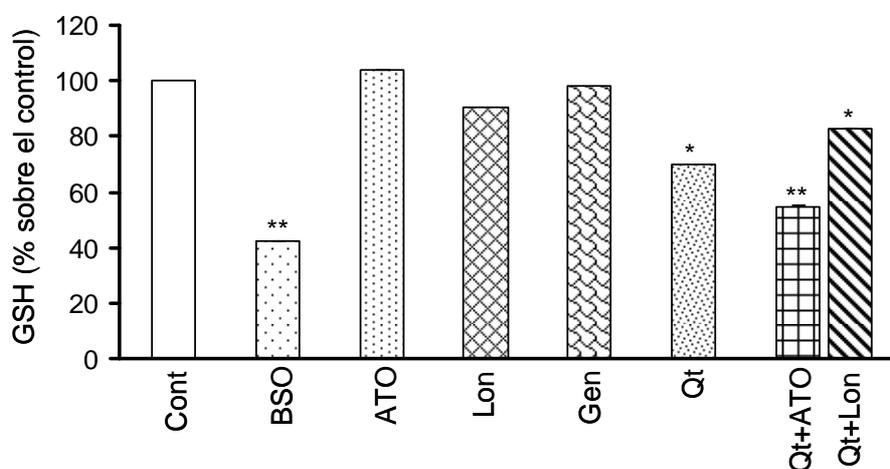


Figura 57. Se muestran los niveles de GSH de ATO 2 μ M, lonidamina (Lon) 100 μ M, quercetina (Qt) 10 μ M y naringenina (Nar), solos o en combinación en células U-937 a las 24 h de tratamiento. Se usó la sonda monoclorobimane y fluorimetría. BSO (50 mM) es el control interno del experimento. Los resultados se representan en relación al control (con un contenido en GSH intracelular de aproximadamente 9,5 nM/10⁶ células), que recibe el valor arbitrario de 100. Los resultados muestran la media \pm SD de al menos 3 experimentos.

Esto corrobora la conclusión de que la generación de estrés oxidativo por polifenoles, sea medido por sobreproducción de ROS o disminución de GSH, puede ser un determinante de su capacidad quimiosensibilizadora.

2.7.- MODULACIÓN DE PROTEÍNAS QUINASAS Y EFECTOS DE SUS INHIBIDORES

Como se explicó, el estrés oxidativo es capaz de modular proteínas quinasas tales como las MAPKs p38, JNK y Akt. La modulación puede ser inducible o represible por ROS. Algunas de estas quinasas pueden verse afectadas por agentes fenólicos.

A) Efectos de curcumina

Se realizaron los experimentos a diferentes tiempos (8, 12, 14 y 24 horas) en células U-937 tratadas con curcumina, sola y en combinación con ATO y lonidamina. Se midió la fosforilación/activación de las quinasas JNK, p38, ERK y Akt. Se observó:

1.- Los tratamientos de curcumina por sí sola y en combinación con ATO afectan muy escasamente a la fosforilación de p38-MAPK y JNK (Fig. 58).

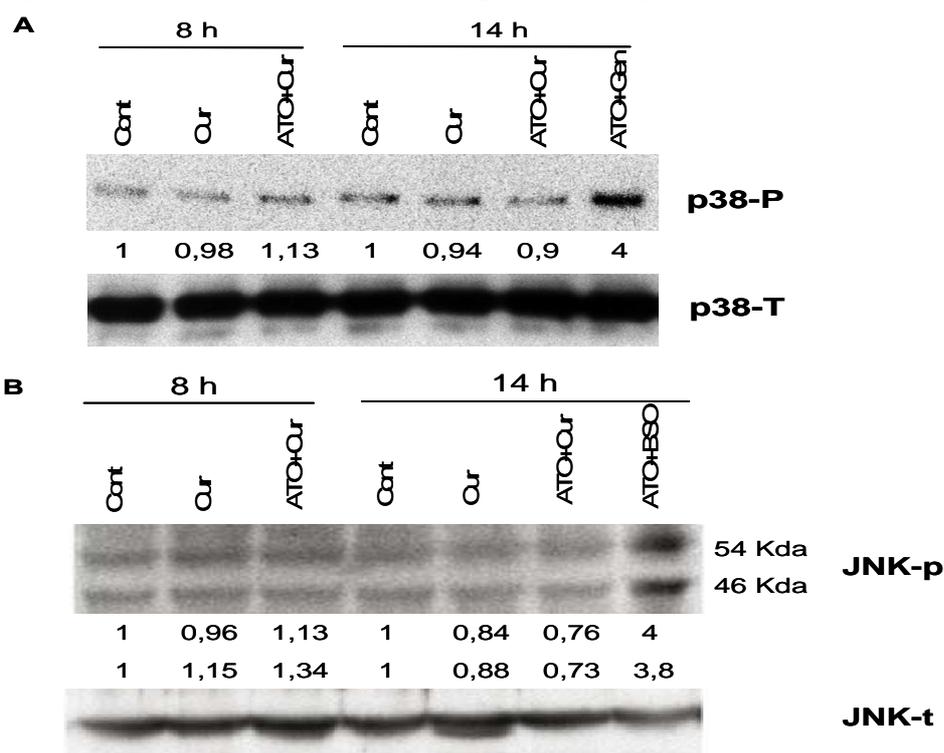


Figura 58. Modulación de p38-MAPK y JNK por curcumina. La figura muestra los niveles relativos de la forma total (T) y fosforilada (P) de p38-MAPK y JNK en células U-937 sin tratar (Cont) y células tratadas durante los períodos de tiempo indicados con curcumina (Cur) y ATO con curcumina (ATO+Cur), determinado por ensayos de inmunoblot. Como control positivo se realizaron tratamientos durante 14 h con ATO más genisteína (Gen) en el caso de p38-MAPK, y de ATO con BSO en el caso de JNK. La curcumina se usó a 7,5 μ M, ATO a 2 μ M, genisteína a 50 μ M y BSO a 1 mM. Los números debajo de cada *blot* indican la intensidad de las bandas en relación al correspondiente control (que recibe el valor arbitrario de 1) determinado por densitometría. En el caso de JNK se analizó cada banda por separado.

2.- La curcumina, sola o en el co-tratamiento con ATO, estimula fuertemente la fosforilación/activación de ERK a las 12-24 horas. Esta respuesta fue también observada a las 24 horas usando lonidamina en combinación con curcumina (Fig. 59).

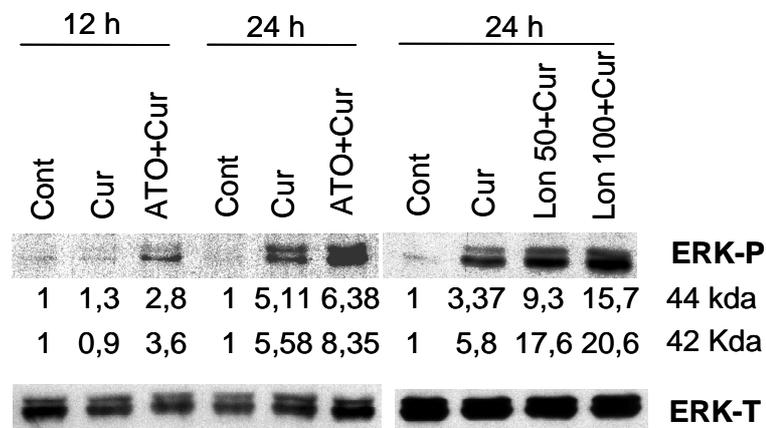


Figura 59. Modulación de ERK por curcumina. Se muestran los niveles relativos de la forma fosforilada (P) y de la forma total (T) de ERK en células U-937 sin tratar (Cont) y células tratadas durante los períodos de tiempo indicados con curcumina (Cur), ATO con curcumina (ATO+Cur) y lonidamina con curcumina (Lon+Cur) determinado por ensayos de inmunoblot. La curcumina se usó a 7,5 μ M, ATO a 2 μ M y lonidamina a 50 y 100 μ M. Los números debajo de cada *blot* indican la intensidad de las bandas en relación al correspondiente control (que recibe el valor arbitrario de 1) determinado por densitometría. Se analizó cada banda por separado.

3.- La curcumina, sola o en combinación con ATO, causa una disminución ligera en la fosforilación de Akt a las 12-24 horas. Se observó también de manera acusada a las 24 horas en la combinación de curcumina con lonidamina (Fig. 60).

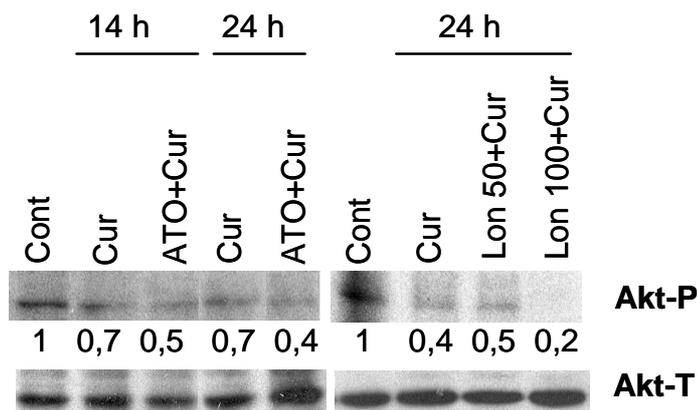


Figura 60. Modulación de Akt por curcumina. Se muestran los niveles relativos de la forma fosforilada (P) y de la forma total (T) de Akt en células U-937 sin tratar (Cont) y células tratadas durante los períodos de tiempo indicados con curcumina (Cur), ATO con curcumina (ATO+Cur), y lonidamina con curcumina (Lon+Cur) determinado por ensayos de inmunoblot. La curcumina se usó a 7,5 μ M, ATO a 2 μ M y lonidamina a 50 y 100 μ M. Los números debajo del *blot* indican la intensidad de las bandas en relación al control (que recibe el valor arbitrario de 1) determinado por densitometría.

Para estudiar el significado funcional de la activación de ERK y la bajada de Akt se hicieron experimentos con inhibidores farmacológicos contra esas quinasas. Las concentraciones utilizadas de los inhibidores fueron seleccionadas a partir de trabajos anteriores del laboratorio, tomando como criterio su eficacia inhibidora y su escasa toxicidad (Fernandez et al., 2004).

Los inhibidores de MEK/ERK usados fueron PD98059 (20 μ M) o U0126 (2,5 μ M), los cuales bien no modifican (en el co-tratamiento de lonidamina con curcumina) o incluso aumentan (en el co-tratamiento de ATO con curcumina) la generación de apoptosis, como se reveló mediante fragmentación/condensación de la cromatina (Fig. 61A) y por distribución del ciclo celular (Fig. 61B). Por tanto, la activación de ERK no explica la potenciación de la apoptosis de los tratamientos combinados en nuestros estudios. Por el contrario, ERK podría actuar impidiendo el exceso de toxicidad en los tratamientos combinados, en el caso de curcumina con ATO.

Por su parte, el co-tratamiento con el inhibidor de PI3K LY294002 (30 μ M), el cual disminuye la fosforilación de Akt en células U-937 (Ramos et al., 2005), potencia la inducción de apoptosis por ATO solo, pero apenas por lonidamina sola. Además, el co-tratamiento con LY294002 aumenta la toxicidad de la curcumina sola, y como consecuencia también la toxicidad de curcumina en combinación con ATO o con lonidamina (Fig. 62). En conclusión, la inhibición de Akt por curcumina puede explicar en parte el incremento de apoptosis tanto cuando se combina LY con ATO como cuando se combina con curcumina.

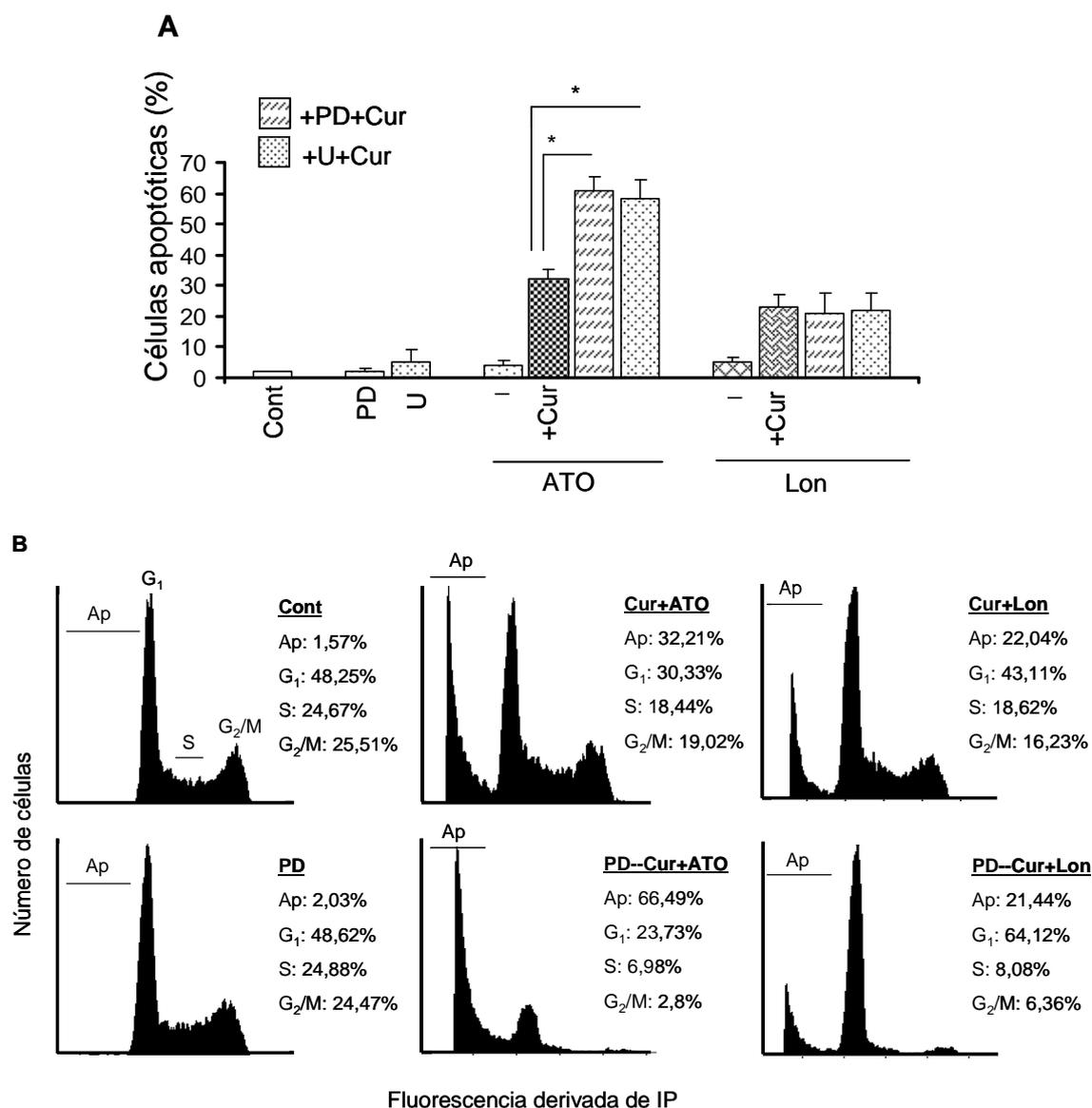


Figura 61. Efecto de los inhibidores de MEK/ERK PD98059 o U0126. A) representa la frecuencia de células apoptóticas a las 24 h de tratamiento con ATO o lonidamina (-), con el co-tratamiento de ATO o lonidamina con curcumina (+Cur) y tras el tratamiento de curcumina con ATO/lonidamina en presencia de los inhibidores de MEK/ERK. Los resultados muestran la media±SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos indicados. B) muestra un ejemplo de la distribución del ciclo celular y la frecuencia de células apoptóticas (sub-G₁) tras el tratamiento con los agentes indicados y el inhibidor PD98059. Se indica el porcentaje de células que hay en cada fase del ciclo. La curcumina se usó a 7,5 µM, ATO a 2 µM, lonidamina a 50 µM, PD98049 a 30 µM y U0126 a 2,5µM.

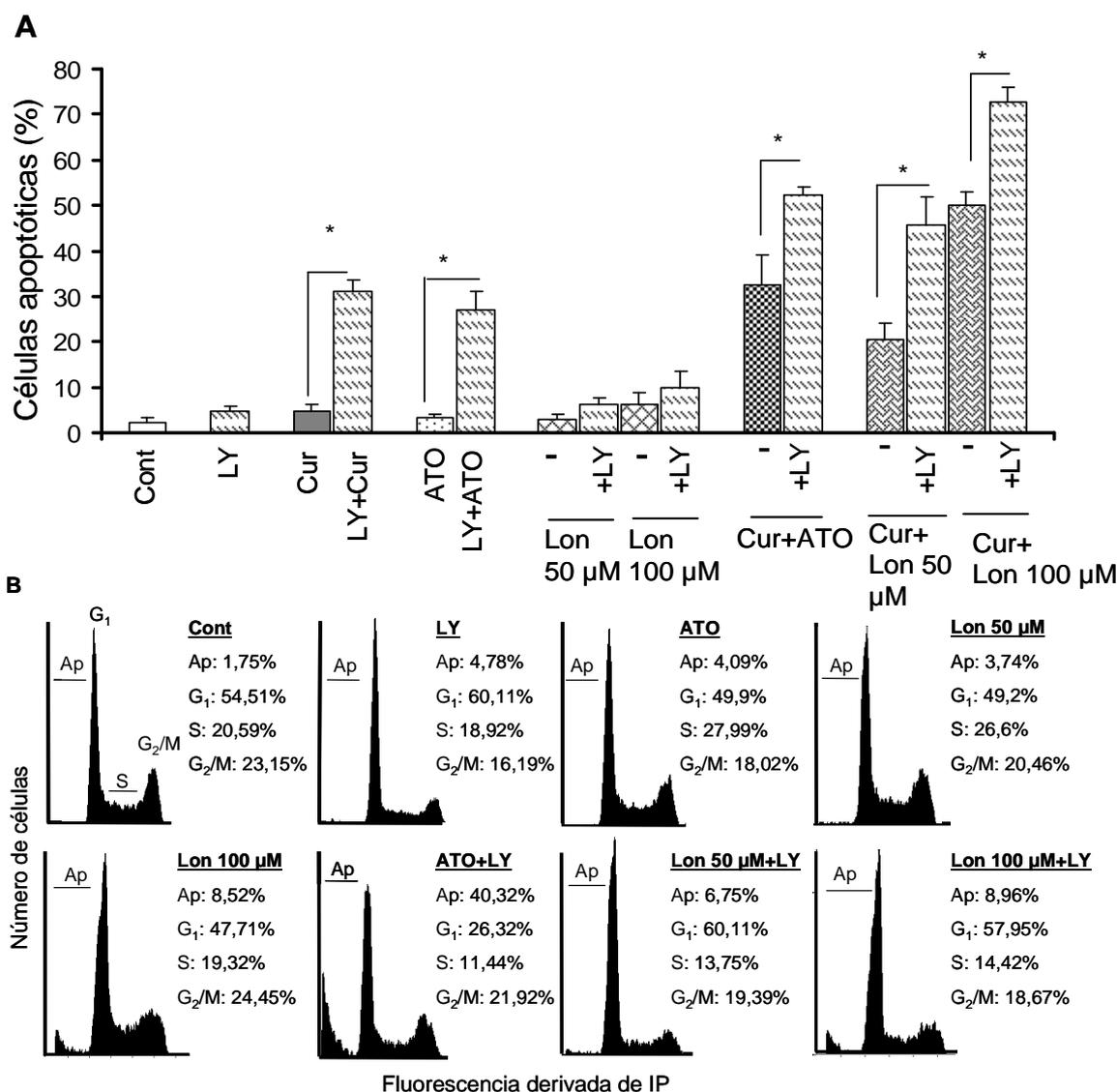


Figura 62. Efecto del inhibidor de PI3K LY294002 (LY). A) Se representa la frecuencia de células apoptóticas a las 24 h de LY, ATO, lonidamina y curcumina por sí solos así como la combinación de LY con los agentes y sobre el co-tratamiento de curcumina con ATO y con lonidamina. Los resultados muestran la media \pm SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos señalados. B) muestra un ejemplo de la distribución del ciclo celular y la frecuencia de células apoptóticas (sub-G₁) tras el tratamiento con algunos de los agentes. Se indica el porcentaje de células que hay en cada fase del ciclo. La curcumina se usó a 7,5 μ M, ATO a 2 μ M, lonidamina a 50 y 100 μ M y LY a 30 μ M.

B) Efectos del resveratrol

Con el resveratrol se analizaron las quinasas JNK, ERK, p38 y Akt a las 16 horas de tratamiento. Con JNK, el resveratrol se usó a 25 y 50 μ M y con el resto de proteínas, se usó a la concentración de 50 μ M. Se realizaron co-tratamientos de resveratrol con ATO y con lonidamina.

1.- El resveratrol por sí solo incrementa la fosforilación y por tanto la activación de la proteína p38, pero en combinación con ATO y lonidamina no altera su expresión (Fig. 63).

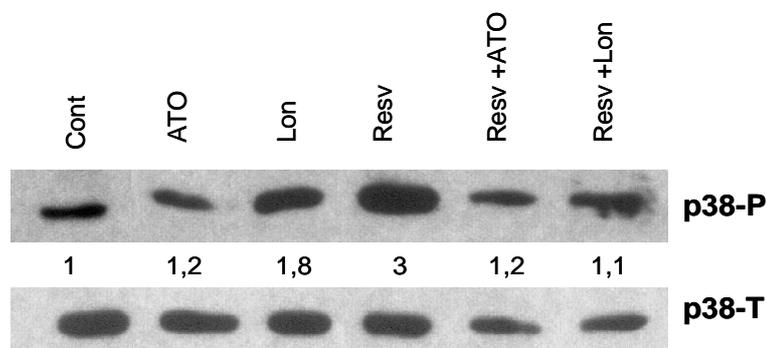


Figura 63. Modulación de p38 por resveratrol. Se muestran los niveles relativos de la forma fosforilada (P) y de la forma total (T) de p38 en células U-937 sin tratar (Cont) y células tratadas durante 16 h con resveratrol (Resv) y resveratrol con ATO (Resv+ATO) y con lonidamina (Resv+Lon), determinado por ensayos de inmunoblot. Los números debajo del *blot* indican la intensidad de las bandas en relación al control (que recibe el valor arbitrario de 1), determinado por densitometría. El resveratrol se usó a 50 μ M, ATO a 2 μ M y lonidamina a 100 μ M.

2.- El resveratrol por sí solo y en el co-tratamiento con lonidamina incrementa ligeramente la activación de la proteína ERK (Fig. 64).

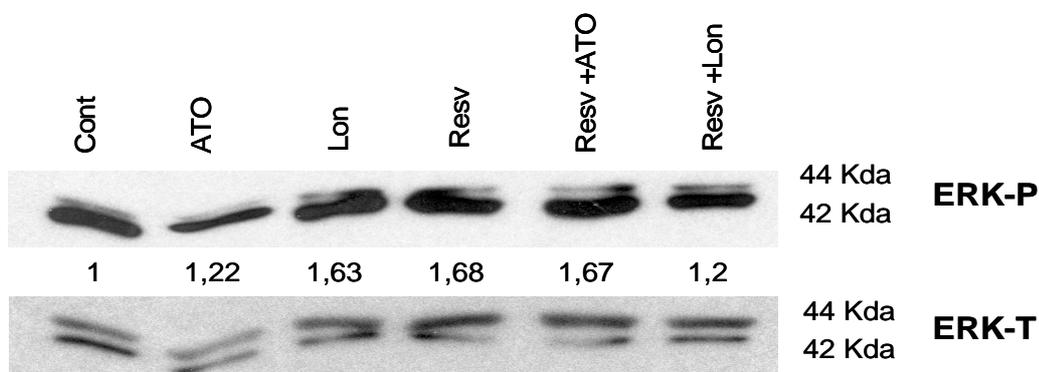


Figura 64. Modulación de ERK por resveratrol. Se muestran los niveles relativos de la forma fosforilada (P) y de la forma total (T) de ERK en células U-937 sin tratar (Cont) y células tratadas durante 16 h con resveratrol (Resv) y resveratrol con ATO (Resv+ATO) y con lonidamina (Resv+Lon), determinado por ensayos de inmunoblot. El resveratrol se usó a 25 y 50 μ M, ATO a 2 μ M y lonidamina a 100 μ M. Los números debajo del *blot* indican la intensidad de las bandas en relación al control (que recibe el valor arbitrario de 1) determinado por densitometría. Ante la imposibilidad de analizar cada banda por separado debido a su cercanía, se analizaron en conjunto.

3.- El resveratrol apenas modifica la activación de JNK mientras que los co-tratamientos de resveratrol con ATO y con lonidamina la disminuyen (Fig. 65).

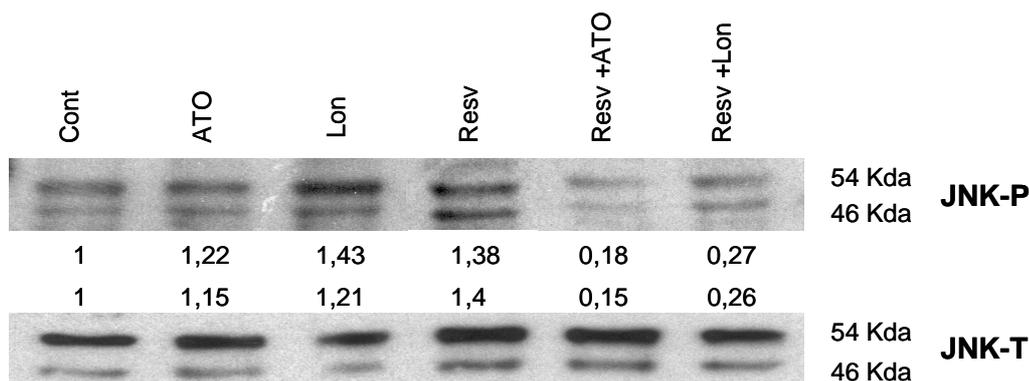


Figura 65. Modulación de JNK por resveratrol. Se muestran los niveles relativos de la forma fosforilada (P) y de la forma total (T) de JNK en células U-937 sin tratar (Cont) y células tratadas durante 16 h con resveratrol (Resv), resveratrol con ATO (Resv+ATO) y con lonidamina (Resv+Lon), determinado por ensayos de inmunoblot. El resveratrol se usó a 50 μ M, ATO a 2 μ M y lonidamina a 100 μ M. Los números debajo del *blot* indican la intensidad de cada una de las bandas en relación al control (que recibe el valor arbitrario de 1), determinado por densitometría.

4.- Se observó que el co-tratamiento de resveratrol con lonidamina aumenta la fosforilación de la proteína Akt mientras que los demás tratamientos apenas la afectan (Fig. 66).

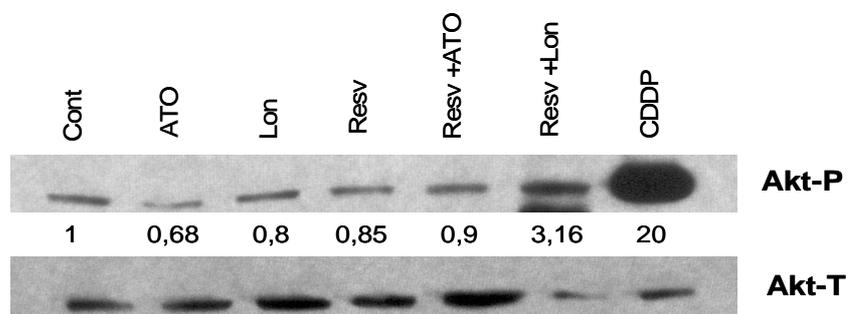


Figura 66. Modulación de Akt por resveratrol. Se muestran los niveles relativos de la forma fosforilada (P) y de la forma total (T) de Akt en células U-937 sin tratar (Cont) y células tratadas durante 16 h con resveratrol (Resv) y resveratrol con ATO (Resv+ATO) y con lonidamina (Resv+Lon), determinado por ensayos de inmunoblot. El resveratrol se usó a 50 μ M, ATO a 2 μ M, lonidamina a 100 μ M. El cisplatino (CDDP), usado a 4 μ M, se usó como control positivo. Los números debajo del *blot* indican la intensidad de las bandas en relación al control (que recibe el valor arbitrario de 1).

En resumen, el resveratrol no modifica o incrementa ligeramente la fosforilación de ERK y ocasionalmente de Akt. Para estudiar el significado funcional de estas modificaciones, se hicieron experimentos con inhibidores farmacológicos contra esas quinasas.

LY294002, inhibidor de PI3K/Akt, no disminuye sino que aumenta significativamente la apoptosis en el co-tratamiento de resveratrol con ATO y no modifica el efecto de la combinación de resveratrol con lonidamina (en la que vimos que la expresión de Akt se incrementaba) (Fig. 67A). Por tanto, la activación de Akt no explica el incremento en la toxicidad de los co-tratamientos con resveratrol.

Asimismo, hicimos experimentos con los inhibidores de ERK PD98059 (PD) y U0126 (U). Observamos que PD y U aumentan (y en el caso de PD significativamente) la toxicidad de los co-tratamientos (Fig. 67B). Por tanto, la activación de ERK no explica el incremento en la toxicidad de las combinaciones. Más bien, la activación de ERK podría ejercer cierta función protectora, impidiendo el exceso de toxicidad.

En resumen, los resultados obtenidos mediante el uso de inhibidores farmacológicos frente a ERK y Akt nos indican que la activación de estas proteínas en los tratamientos ensayados no explicaría la potenciación de la toxicidad en los tratamientos combinados. Más bien, dado el carácter defensivo de estas quinasas, su activación podría actuar atenuando el exceso de toxicidad.

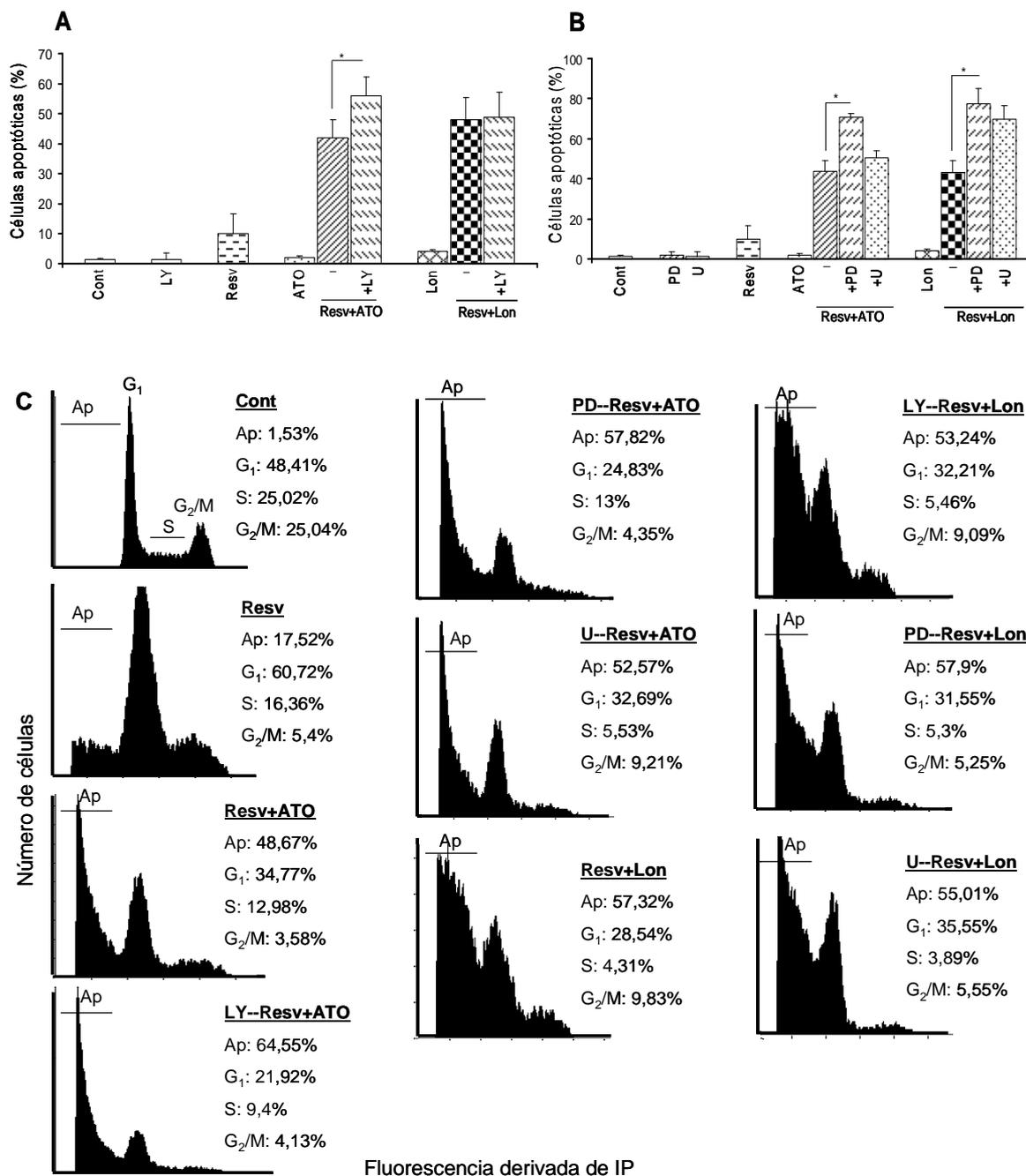


Figura 67. Efecto del inhibidor de PI3K LY294002 (LY) y los inhibidores de MEK/ERK PD98059 (PD) y U0126 (U). Se muestra la frecuencia de células apoptóticas, tomando como criterio la fracción sub-G₁ medida por citometría de flujo, a las 24 h de tratamiento con inhibidores de quinasas, ATO, lonidamina y resveratrol por sí solos así como la combinación de los inhibidores con los agentes y sobre el co-tratamiento de resveratrol con ATO y con lonidamina. En A) se muestran los resultados con LY. B) muestra los resultados con PD y U por sí solos, con el co-tratamiento de ATO o lonidamina con resveratrol (+Resv) y tras el tratamiento de resveratrol con ATO/lonidamina en presencia de los inhibidores. A) y B) muestran la media±SD de al menos 3 experimentos. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos señalados. C) muestra la distribución del ciclo celular con algunos de los tratamientos, así como el porcentaje de células en cada fase del ciclo. El resveratrol se usó a 50 µM, ATO a 2 µM, lonidamina a 100 µM, LY a 30 µM, PD98049 a 30 µM y U0126 a 2,5 µM.

2.8.-NF-κB

Como estudio complementario, analizamos el estado de activación de NF-κB, factor normalmente defensivo de la apoptosis. En efecto, se ha descrito que los polifenoles suelen inhibir su activación y la acción pro-apoptótica de curcumina es frecuentemente explicada por la inhibición de este factor de transcripción (Lin, 2007; Reuter et al., 2008).

Como control positivo del experimento empleamos tratamientos con TNF α , que se ha demostrado que activa NF-κB (Wajant et al., 2003). Cuando hicimos ensayos a distintos tiempos (8 a 24 horas), no se detectaron alteraciones significativas en la translocación de p65-NF-κB al núcleo o en la unión de NF-κB a su secuencia consenso en el DNA (Fig. 68).

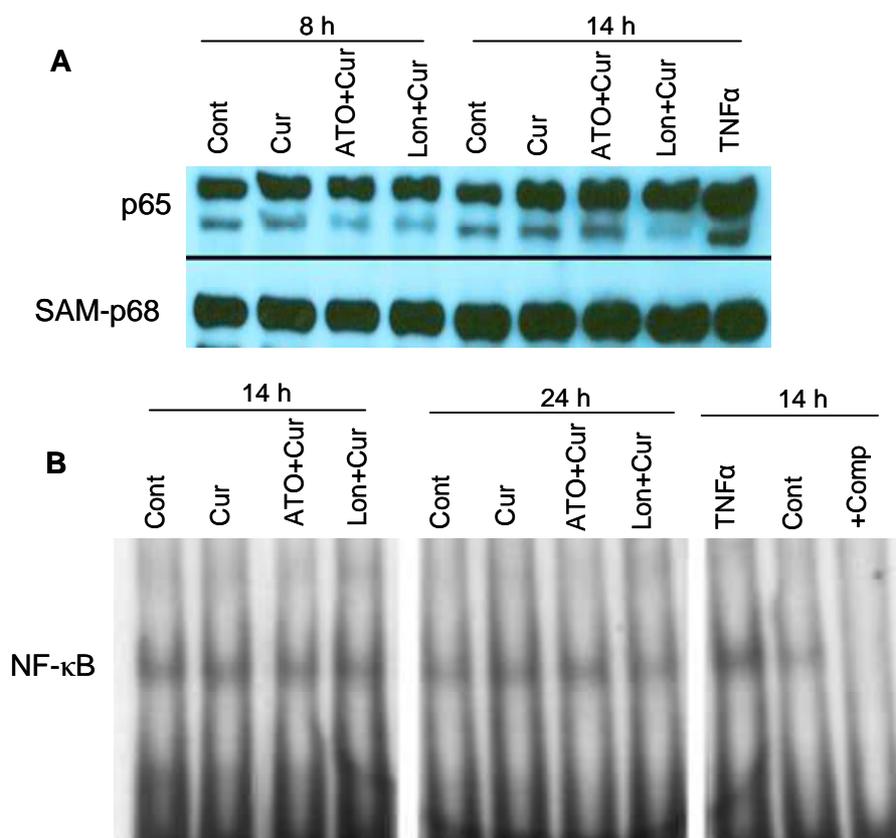


Figura 68. Translocación de p-65-NF-κB al núcleo y unión de NF-κB a su secuencia consenso. Las células U-937 fueron tratadas durante los períodos de tiempo indicados con curcumina (Cur), ATO más curcumina (ATO+Cur) y lonidamina más curcumina (Lon+Cur). Como control positivo, unas células fueron tratadas durante 16 h con TNF α . A) muestra los niveles relativos en el núcleo de p-65-NF-κB. Los niveles de SAM-p68 se midieron como control de carga. B) Actividad de unión de NF-κB al DNA. Se usó como competidor (+Comp) un exceso de 50 veces de oligonucleótido no marcado radiactivamente. La curcumina se usó a 7,5 μ M, ATO a 2 μ M, lonidamina a 100 μ M, y TNF α a 50 ng/ml.

De igual manera, se midió la translocación de p65-NF- κ B al núcleo con resveratrol por sí solo y en combinación con ATO y con lonidamina. Como observamos en la Fig. 69, el resveratrol parece que aumenta su expresión pero observamos por el control de carga SAM-p68 que se había cargado más proteína. Por su parte, el co-tratamiento de resveratrol con lonidamina produce una disminución de su expresión. Este hecho podría explicar el incremento en la toxicidad del co-tratamiento de resveratrol con lonidamina.

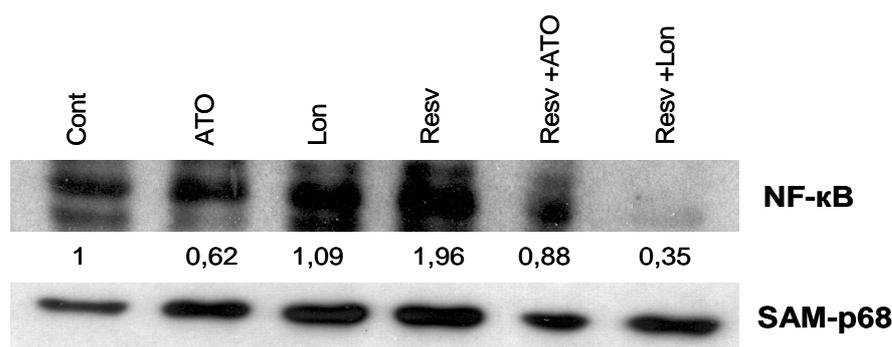


Figura 69. Translocación de p65-NF- κ B. Se muestran los niveles relativos de NF- κ B en células U-937 sin tratar (Cont) y células tratadas durante 16 h con resveratrol (Resv) y resveratrol con ATO (Resv+ATO) y con lonidamina (Resv+Lon), determinado por ensayos de inmunoblot. Los niveles de SAM-p68 se midieron como control de carga. El resveratrol se usó a 50 μ M, ATO a 2 μ M y lonidamina a 100 μ M. Los números debajo del blot indican la intensidad de las bandas en relación al control (que recibe el valor arbitrario de 1), determinados por densitometría.

2.9.- PROTEÍNAS HSP

Como se indicó en la Introducción, Hsp-70 es una proteína antiapoptótica activada por metales pesados y metaloides (como el ATO) mientras que algunos polifenoles, como la quercetina, pueden disminuir su expresión (Koishi et al., 1992).

Por ello, en primer lugar, se hicieron experimentos tentativos para analizar la capacidad de ATO y de lonidamina para incrementar Hsp-70. Como observamos en la Fig. 70, ATO activa la respuesta de estrés a las 12 horas, mientras que lonidamina no induce expresión de Hsp-70.

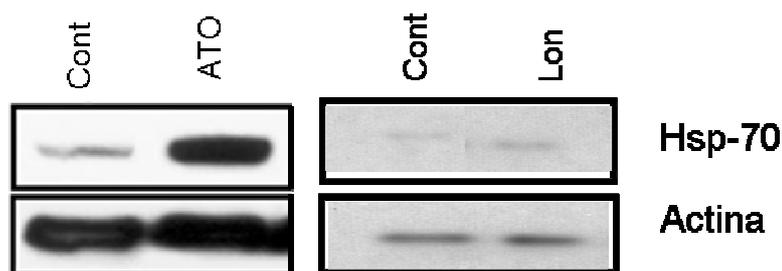


Figura 70. Modulación de Hsp-70 por ATO y lonidamina. Se muestran los niveles relativos de Hsp-70 en células U-937 sin tratar (Cont) y células tratadas durante 12 h con ATO o con lonidamina determinado por ensayos de inmunoblot. La actina se usa como control de carga del blot. ATO se usó a 2 μM y lonidamina a 100 μM .

A continuación, se analizó si los polifenoles resveratrol y curcumina por sí solos afectan la expresión de Hsp-70. Se observó que el resveratrol, a 25 y 50 μM , y la curcumina no tiene efecto pero atenúan la activación de Hsp-70 producida por ATO (Fig. 71). Por tanto, la inhibición por resveratrol y curcumina de la activación de Hsp-70 podría ser un mecanismo adicional que contribuye a la potenciación de la apoptosis en los tratamientos combinados.

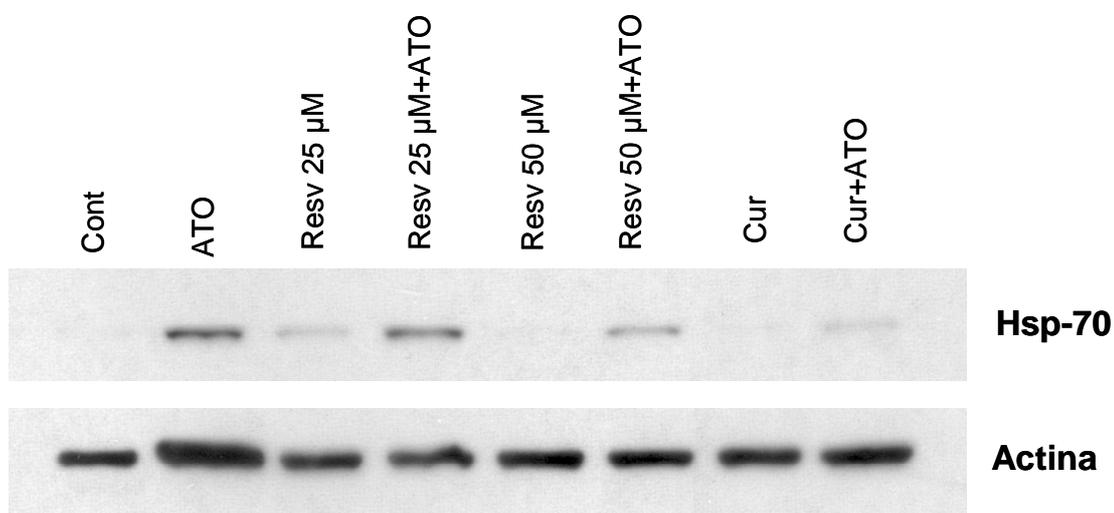


Figura 71. Modulación de Hsp-70 por resveratrol y curcumina. Se muestran los niveles relativos de Hsp-70 en células U-937 sin tratar (Cont) y células tratadas durante 12 h con resveratrol (Resv), resveratrol con ATO (Resv+ATO) y con lonidamina (Resv+Lon), curcumina (Cur) y curcumina con ATO (Cur+ATO) determinado por ensayos de inmunoblot. Los niveles de actina se midieron como control de carga. El resveratrol se usó a 25 y 50 μM , curcumina a 7,5 μM y ATO a 2 μM .

DISCUSIÓN

La finalidad de esta tesis ha sido el estudio del efecto apoptótico de los polifenoles genisteína, quercetina, ácido gálico, EGCG, naringenina, curcumina y resveratrol, por sí solos y en combinación con los agentes antitumorales ATO y lonidamina, centrándonos en los dos últimos polifenoles para estudiar mecanismos de acción.

En la literatura se encuentran numerosos estudios con agentes polifenólicos, normalmente usados para el tratamiento de tumores sólidos (Hu, 2011). En nuestro estudio usamos los polifenoles sobre células leucémicas en cultivos celulares, principalmente células leucémicas promonocíticas U-937, un tipo celular donde los estudios son menos frecuentes.

Normalmente, las concentraciones de polifenoles que se usan en este trabajo son subcitotóxicas con el fin de ver una posible quimiosensibilización junto con ATO y lonidamina. Asimismo, las dosis empleadas de ATO y lonidamina son clínicamente tolerables (Di Cosimo et al., 2003; Fernandez et al., 2004).

En nuestro laboratorio se había estudiado la acción de algunos flavonoides, un subgrupo dentro de los polifenoles, tales como genisteína y quercetina, en combinación con ATO. Ampliamos el estudio de genisteína y quercetina en combinación con la droga antitumoral lonidamina.

1.- Muerte, proliferación y ciclo celular.

En primer lugar hicimos un estudio general de los efectos que producen los polifenoles en combinación con ATO y lonidamina sobre la apoptosis, así como las posibles alteraciones sobre el ciclo celular, en tratamientos de 24 horas.

A. Apoptosis

En nuestros resultados, observamos que la **genisteína** es subcitotóxica hasta 50 μM para inducir apoptosis, siendo tóxica a concentraciones superiores. Se sabe que la genisteína induce apoptosis e inhibe el crecimiento de líneas celulares leucémicas (Park et al., 2005) y de tumores sólidos (Gossner et al., 2007) (como revisión véase (Banerjee et al., 2008)), a concentraciones superiores a las empleadas en nuestro estudio o bien a tiempos de tratamiento superiores a las 24 horas. Hemos observado que la genisteína potencia la acción apoptótica de ATO y de lonidamina con carácter más que aditivo en células U-937. La cooperación de genisteína con ATO confirma la acción descrita anteriormente por nuestro grupo (Sanchez et al., 2008) pero se trata de la primera

evidencia de quimiosensibilización en conjunción con lonidamina en células U-937. Se conoce que la genisteína potencia los efectos de ATO en otros modelos celulares, como carcinoma hepatocelular a través de la inhibición de Akt y de NF- κ B (Jiang et al., 2010; Ma et al., 2011). Además, la genisteína puede actuar como quimiosensibilizador en combinación con otras drogas como gemcitabina (Liang et al., 2012), cisplatino (Tamura et al., 2003), selenio (Kumi-Diaka et al., 2010) y 5-FU (Hwang et al., 2005). El efecto de genisteína es específico sobre líneas celulares leucémicas ya que no se ha observado potenciación sobre la acción de ATO en linfocitos de sangre periférica (Sanchez et al., 2008).

Por su parte, hemos observado que la **quercetina** es subcitotóxica hasta 10 μ M y a concentraciones superiores es tóxica. Este resultado es acorde con resultados que indican que la quercetina induce apoptosis en células U-937 de forma dosis-dependiente (Rong et al., 2000). En otras líneas leucémicas, tales como leucemia linfocítica crónica, se ha demostrado recientemente que la quercetina produce apoptosis (Gokbulut et al., 2013). Además, a la concentración de 25 μ M induce apoptosis en líneas celulares de hepatoma (Granado-Serrano et al., 2006).

Nuestros resultados indican que la quercetina potencia la acción citotóxica de ATO y lonidamina aditivamente en células U-937. Se conoce que la quercetina potencia la inducción de apoptosis producida por ATO en queratinocitos HaCaT de forma dosis-dependiente (Shen et al., 2012), y en nuestro laboratorio se había descrito que potencia la acción apoptótica de ATO en células leucémicas U-937, células promielocíticas HL-60 y células promonocíticas THP-1 (Ramos and Aller, 2008). Es la primera evidencia de quimiosensibilización de quercetina sobre la acción de lonidamina. Se conoce que la quercetina puede potenciar la acción de otras drogas antitumorales, como por ejemplo de doxorubicina en modelos de cáncer de mama (Li et al., 2013), de cisplatino en melanoma (Tamura et al., 2003) o de selenio en el cáncer de próstata (Kumi-Diaka et al., 2010).

Observamos que la **EGCG** es subcitotóxica hasta una concentración de 50 μ M y tóxica a concentraciones superiores. Se ha observado recientemente que EGCG inhibe el crecimiento celular y produce apoptosis en la línea U-937 de forma dosis y tiempo dependiente (Fan et al., 2010; Nakazato et al., 2005b), así como en otras células leucémicas mieloides, por ejemplo HL-60, K562, NB4 o UF-1 (Gordon, 2005;

Nakazato et al., 2005b) o en tumores sólidos como cáncer de páncreas (Shankar et al., 2007b) o carcinoma epidermoide (Ahmad et al., 1997). Probablemente, el efecto proapoptótico de EGCG se debe principalmente al grupo galato porque otras catequinas de la familia que carecen de este grupo son menos eficaces para producir apoptosis (Lozano et al., 2006; Saeki et al., 2000). Según nuestros resultados, la EGCG potencia la acción apoptótica de ATO y lonidamina con carácter más que aditivo. En la literatura encontramos que en mieloma múltiple, EGCG en combinación con ATO potencia la apoptosis (Nakazato et al., 2005a), el mismo efecto que ocurre en células HL-60 (Lee et al., 2011). Es la primera evidencia de potenciación de la apoptosis de EGCG junto a lonidamina. En la literatura se ha visto que puede potenciar la eficacia terapéutica de otras drogas quimioterapéuticas, por ejemplo gemcitabina (Tang et al., 2012)

En nuestro estudio, el **ácido gálico** es subcitotóxico hasta concentraciones de 20 μM y a partir de 40 μM es tóxico en células U-937. Estos datos concuerdan con lo visto en la literatura, si bien es la primera evidencia de apoptosis en células U-937. El ácido gálico por sí solo induce apoptosis, generalmente en tumores sólidos, como cáncer de próstata (Agarwal et al., 2006; Serrano et al., 1998) y en otros modelos (como revisión véase (Verma et al., 2013)). Además, el ácido gálico induce apoptosis en varias líneas celulares leucémicas, tales como células HL-60 (Inoue et al., 1994; Inoue et al., 1995; Madlener et al., 2007; Yang et al., 2006a), células K562 y células de linfoma Wehi 231 (Serrano et al., 1998), de forma dosis-dependiente a partir de 40 μM . Asimismo, el ácido gálico inhibe la proliferación celular en líneas leucémicas (Faried et al., 2007). Se ha postulado que los grupos fenólicos hidroxilo son los responsables de la citotoxicidad del ácido gálico, mientras que el grupo carboxilo estaría implicado en distinguir las células normales de las tumorales (Inoue et al., 1995), siendo su efecto específico sobre estas últimas.

Hemos observado que el ácido gálico potencia la acción apoptótica de ATO de forma aditiva. Es la primera evidencia de la potenciación del ácido gálico sobre ATO en células U-937. Sin embargo, se conoce que el ácido tánico, el ácido fenólico que origina en su descomposición ácido gálico, induce apoptosis en combinación con ATO en modelos de células HL-60 (Chen et al., 2009).

Nuestros resultados demuestran que la **naringenina** hasta la concentración de 100 μM es subcitotóxica, mientras que a concentraciones superiores es tóxica. Estas observaciones son congruentes con publicaciones que demuestran que naringenina por sí sola induce apoptosis y produce citotoxicidad en la línea leucémica U-937, así como en otros modelos, como células Jurkat, HL-60 y NALM-8 y en líneas de tumores sólidos, a concentraciones superiores a 100 μM (Kanno et al., 2005; Kanno et al., 2006; Sabarinathan et al., 2010).

Observamos que la naringenina potencia fuertemente la acción apoptótica de ATO y, de forma menos que aditiva, la de lonidamina. Se trata de una novedad esta investigación. Se sabe que naringenina puede potenciar la eficacia terapéutica de otras drogas quimioterapéuticas, por ejemplo de doxorubicina en líneas de cáncer de mama MCF-7 y en líneas HeLa (Meiyanto et al., 2012), o de CPT-11 (irinotecan hidrocloreto), un inhibidor de la DNA topoisomerasa I, en líneas de carcinoma de hígado (Takahata et al., 2008).

Por último, analizamos los efectos de curcumina y resveratrol en mayor profundidad, dada su especial relevancia en clínica.

Hemos observado que la **curcumina** causa apoptosis de forma dosis-dependiente en células mieloides agudas U-937. Es subcitotóxica hasta concentraciones de 10 μM , siendo tóxica a dosis superiores. Estos datos son congruentes con numerosos estudios que demuestran que la curcumina, a concentraciones elevadas, es capaz de inducir muerte celular en varios tipos celulares, desde líneas leucémicas (Kuo et al., 1996) como células HL-60 (Liao et al., 2008) a tumores sólidos, como cáncer de mama (Sun et al., 2012).

Por su parte, el **resveratrol** es subcitotóxico hasta concentraciones de 50 μM y tóxico a dosis superiores en células U-937. Estas observaciones confirman lo hallado por otros autores, los cuales observan que el resveratrol inhibe la proliferación de células linfoides y mieloides e induce apoptosis en células U-937 y HL-60 de forma dosis-dependiente (Clement et al., 1998; Guha et al., 2011; Lee et al., 2008; Li et al., 2010; Liao et al., 2010), en otros modelos de células leucémicas (Estrov et al., 2003; Kelkel et al., 2010; Li et al., 2010) y en otros tipos celulares, como carcinoma hepatocelular (Liao et al., 2010) y en melanoma (Larrosa et al., 2003). El resveratrol induce la apoptosis de manera selectiva en todos los modelos, puesto que no afecta a las células normales.

Finalmente, analizamos la acción quimiosensibilizadora de concentraciones subcitotóxicas de curcumina y resveratrol en las células mieloides U-937 y, por comparación, en células HL-60, células NB4 y células crónicas mielógenas K562, en combinación con lonidamina y ATO y, por comparación, con otras drogas antitumorales.

Se observó que la eficacia de la respuesta depende de la línea celular usada, tanto en el caso de curcumina como de resveratrol, como vamos a discutir a continuación.

El co-tratamiento con concentraciones subcitotóxicas de curcumina incrementa fuertemente la eficacia apoptótica de ATO y lonidamina en células U-937 y HL-60, disminuyendo la proliferación y la viabilidad celular. La apoptosis se empieza a detectar a partir de las 16 horas en los tratamientos combinados con curcumina. Se trata de la primera observación que indica la sensibilización que produce curcumina sobre ATO y lonidamina, dado que todas las publicaciones precedentes indican la protección de curcumina contra la toxicidad del arsénico. La acción protectora se ha observado en células no tumorales en cultivo, por ejemplo en linfocitos de sangre periférica humanos (Mukherjee et al., 2007), en células de mamífero (Roy et al., 2008). Asimismo, protege contra la neurotoxicidad de ATO en ratas (Yadav et al., 2011; Yadav et al., 2009).

Hay cooperación de curcumina con ATO y con lonidamina en células NB4 pero con menor intensidad a lo observado en células U-937 y HL-60. Desconocemos el motivo de esta menor cooperación. Sí que se sabe que las células NB4 son más sensibles al ATO que otras células mieloides, ya que tienen niveles más bajos de las enzimas detoxificantes GST μ , GPx y menor actividad de la enzima antioxidante catalasa respecto a líneas no APLs y además la detoxificación de ATO en células NB4 y el catabolismo de H₂O₂ es menos eficaz (Jing, 2004).

En general, las líneas K562, Jurkat y THP-1 son más resistentes que las células U-937 a la acción del ATO.

En las células de leucemia mielóide crónica K562 la curcumina potencia la acción apoptótica de ATO con carácter más que aditivo y produce una caída de viabilidad, pero no ocurre así en el caso de lonidamina.

En las líneas celulares Jurkat y THP-1 hay cooperación de curcumina con ATO y con lonidamina con carácter no superior a la aditividad.

Mientras que de las células Jurkat y THP-1 no tenemos mayor información, sabemos que las células K562 tienen un alta resistencia intrínseca a agentes citotóxicos debido a la presencia de p210^{Bcr/Abl}, una proteína con actividad tirosina kinasa (Moorman et al., 2007). Además, el ATO causa parada en G₂/M en células K562, y se sabe que las células en G₂/M son más resistentes a la acción de la curcumina que las células que están en G₁ (Wang ZY, 2008), lo que puede explicar también que las células K562 sean más resistentes a la inducción de apoptosis por ATO. Por su parte, podríamos postular que dado que la lonidamina no produce alteración en la distribución del ciclo en células K562, la disminución en el número de células viables en el co-tratamiento junto a resveratrol es menos potente que en el caso de lo observado con ATO.

Aunque en células K562 no observamos demasiado incremento en la apoptosis en los co-tratamientos de curcumina con ATO, sí se observa caída en el número de células viables. Esto puede deberse a que las células estén proliferando menos como consecuencia de la parada en G₂/M producida por ATO.

En la literatura se ha descrito que la curcumina por sí sola produce apoptosis en la línea K562 y en células Jurkat a concentraciones superiores a las usadas por nosotros (Duvoix et al., 2003).

Por su parte, el resveratrol potencia la acción apoptótica de ATO y de lonidamina, y disminuye la viabilidad celular en células U-937 y en HL-60. Este hecho ocurre cuando el resveratrol se usa a concentraciones iguales o superiores a 25 µM. La apoptosis se empieza a detectar a las 16 horas de tratamiento. Observamos un incremento de la permeabilidad de la membrana plasmática en los co-tratamientos de resveratrol a las 16 horas, un hecho que nos indica que hay necrosis primaria y/o apoptosis avanzada.

Se trata de la primera observación que indica la sensibilización por resveratrol sobre ATO y lonidamina. En efecto, recientemente se ha visto que el resveratrol evita la nefrotoxicidad y cardiotoxicidad producida por el ATO *in vitro* e *in vivo* (Yu et al., 2013; Zhao et al., 2008), un suceso contrario al descrito en nuestros resultados.

En la línea celular NB4 hay potenciación de la apoptosis pero con menor efectividad que en U-937 y HL-60. El resveratrol no coopera con ATO y lonidamina para producir apoptosis y citotoxicidad en células Jurkat, K562, THP-1 y RPMI 8866. En concreto, en células K562 el resveratrol produce una caída en el número de células

viabiles en combinación con ATO a las 24 y 48 horas pero poca muerte celular. La reducción en el número de células viabiles podría reflejar principalmente el efecto citostático (de parada de ciclo) producido por resveratrol (como se explicará más adelante).

La explicación de la diferente sensibilidad de las líneas celulares se describió anteriormente cuando lo discutimos para la acción de curcumina.

Finalmente, es de notar que la generación de la muerte celular se lleva a cabo por una apoptosis dependiente de caspasas tanto en el caso de curcumina como de resveratrol, ya que cuando ponemos un inhibidor de caspasas como z-VAD, disminuye la frecuencia de apoptosis en los co-tratamientos. Ello no excluye la posible implicación adicional de otros tipos de muerte celular.

Por comparación, estudiamos el efecto de curcumina y resveratrol cuando se combinan con otras drogas antitumorales diferentes a ATO y lonidamina y con diana en el DNA, tales como cisplatino, ara-C o etopósido.

No observamos respuesta cooperativa de apoptosis cuando la curcumina fue combinada con cisplatino y ara-C. La falta de apoptosis tampoco se explica por otro tipo de muerte celular, puesto que no observamos necrosis en los co-tratamientos. Para estar seguros de si la cooperatividad para producir apoptosis depende del tiempo, se realizaron experimentos de 72 horas combinando curcumina con cisplatino. Aunque observamos una serie de efectos como disminución en el número de células, acumulación de células en la fase G₂/M, hipertrofia celular, apoptosis y necrosis secundaria, no encontramos potenciación de la apoptosis de curcumina sobre cisplatino.

Por su parte, el resveratrol no coopera con cisplatino ni etopósido para producir apoptosis ni alteración en la viabilidad.

Aunque no observamos cooperación de curcumina con cisplatino en células promonocíticas U-937, se conoce que la curcumina potencia eficazmente la apoptosis provocada por cisplatino en otros tipos celulares no leucémicos, como tumores sólidos (Chanvorachote et al., 2009; Notarbartolo et al., 2005), indicando que los efectos de los tratamientos no son sólo específicos de droga sino también específicos de tipo celular.

De modo similar, en la literatura encontramos que la curcumina y el resveratrol

producen quimiosensibilización en combinación con otras drogas convencionales o con diana en el DNA (Gupta et al., 2011; Shankar et al., 2007a).

Hay estudios que indican que la cooperación entre quercetina y cisplatino para inducir apoptosis depende del orden de administración, siendo más bajo o nulo cuando se aplican al mismo tiempo (Cipak et al., 2003; Jakubowicz-Gil et al., 2005). Esto podría ser congruente con nuestro trabajo, donde todos los agentes polifenólicos se aplicaron simultáneamente a las drogas con diana en el DNA.

Hay varios mecanismos que podrían explicar la eficacia diferencial de curcumina/resveratrol según el tipo de droga antitumoral utilizada. Uno de ellos es la sensibilidad desigual de ATO, lonidamina y cisplatino al ambiente pro-oxidante, como discutiremos más adelante. Además, influye la alteración en la distribución del ciclo celular, que también vamos a discutir líneas más abajo.

Por su parte, se ha observado que la curcumina puede inhibir la citotoxicidad producida por ara-C (van't Land et al., 2004) y otros autores han encontrado que algunos flavonoides como kaemferol o miricetina podrían incrementar la sensibilización de las células leucémicas al tratamiento con ara-C (Nadova et al., 2007).

B. Ciclo celular

Nuestros resultados sobre si los agentes fenólicos y ATO y lonidamina producen alteración sobre la distribución del ciclo celular son variados.

Hemos observado que ATO ejerce efectos mínimos en la distribución del ciclo celular en células U-937 y HL-60. En algunos tipos celulares se ha encontrado que ATO produce una parada en G_1 dependiente de p53 (Liu et al., 2003; States et al., 2002; Yih and Lee, 2000). En las células K562, como hemos descrito anteriormente, el ATO produce parada en G_2/M . En la literatura se ha observado que el ATO puede producir parada en G_2/M en células U-937 (McCollum et al., 2005), pero a concentraciones superiores a las utilizadas por nosotros, y también en tumores sólidos como carcinoma de hígado (Zhang et al., 2012) o cáncer gástrico (Li et al., 2009b).

Según nuestros resultados, la lonidamina por sí sola disminuye ligeramente la fase G_1 e incrementa G_2/M . En la literatura encontramos que la lonidamina produce una disminución en la fase S en líneas de hepatocarcinoma (Ricotti et al., 2003).

Por su parte, quercetina, EGCG, ácido gálico y naringenina no producen alteraciones cualitativamente importantes en la distribución del ciclo. En la literatura

encontramos que estos agentes pueden alterar el ciclo celular según el tipo celular usado, la dosis empleada y el tiempo de tratamiento.

Así, la quercetina, cuando se usa a altas concentraciones, produce parada de ciclo en G₂/M en varios tipos de cáncer, como células leucémicas U-937 (Rong et al., 2000), células linfoblásticas (Fil'chenkov and Zavelevych, 2009), cáncer de pulmón (Kuo et al., 2004; Yang et al., 2006b) o bien parada en G₁/S en células leucémicas (Yoshida et al., 1992), cáncer de colon (Ranelletti et al., 1992), de hígado (Granado-Serrano et al., 2006), gástrico, nasofaríngeo, o de endometrio.

La EGCG produce parada en el crecimiento en G₀/G₁ en otros tipos celulares como carcinoma epidermoide (Ahmad et al., 2000), cáncer de próstata (Gupta et al., 2000) o cáncer de páncreas a través de la regulación de ciclinas (Shankar et al., 2007b). No obstante, se ha observado parada en G₂/M en células MCF-7 de cáncer de mama (Tran et al., 2010). Se ha observado que el tratamiento de varias líneas de cáncer (próstata, pulmón y piel) con EGCG altera el patrón de las proteínas de ciclo celular, por ejemplo produce inhibición de CDKs.

Estudios con ácido gálico en carcinoma de próstata muestran que produce parada de ciclo celular, a las 24 horas de tratamiento, produciendo acumulación de células en fase G₂/M y disminución en la fase G₁ (Agarwal et al., 2006).

Por último, la naringenina produce acumulación en G₂/M en células linfoblásticas agudas humanas (Fil'chenkov and Zavelevych, 2009).

A diferencia de los anteriores polifenoles, en nuestros experimentos la genisteína produce parada de ciclo en la fase G₂/M. Este agente es un inhibidor de la topoisomerasa II, por lo que produce roturas en el DNA. Un efecto de las drogas que producen daño a nivel del DNA es provocar parada en G₂ impidiendo la progresión a mitosis cuando el DNA está dañado. Este efecto ya se había observado en la literatura (Bandeled and Osheroff, 2007; Nguyen et al., 2006). Se ha descrito que las células paradas en G₂ son más sensibles a la acción del ATO (McCollum et al., 2005). Se sabe que la genisteína puede producir diferenciación en células mieloides debido a este efecto de parada en G₂/M (Sanchez et al., 2009).

En nuestros experimentos, la curcumina produce una ligera disminución de la población en G₂/M. Otros autores han encontrado que produce parada en una u otra fase según el modelo celular utilizado (como revisión véase (Karunagaran et al., 2007)), por ejemplo para en G₁ las células de líneas derivadas de cáncer de mama cuando se usa a

concentraciones bajas (Lin, 2007; Meiyanto et al., 2012), o para en G₁/S células de linfoma (Shishodia et al., 2005) y de cáncer de próstata (Srivastava et al., 2007) o puede afectar a la transición S y producir también parada en G₂/M (Banerjee et al., 2010; Weir et al., 2007). En nuestros resultados observamos que la combinación de curcumina con ATO y lonidamina disminuye la acumulación de células en fase S y en G₂/M, lo cual es concomitante con el incremento en la apoptosis.

El resveratrol produce una acumulación de células en la fase S y disminuye las células en fase G₂/M, inhibiendo así la progresión del ciclo celular en células U-937. Este efecto es acorde a lo observado por otros autores en células U-937 (Castello and Tessitore, 2005), en otros modelos de leucemia humana (Lee et al., 2008; Li et al., 2010; Ragione et al., 1998) o en carcinoma de colon (Liang et al., 2003). Este efecto está probablemente relacionado con la inhibición por parte del resveratrol de enzimas asociadas con la replicación del DNA, como la ribonucleótido reductasa (Fontecave et al., 1998; Zou et al., 1999) y la DNA polimerasa (Locatelli et al., 2005). Muchos otros estudios explican los efectos del resveratrol de parada en G₂/M por su regulación de proteínas del ciclo celular a través de la disminución de NF-κB (Holmes-McNary and Baldwin, 2000) o el incremento en la expresión de p53 y del inhibidor de CDK p21^{WAF1/CIP1} (Mnjoyan and Fujise, 2003). Sin embargo, se ha descrito que los efectos sobre el ciclo celular producidos por el resveratrol son variables y depende del modelo celular utilizado (Shankar et al., 2007a). Por ejemplo, en líneas leucémicas tales como células Jurkat produce acumulación en las fases G₀-G₁, disminución de la fase S y desaparición de G₂/M (Li et al., 2010). En nuestras observaciones, el efecto de parada de resveratrol sobre la fase S es disminuido o incluso eliminado cuando se pone en combinación con ATO y con lonidamina.

Por su parte, el cisplatino produce acumulación de células en S y G₂ debido a que por su mecanismo de acción forma aductos covalentes en el DNA, afectando por ello a la transición en la fase S y la transición de G₂ a mitosis.

El etopósido produce parada en G₂/M debido a que afecta a la DNA topoisomerasa II, por las mismas razones indicadas en el caso de genisteína. Esta observación es congruente con lo encontrado en la literatura por otros autores (Rius et al., 1991).

Como hemos comentado con anterioridad, se sabe que las células que están en G₂/M son más resistentes a la acción de curcumina que las células que están en G₁ (Wang ZY, 2008). Como el cisplatino y el etopósido afectan a la transición de G₂ a M, ello puede explicar la incapacidad de la curcumina para potenciar su toxicidad. En

nuestros datos, observamos que la curcumina revierte el efecto producido por cisplatino de retraso de S a G₂/M, situación que no observamos en el caso de resveratrol en combinación con cisplatino o etopósido.

Una vez estudiados la capacidad de producción de apoptosis por curcumina y resveratrol, en los siguientes apartados nos centramos en la discusión de los mecanismos de ejecución y regulación de la muerte celular provocada por los tratamientos.

2. Eventos mitocondriales.

ATO y lonidamina son drogas con diana en la mitocondria, en concreto en el ANT del mPTP (Belzacq et al., 2001; Fantin and Leder, 2006). La curcumina y el resveratrol también tienen diana en la mitocondria (Tinhofer et al., 2001). Por todo ello, estudiamos mecanismos de ejecución de la apoptosis por la vía mitocondrial y disfunción mitocondrial.

Nuestros resultados demuestran que la curcumina y el resveratrol activan la apoptosis a través de la vía ejecutoria mitocondrial. Los tratamientos de curcumina/resveratrol con ATO y con lonidamina producen una liberación de citocromo *c* de la mitocondria al citosol regulada por la activación de Bax y Bid (hay translocación de la proteína pro-apoptótica Bax a la mitocondria y una rotura de Bid, respectivamente), bajada en los niveles de XIAP y activación de la ruta caspasa -9/caspasa-3. La salida del citocromo *c* al citosol es un paso esencial en la formación del apoptosoma, requerido para la activación de la cascada de caspasas -9 y -3, mientras que la degradación de XIAP se produce como consecuencia de la salida de Omi/HtrA2 de la mitocondria y así las caspasas se liberan de la acción represora de XIAP (Ravagnan et al., 2002).

Todos estos datos indican una activación de la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis, lo cual es congruente con las propiedades de ATO y lonidamina como drogas con diana en la mitocondria (Armstrong, 2006) y con datos en la literatura sobre la acción en este orgánulo de curcumina (Chan et al., 2006b; Karunagaran et al., 2007; Khar et al., 1999) y resveratrol (Park et al., 2001). Sin embargo, los datos que encontramos en la literatura hacen referencia a ATO, lonidamina, curcumina o resveratrol por sí solos. La novedad de nuestros estudios radica en el co-tratamiento de

curcumina/resveratrol con ATO y lonidamina. Es de resaltar que a las concentraciones subcitotóxicas de los agentes empleados en nuestro trabajo, las modificaciones en proteínas son muy escasas cuando se usan por sí solos, observándose diferencias sólo en los dobles tratamientos.

Aunque es presumible dada la naturaleza de las drogas que estudiamos preveer que la apoptosis se ejecute a través de la vía intrínseca, en principio no se puede descartar que se activen eventos típicos de la vía extrínseca, la cual se caracteriza por la activación de caspasa-8/Bid. Por ejemplo, se ha descrito la activación directa por ATO de la vía extrínseca en otros modelos celulares leucémicos (Chen et al., 2006).

En nuestros resultados hemos observado que el resveratrol por sí solo y en combinación con ATO y con lonidamina produce una activación de la vía caspasa-8/Bid (rotura de caspasa-8), considerados como reguladores de la vía extrínseca de ejecución de apoptosis, y que en células transfectadas con Bcl-2 se inhibe por completo la inducción de apoptosis. Aunque en nuestro trabajo no se ha determinado expresión de caspasa-8 en células transfectadas con Bcl-2, estos resultados sugieren que la activación de caspasa-8 por parte del resveratrol está mediada a través de la vía mitocondrial. En efecto, en un trabajo anterior de nuestro laboratorio utilizando células U-937 transfectadas con Bcl-2, en las cuales no se produce apoptosis en la vía mitocondrial, se vio que la quercetina tampoco activa caspasa-8; por tanto, la potenciación del eje de caspasa-8/Bid era un elemento secundario y derivado de la activación de la vía mitocondrial (Ramos et al., 2006). Además, se ha observado que en células transfectadas con Bcl-2 se atenúa la apoptosis producida por el resveratrol debido a la inhibición de caspasa-3 y a la disminución de la liberación de citocromo *c* de la mitocondria (Park et al., 2001).

Puesto que ATO y lonidamina son drogas mitocondriotóxicas que interaccionan con el ANT del mPTP, son susceptibles de producir apertura del mPTP. Por ello, el segundo evento que medimos fue observar cómo se ve afectado el mPTP, de manera directa evaluando la permeabilización de la membrana interna usando calceína y de manera indirecta a través de la medición del potencial de membrana. El potencial de membrana es consecuencia indirecta de la permeabilización.

La permeabilización de la membrana interna la medimos directamente mediante el uso de la sonda calceína, con una técnica puesta a punto en el laboratorio (Calvino et al., 2011). Sólo la medimos en el caso de resveratrol a tiempos cortos. Observamos que

el resveratrol por sí solo y en combinación con ATO no altera significativamente la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial, hecho congruente con la escasa modificación observada en el potencial de membrana a las 6 horas. La capacidad de lonidamina para producir apertura de poro se demostró con anterioridad en otro trabajo del laboratorio (Calvino et al., 2011), por lo que estos datos se omiten en esta tesis.

Además, medimos el potencial de membrana ($\Delta\psi_M$) de curcumina y resveratrol mediante el uso de agentes catiónicos.

Los tratamientos de curcumina en combinación con ATO y con lonidamina provocan la aparición de una sub-población con bajo potencial de membrana. Esta caída en el potencial de membrana puede ser causa de la apoptosis o bien ser un evento derivado de la apoptosis. Usamos CsA, un agente que bloquea la apertura del mPTP, con el fin de analizar si inhibiendo el potencial de membrana se inhibe la apoptosis. Observamos que CsA no evita la disipación del $\Delta\psi_M$ y la generación de apoptosis. Estas observaciones deben considerarse con precaución ya que las respuestas de las drogas no son necesariamente equivalentes cuando se examinaron a nivel subcelular (por ejemplo, la apertura del poro de transición mitocondrial en mitocondrias aisladas) y en células enteras, donde múltiples parámetros pueden verse afectados. Por ejemplo, CsA se usa mejor con mitocondrias aisladas ya que en células enteras puede producir efectos tóxicos. Efectivamente, según la literatura, CsA es tóxico en células leucémicas y produce estrés oxidativo en varios modelos celulares (Navarro-Antolin et al., 2007) y los ROS son determinantes para la toxicidad de ATO y lonidamina. Asimismo, se ha visto que CsA produce caída del potencial de membrana a largo plazo y muerte celular.

Por su parte, el tratamiento con z-VAD produce la desaparición de la población con bajo potencial de membrana. Según este resultado, tanto en el caso de curcumina como de resveratrol, la disipación del $\Delta\psi_M$ es un suceso tardío (a partir de 16 horas) y dependiente de caspasas (como hemos comentado anteriormente), que ocurre al mismo tiempo que otras características típicas de la apoptosis (activación de caspasa-3, condensación/fragmentación de cromatina). Por tanto, la disminución del potencial de membrana es un evento concomitante o subsiguiente a la apoptosis, más que autorregulador.

Estos datos concuerdan con la literatura, pues se ha observado que tanto la curcumina como el resveratrol a concentraciones elevadas producen muerte celular de tipo apoptótico en concomitancia con caída del potencial de membrana. Con la

curcumina se ha visto por ejemplo en timocitos de rata (Jaruga et al., 1998) y con el resveratrol en células leucémicas humanas (Dorrie et al., 2001; Low et al., 2010; Tinhofer et al., 2001). Se ha observado que el resveratrol induce despolarización de la membrana mitocondrial (Dorrie et al., 2001) y produce apertura del poro de transición mitocondrial (Zunino and Storms, 2006). Además, el resveratrol y la curcumina producen inhibición del complejo ATPsintasa F₀/F₁ de la mitocondria (Zheng and Ramirez, 2000).

La novedad de nuestro estudio radica en la detección de la población de bajo potencial de membrana en los co-tratamientos de curcumina/resveratrol con ATO y lonidamina cuando estas drogas se usan a dosis subcitotóxicas.

En algunos casos, cuando se usa resveratrol, se observa un incremento en la tinción con rodamina 123 o DilC1(5) que afecta a la población celular principal, que se interpreta a veces en la literatura como una hiperpolarización. El resveratrol causa parada en las fases S-G₂/M, lo que conduce a la hipertrofia celular y mayor acumulación de mitocondrias por célula. Por ello, en nuestro caso, la hiperpolarización puede ser un artefacto como consecuencia de que hay más mitocondrias por célula.

No vimos modificaciones en el potencial de membrana por ATO, lonidamina, curcumina o resveratrol cuando se emplean por sí solos. En la literatura encontramos resultados positivos, pero con concentraciones más altas que las usadas en este trabajo para cada uno de los agentes. Por ejemplo, la concentración de ATO que usamos, 2 μ M, está dentro del rango de concentraciones clínicas tolerables, pero es mucho más baja que las usadas generalmente para analizar efectos de la droga a nivel mitocondrial, por ejemplo sobre el mPTP (Belzacq et al., 2001).

3. Estrés oxidativo.

Una vez estudiada la eficacia de las drogas para producir apoptosis y los mecanismos que implican una disfunción mitocondrial, pasamos a estudiar los mecanismos de señalización, empezando por el estrés oxidativo. Las alteraciones en el estado redox de la célula pueden jugar un importante papel en la ejecución de la apoptosis (Green and Reed, 1998). ROS pueden afectar diferentes factores o vías de señalización importantes para la ejecución de la apoptosis (Buttke and Sandstrom, 1994).

Como se dijo anteriormente, los polifenoles, a pesar de su acción protectora y antioxidante (Hu, 2011; Ramos, 2007), en ciertas ocasiones se comportan como pro-

oxidantes. La producción de ROS por los polifenoles puede ser mitocondrial (Salvi et al., 2002) y extra-mitocondrial (Galati et al., 2002). Independientemente de los mecanismos de producción de ROS, que no hemos estudiado, nos preguntamos si la sobreproducción de ROS puede ser un mecanismo para explicar la quimiosensibilización. En efecto, esta explicación es plausible dado que ATO y lonidamina son drogas sensibles a un ambiente oxidante, esto es, tienen una mayor toxicidad en un ambiente oxidante, como se ha demostrado mediante la combinación de ATO y lonidamina con los agentes H₂O₂ y 2-ME. En el caso de ATO ya se conocía que era sensible a estrés oxidativo (Wang and Chen, 2008), pero con lonidamina esta observación es nueva en la literatura.

Los ensayos de oxidación se realizaron a tiempos cortos para asegurarnos de que las modificaciones en ROS sean causa, y no consecuencia, de la ejecución de la apoptosis. En efecto, en muchos modelos apoptóticos, el incremento en la generación de ROS es un evento temprano.

Según nuestros resultados, la curcumina por sí sola estimula ligeramente la producción de anión superóxido de forma dosis-dependiente en la línea U-937. La generación de ROS por una alta concentración de curcumina (20 µM) podría *per se* ser suficiente para disparar la apoptosis, mientras que la ligera producción de ROS causada por una baja concentración de curcumina (7,5 µM), siendo por sí sola inocua, puede incrementar la toxicidad de ATO y de lonidamina, como se demostró cuando se observó la acción protectora ejercida por los antioxidantes NAC, BHA y MnTBAP. Este mecanismo puede proporcionar una explicación alternativa o complementaria sobre la incapacidad de curcumina de potenciar la apoptosis provocada por cisplatino. De hecho, bajo las condiciones usadas en este trabajo, el cisplatino es poco sensible a un ambiente pro-oxidante, como revela el co-tratamiento de aquel con H₂O₂ o con 2-ME.

Si comparamos nuestros resultados con lo observado en la literatura, se ha observado producción de ROS por curcumina por sí sola en células derivadas de cáncer de mama y cáncer de hígado a partir de las 2 horas de tratamiento y aumenta hasta las 6 horas (Syng-Ai et al., 2004), en cáncer de colon (Scott and Loo, 2007) así como en fibroblastos de ratón (Thayyullathil et al., 2008); en estos estudios se emplearon dosis de curcumina superiores a la usada en nuestro trabajo.

Por otra parte, se ha descrito que la curcumina atenúa la generación de estrés oxidativo y otros efectos tóxicos del ATO en células no tumorales en cultivo, por ejemplo en linfocitos de sangre periférica y en fibroblastos de hámster chino y en modelos animales (Mukherjee et al., 2007; Roy et al., 2008; Yadav et al., 2011). Sin embargo, también se ha descrito que la curcumina potencia la generación de anión superóxido derivada de NADPH por ácido trans-retinoico en células U-937 (Kikuchi et al., 2010), aunque el tratamiento con curcumina por sí sola fue ineficaz. Otros autores han observado que la acción pro-apoptótica de la curcumina se inhibe mediante el uso de antioxidantes en células leucémicas, lo que corrobora que la muerte celular está mediada por la producción de ROS (Kuo et al., 1996). La curcumina es capaz de oxidar residuos tiólicos del mPTP, causando disfunción mitocondrial y muerte celular (Ligeret et al., 2004; Morin et al., 2001). Ello podría explicar la relación entre estrés oxidativo producido por curcumina en nuestro estudio y la aparición de una población con bajo potencial de membrana.

En nuestros resultados hemos observado que la curcumina, a dosis subcitotóxicas, no produce alteraciones en el contenido de GSH. En la literatura, se ha descrito que la curcumina aumenta GSH en modelos de cáncer de mama y cáncer de hígado (Syng-Ai et al., 2004), restaura los efectos de la caída de GSH en células pulmonares (Dickinson et al., 2003) e induce biosíntesis de GSH en células epiteliales alveolares (Biswas et al., 2005). En sentido opuesto, hay autores que observan que la curcumina, a una concentración de 80 μM , produce caída de GSH de forma dependiente del tiempo de tratamiento en fibroblastos de ratón (Thayyullathil et al., 2008) y en cáncer de colon (Scott and Loo, 2007).

Sin embargo, en el co-tratamiento de curcumina con lonidamina hemos observado caída en los niveles de GSH, lo que podría explicar en parte el incremento en toxicidad.

Por su parte, con el resveratrol hay resultados variables según la sonda utilizada. Cuando se usa la sonda H_2DCFDA , a las 3 horas de tratamiento se produce una caída en los niveles de ROS. Cuando se usa la sonda DHE aumenta ligeramente los niveles de anión superóxido. En la literatura se observa comúnmente que el resveratrol se comporta como antioxidante (Yu et al., 2012). Sin embargo, se ha descrito que el resveratrol se puede comportar como pro-oxidante (Kelkel et al., 2010), por ejemplo a 50 μM puede inducir producción de anión superóxido en varios modelos tumorales (Guha et al., 2010; Juan et al., 2008; Low et al., 2010), en consonancia con nuestros

experimentos. Se ha propuesto que la familia NADPH oxidasa es la fuente primaria de la producción de anión superóxido por parte del resveratrol (Ahmad et al., 2004). La actividad pro-oxidante del resveratrol estaría ligada a su prevención de la promoción y progresión tumoral, así como a la parada que produce en el ciclo celular (Kelkel et al., 2010).

Además, el resveratrol en combinación con ATO produce una caída en los niveles de GSH, y este hecho podría favorecer el incremento en la toxicidad del co-tratamiento. Esto es acorde por la observación de que el resveratrol, a la misma concentración usada por nosotros (50 μ M) disminuye los niveles de GSH de forma dependiente del tiempo y a partir de las 3 horas de tratamiento (Guha et al., 2011). En efecto, se sabe que existe una relación inversamente proporcional entre el contenido en GSH y la toxicidad del ATO (Ramos and Aller, 2008).

Además, en nuestros resultados hemos observado que la curcumina y resveratrol son agentes sensibles al estrés oxidativo puesto que su toxicidad se incrementa en presencia de BSO. Esto es congruente con resultados descritos por otros autores con curcumina (Scott and Loo, 2007).

Dada la potencial importancia de la producción de ROS como causa explicativa de la acción quimiosensibilizadora de los polifenoles, a efectos comparativos, hicimos ensayos con otros agentes fenólicos: genisteína, quercetina, naringenina.

Nuestros resultados demuestran que la genisteína y la naringenina por sí solas y en combinación con ATO producen incremento en ROS y su acción apoptótica disminuye por tratamientos con antioxidantes.

En nuestro laboratorio se había demostrado con anterioridad que la genisteína potencia la apoptosis provocada por ATO en modelos de células leucémicas por la sobreproducción de ROS y la activación de proteínas quinasas inducibles por ROS tales como p38 y AMPK (Sanchez et al., 2008).

Por otro lado, observamos que el co-tratamiento de quercetina con ATO produce una caída en los niveles de GSH. En la literatura se observa que algunos flavonoides provocan una caída en los niveles de GSH, tanto en tumores sólidos como en líneas leucémicas (Kachadourian and Day, 2006; Kachadourian et al., 2007; Ramos and Aller, 2008; Rong et al., 2000).

Por último, aunque no medimos el estrés oxidativo con EGCG ni con ácido gálico hay datos en la literatura sobre ellos. Por ejemplo, el tratamiento de EGCG incrementa ROS en células leucémicas (Nakazato et al., 2005b; Saeki et al., 2002), en mieloma múltiple (Nakazato et al., 2005a), cáncer de ovario (Chan et al., 2006a), cáncer de hígado (Li et al., 2009a) y en otros modelos (Azam et al., 2004). En combinación con ATO, EGCG produce incremento de ROS y disminución de GSH en mieloma múltiple (Nakazato et al., 2005a). Por su parte, el ácido gálico se puede comportar como pro-oxidante para inducir muerte celular (Agarwal et al., 2006; Inoue et al., 2000; Labieniec and Gabryelak, 2006), por ejemplo en células HL-60 (Inoue et al., 2000; Sakagami and Satoh, 1997; Sakagami et al., 1997; Sakaguchi et al., 1998; Yang et al., 2006a).

En resumen, cada uno de los agentes estudiados producen estrés oxidativo mediante diferentes mecanismos: hiperproducción de ROS o caída de GSH.

4. Proteínas quinasas y otros factores.

Por último, analizamos proteínas quinasas y otros factores reguladores, modulables por estrés oxidativo o potencialmente útiles en la regulación de la apoptosis (Corcoran and Cotter, 2013; Matsuzawa and Ichijo, 2005). La expresión de las proteínas quinasas podría experimentar alteraciones dependientes de ROS en células tratadas con curcumina o resveratrol (McCubrey et al., 2006). En efecto, p38-MAPK ha sido caracterizada como una quinasa que responde a estrés oxidativo moderado (Kurata, 2000). Debido a que es inducible por oxidación intracelular, p38 es capaz de regular la apoptosis generada por ATO en células leucémicas U-937 (Amran et al., 2005; Sanchez et al., 2008). Del mismo modo, JNK se puede activar bajo condiciones de estrés oxidativo y así potenciar la apoptosis generada por ATO en células leucémicas (Chen et al., 2006). Por su parte, la ruta PI3K/Akt se suele activar como consecuencia de estrés oxidativo y la ruta MEK/ERK también se puede activar como consecuencia de la acción de ROS (Torres and Forman, 2003).

Nuestros experimentos indican que la curcumina no causa activación de JNK en células U-937. Otros trabajos muestran efectos dispares de la curcumina sobre esta quinasa. Así, produce activación de JNK y producción de ROS en osteoblastos (Chan et al., 2006b), mientras que en otros sistemas inhibe JNK como en cáncer de mama (Squires et al., 2003) o en queratinocitos humanos irradiados con UVB (Cho et al.,

2005). Asimismo, la curcumina previene la activación de JNK producida por agentes como PMA o TNF α en células Jurkat (Chen and Tan, 1998).

Asimismo, nuestros experimentos muestran que, a pesar de su acción prooxidante, la curcumina no estimula la activación de p38 en células U-937. Esto contrasta con previos resultados del laboratorio que mostraban que p38-MAPK puede ser activada de manera dependiente de ROS por otros agentes fenólicos, como genisteína, en células U-937 (Sanchez et al., 2008). Además, contrasta con observaciones en la literatura que muestran activación de p38 producida por curcumina en cáncer de ovario (Pan et al., 2008; Weir et al., 2007), en células de hepatoma (McNally et al., 2007) y en neutrófilos humanos (Hu et al., 2005). Una posible explicación para esta discrepancia es que la curcumina puede causar la desfosforilación de p38 vía activación de MAP quinasa fosfatasa-5 (MKP5), como se ha demostrado en células prostáticas (Nonn et al., 2007). De hecho, otros autores han demostrado que la curcumina produce una caída de los niveles de p38 en cáncer de mama (Squires et al., 2003), en células de osteoblastos de ratón (Miyahara et al., 2004), en colitis ulcerosa (Camacho-Barquero et al., 2007) y en queratinocitos humanos irradiados con UVB (Cho et al., 2005). Por todo ello, hay diferentes señales que pueden probablemente concurrir para definir el estado de activación de p38 en células tratadas con curcumina.

Nuestro trabajo demuestra que la curcumina estimula la fosforilación/activación de ERK en células mieloides, en oposición a lo que se conoce, por ejemplo en células de cáncer de mama, donde la curcumina inhibe la activación de ERK (Squires et al., 2003). Mediante el co-tratamiento con inhibidores farmacológicos de MEK/ERK observamos que la respuesta apoptótica no se ve afectada (curcumina más lonidamina) o fue algo potenciada (curcumina más ATO). Por ello, en estas condiciones experimentales, las ERK no intervienen o incluso tienen una ligera acción protectora y anti-apoptótica. Sin embargo, esto contrasta con la función pro-apoptótica de la activación de ERK provocada por curcumina y dependiente de ROS investigada en células tumorales cervicales humanas (Javvadi et al., 2008). Otros autores han visto inhibición de ERK provocada por curcumina en líneas de adenocarcinoma de páncreas (Lev-Ari et al., 2007)

Finalmente, la curcumina causa ligeramente desfosforilación/inactivación de Akt. La caída en los niveles de Akt es congruente con los resultados obtenidos con

agentes polifenólicos, los cuales suelen inhibir la vía PI3K/Akt, en otros diferentes sistemas celulares (Kang et al., 2011). Se ha encontrado que la curcumina inactiva Akt de manera mediada por ROS en células renales humanas (Woo et al., 2003), en cáncer de mama (Squires et al., 2003), en cáncer de ovario (Weir et al., 2007) y en linfoma de Burkitt (Squires et al., 2003). Dado que Akt es una quinasa protectora, su bajada puede explicar al menos en parte el incremento en toxicidad de ATO en el tratamiento combinado de curcumina con aquel. En efecto, el tratamiento con un inhibidor de la vía PI3K/Akt, LY294002, potencia la citotoxicidad de ATO, de curcumina y del co-tratamiento, por lo que podemos concluir que la curcumina mimetiza la acción de un inhibidor de la vía PI3K/Akt. Sin embargo, LY294002 no aumenta la toxicidad de lonidamina por sí sola, pero sí en combinación con curcumina. Esto puede deberse a que la curcumina de por sí ya es sensible al inhibidor de PI3K/Akt.

En resumen, la inhibición de Akt por parte de curcumina tendría una función protectora ya que los inhibidores de la quinasa incrementan la toxicidad.

El resveratrol tiene diferentes efectos sobre las quinasas.

En nuestros resultados, el resveratrol incrementa la activación de p38. Este dato es consistente con observaciones en la literatura de activación de p38 por el resveratrol en células de cáncer de mama MCF-7 (Filomeni et al., 2007; Zhang et al., 2011) y en células de cáncer de colon, donde el resveratrol incrementa su acción apoptótica en combinación con 5-FU a través de la activación de p38 (Mohapatra et al., 2011). Sin embargo, el resveratrol provoca inhibición de p38 en tumores de piel *in vivo* (George et al., 2011), en cáncer de hígado (Parekh et al., 2011) y en carcinoma hepatocelular Huh-7 (Liao et al., 2010).

Observamos que el resveratrol no modifica la activación de JNK, mientras que los co-tratamientos la disminuyen. En la literatura se encuentra que resveratrol produce inhibición de JNK en tumores de piel *in vivo* (George et al., 2011), mientras que otros autores observan incremento de JNK en células de cáncer de colon, donde se incrementa su acción apoptótica en combinación con 5-FU (Mohapatra et al., 2011). Ello no implica que JNK no tenga efecto modulador (al igual que el caso de curcumina) en nuestro sistema porque en un trabajo anterior se observó que cuando se inhiben los niveles basales de la quinasa mediante el inhibidor SP600125, se potencia la toxicidad de ATO (Ramos et al., 2006).

Por su parte, el resveratrol por sí solo y en combinación con ATO y lonidamina provoca la activación de ERK. Esta observación es congruente con la mayoría de estudios: el resveratrol activa ERK en células K562 (Della Ragione et al., 2002; Ragione et al., 2003), en neuroblastoma (Miloso et al., 1999), en líneas celulares epidérmicas de ratón o en líneas de cáncer de tiroides (Shih et al., 2002). Esta observación contrasta con lo observado por otros autores, que observan disminución de la activación de ERK por el resveratrol en modelos de carcinoma hepatocelular Huh-7 (Liao et al., 2010).

Finalmente, hemos observado que el co-tratamiento de resveratrol con lonidamina provoca la activación de Akt. Esto contrasta con observaciones en la literatura mostrando que el resveratrol por sí solo disminuye la activación de Akt, por ejemplo en cáncer de hígado (Parekh et al., 2011).

Cuando usamos inhibidores farmacológicos contra ERK y Akt observamos que la toxicidad de los co-tratamientos de resveratrol con ATO y lonidamina se incrementa (a excepción de una disminución de la apoptosis encontrada en el caso de la combinación de resveratrol con lonidamina). Por tanto, la activación de ERK y de Akt por parte del resveratrol no explicaría la potenciación de la toxicidad en los tratamientos combinados. Por el contrario, podría suceder que la activación de ambas quinasas actuaría impidiendo el exceso de toxicidad en los co-tratamientos.

Se midió la expresión del factor de transcripción NF- κ B, que, como ya se había comentado, normalmente tiene función anti-apoptótica. Los polifenoles suelen inhibir NF- κ B, lo cual podría ser una causa de su acción quimiosensibilizadora (Kang et al., 2011). Por ejemplo, algunos autores encuentran que la curcumina produce disminución de la activación de NF- κ B, a través de la inhibición del factor I κ B, en varios modelos como mieloma múltiple (Bharti et al., 2004), linfoma (Shishodia et al., 2005), melanoma (Marin et al., 2007), o carcinoma de cabeza y cuello (Aggarwal et al., 2004) y ello sería la causa de la acción pro-apoptótica del polifenol (como revisiones véanse (Lin, 2007; Reuter et al., 2008)).

Con la curcumina medimos la translocación de la subunidad p65- NF- κ B al núcleo y la unión de NF- κ B a su secuencia consenso. En las condiciones experimentales utilizadas, la curcumina no altera la activación de NF- κ B en células U-937, medida por estos dos parámetros. Esto no excluye que la curcumina pueda inhibir NF- κ B en otros

modelos o condiciones experimentales. Por ejemplo, nosotros hemos analizado la acción de la curcumina a las 14 horas de tratamiento, lo cual, aunque suficiente para potenciar la apoptosis en combinación con ATO, puede ser insuficiente para causar inactivación de NF- κ B. De hecho, el tratamiento de 14 horas es un período de tiempo más corto que el utilizado por otros autores para modular la actividad del NF- κ B por la curcumina (Lin et al., 2007) y con otros agentes tales como la genisteína (Banerjee et al., 2008; Singh et al., 2006). Además, se sabe que los polifenoles pueden prevenir la activación de NF- κ B producida por algunos agentes estresantes, como se ha demostrado con genisteína en combinación con radiación, cisplatino, etopósido y otras drogas antitumorales (Banerjee et al., 2008; Li et al., 2005; Singh et al., 2006). Sin embargo, el ATO no estimula NF- κ B en células leucémicas, como se muestra en este estudio y en otros trabajos precedentes (Amran et al., 2007; Lemarie et al., 2006). Por ello, podemos concluir que, en nuestras condiciones experimentales, al menos la iniciación de la muerte celular no es explicable por disminución de NF- κ B.

Con el resveratrol se midió solo la translocación de p65-NF- κ B al núcleo. Observamos que el co-tratamiento de resveratrol con lonidamina disminuye la translocación de NF- κ B. Ello podría contribuir a explicar el incremento en apoptosis en el co-tratamiento de resveratrol con lonidamina. Asimismo, se conoce que el resveratrol a una concentración de 50 μ M y a 4 horas de tratamiento inhibe NF- κ B en leucemia mieloide aguda (Estrov et al., 2003), y produce degradación de I κ B $_{\alpha}$ a través de la inhibición de I κ B, el complejo regulador clave necesario para la activación de NF- κ B en células U-937 (Estrov et al., 2003; Holmes-McNary and Baldwin, 2000). En la literatura se ha observado que el resveratrol previene la activación de NF- κ B producida por TNF $_{\alpha}$, PMA, lipopolisacáridos, H $_2$ O $_2$, ácido okadaico, ceramida, interleucina 1 y UVB en células U-937 (Manna et al., 2000).

Por último, se midió el efecto de resveratrol y curcumina sobre la actividad de Hsp-70, un factor anti-apoptótico, como se explicó en la Introducción.

En primer lugar, analizamos los efectos de ATO y lonidamina por sí solos sobre la expresión de Hsp-70. Observamos que el ATO incrementa la expresión de Hsp-70, lo cual es congruente con su propiedad de metaloide. Dada la función protectora de Hsp-70, su sobreexpresión podría tener la función de atenuar la excesiva toxicidad del ATO. Por el contrario, la lonidamina no altera la expresión de Hsp-70.

A continuación, se analizaron los efectos de curcumina y resveratrol, por sí solos y en combinación con ATO. Ambos polifenoles apenas modifican la expresión de Hsp-70, pero atenúan el incremento en la expresión por ATO. Esto es congruente con observaciones que indican que la curcumina inhibe la expresión de Hsp-70 en cáncer de próstata (Hung et al., 2012; Sood et al., 2012), en células gliales (Sood et al., 2012) o durante la génesis de cataratas. No obstante, se ha observado que la curcumina, a dosis superiores a las usadas en nuestro trabajo, produce un incremento en la expresión de Hsp-70 por sí sola en células leucémicas humanas (Teiten et al., 2009) y en combinación con ATO en carcinoma de colon (Chen et al., 2001). Asimismo, el resveratrol actúa inhibiendo Hsp-70 en células K562 (Banerjee Mustafi et al., 2010; Chakraborty et al., 2008). En efecto, el resveratrol produce una disminución de HSF-1 en el núcleo, así como de su actividad transcripcional y de la unión a su secuencia consenso, lo que produce una caída en los niveles de expresión de Hsp-70 (Chakraborty et al., 2008).

Sin embargo, es la primera observación en la literatura de disminución de Hsp-70 producida por el co-tratamiento de curcumina/resveratrol con ATO. Por ello, la inhibición de Hsp-70 puede contribuir a explicar la potenciación por curcumina y resveratrol de la apoptosis producida por ATO.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten alcanzar las siguientes conclusiones:

1.- Concentraciones subcitotóxicas de polifenoles con diferente estructura química son buenos quimiosensibilizadores, en conjunción con las drogas antitumorales mitocondrióticas trióxido de arsénico (ATO) y lonidamina. La quimiosensibilización se produce por un incremento en la eficacia apoptótica, sin que se produzcan alteraciones sensibles en el ciclo celular (salvo en el caso de genisteína y resveratrol). Los ensayos con curcumina y resveratrol demuestran que hay especificidad de tipo celular, ya que se observó en células mieloides agudas y hay escasa o nula eficacia en otros tipos celulares, y especificidad de droga, ya que no se encontró respuesta en combinación con drogas con diana en el DNA.

2.- Acorde con el carácter mitocondriótico de ATO y lonidamina, la apoptosis implica una activación de la vía intrínseca (mitocondrial), aunque el efecto de activación sobre otras vías de muerte celular no se puede excluir. Asimismo, hay una disfunción mitocondrial, medida por disminución del potencial de membrana, un evento concomitante a la apoptosis.

3.- Como normal general, la acción pro-apoptótica de los polifenoles está mediada por estrés oxidativo (sobrepoducción de ROS o caída en los niveles de GSH intracelular). Ello puede explicar la potenciación selectiva de la apoptosis por ATO y lonidamina, que son agentes sensibles a estrés oxidativo.

4.- La curcumina y el resveratrol producen patrones diversos de modificación de proteínas quinasas, cabiendo destacar:

- Inactivación de Akt por la curcumina, que puede favorecer su acción pro-apoptótica.
- Activación de ERK por la curcumina y de Akt y ERK por resveratrol, que actuaría atenuando su excesiva toxicidad.

5.- El resveratrol en combinación con la lonidamina disminuye la activación del factor de transcripción NF- κ B, lo cual, dado el carácter defensivo de este factor, podría explicar en parte el incremento de la apoptosis en el co-tratamiento.

6.- El ATO induce expresión de la proteína antiapoptótica Hsp-70, que es anulada por curcumina y resveratrol. Dado el carácter antiapoptótico de esta proteína, esto podría explicar en parte el incremento de apoptosis en los co-tratamientos.

7.- Estos resultados permiten postular que el co-tratamiento con curcumina y resveratrol y otros polifenoles puede representar una buena estrategia para incrementar la eficacia antileucémica de las drogas mitocondriotóxicas ATO y lonidamina, reduciendo sus dosis de aplicación a niveles clínicamente tolerables.

BIBLIOGRAFÍA

(2010). Resveratrol. Monograph. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* 15, 152-158.

Adrain, C., Slee, E.A., Harte, M.T., and Martin, S.J. (1999). Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J Biol Chem* 274, 20855-20860.

Agarwal, C., Tyagi, A., and Agarwal, R. (2006). Gallic acid causes inactivating phosphorylation of cdc25A/cdc25C-cdc2 via ATM-Chk2 activation, leading to cell cycle arrest, and induces apoptosis in human prostate carcinoma DU145 cells. *Mol Cancer Ther* 5, 3294-3302.

Aggarwal, B.B. (2008). The past, present and future of multi-targeted cancer treatment "naturally": food for thought. *Cancer Lett* 269, 187-188.

Aggarwal, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seeram, N.P., Shishodia, S., and Takada, Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 24, 2783-2840.

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

Aggarwal, B.B., Shishodia, S., Takada, Y., Banerjee, S., Newman, R.A., Bueso-Ramos, C.E., and Price, J.E. (2005). Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice. *Clin Cancer Res* 11, 7490-7498.

Aggarwal, B.B., Sundaram, C., Malani, N., and Ichikawa, H. (2007). Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol* 595, 1-75.

Aggarwal, S., Takada, Y., Singh, S., Myers, J.N., and Aggarwal, B.B. (2004). Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling. *Int J Cancer* 111, 679-692.

Ahmad, K.A., Clement, M.V., Hanif, I.M., and Pervaiz, S. (2004). Resveratrol inhibits drug-induced apoptosis in human leukemia cells by creating an intracellular milieu nonpermissive for death execution. *Cancer Res* 64, 1452-1459.

Ahmad, N., Cheng, P., and Mukhtar, H. (2000). Cell cycle dysregulation by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *Biochem Biophys Res Commun* 275, 328-334.

Ahmad, N., Feyes, D.K., Nieminen, A.L., Agarwal, R., and Mukhtar, H. (1997). Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 89, 1881-1886.

Aiyar, S.E., Park, H., Aldo, P.B., Mor, G., Gildea, J.J., Miller, A.L., Thompson, E.B., Castle, J.D., Kim, S., and Santen, R.J. (2010). TMS, a chemically modified herbal

derivative of resveratrol, induces cell death by targeting Bax. *Breast Cancer Res Treat* 124, 265-277.

Akao, Y., Mizoguchi, H., Kojima, S., Naoe, T., Ohishi, N., and Yagi, K. (1998). Arsenic induces apoptosis in B-cell leukaemic cell lines in vitro: activation of caspases and down-regulation of Bcl-2 protein. *Br J Haematol* 102, 1055-1060.

Akerfelt, M., Morimoto, R.I., and Sistonen, L. (2010). Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 545-555.

Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., and Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262, 5592-5595.

Altenburg, J.D., Bieberich, A.A., Terry, C., Harvey, K.A., Vanhorn, J.F., Xu, Z., Jo Davissou, V., and Siddiqui, R.A. (2011). A synergistic antiproliferation effect of curcumin and docosahexaenoic acid in SK-BR-3 breast cancer cells: unique signaling not explained by the effects of either compound alone. *BMC Cancer* 11, 149.

Amran, D., Sanchez, Y., Fernandez, C., Ramos, A.M., de Blas, E., Breard, J., Calle, C., and Aller, P. (2007). Arsenic trioxide sensitizes promonocytic leukemia cells to TNFalpha-induced apoptosis via p38-MAPK-regulated activation of both receptor-mediated and mitochondrial pathways. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1653-1663.

Amran, D., Sancho, P., Fernandez, C., Esteban, D., Ramos, A.M., de Blas, E., Gomez, M., Palacios, M.A., and Aller, P. (2005). Pharmacological inhibitors of extracellular signal-regulated protein kinases attenuate the apoptotic action of cisplatin in human myeloid leukemia cells via glutathione-independent reduction in intracellular drug accumulation. *Biochim Biophys Acta* 1743, 269-279.

Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Newman, R.A., and Aggarwal, B.B. (2007). Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm* 4, 807-818.

Anand, P., Sundaram, C., Jhurani, S., Kunnumakkara, A.B., and Aggarwal, B.B. (2008). Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer Lett* 267, 133-164.

Anckar, J., and Sistonen, L. (2011). Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annu Rev Biochem* 80, 1089-1115.

Anderson, P. (1997). Kinase cascades regulating entry into apoptosis. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 33-46.

Andjelkovic, T., Pesic, M., Bankovic, J., Tanic, N., Markovic, I.D., and Ruzdijic, S. (2008). Synergistic effects of the purine analog sulfinosine and curcumin on the multidrug resistant human non-small cell lung carcinoma cell line (NCI-H460/R). *Cancer Biol Ther* 7, 1024-1032.

- Andre, N., Rome, A., Carre, M., and Societe Francophone de Recherche en, P. (2006). [Antimitochondrial agents: a new class of anticancer agents]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* 13, 69-75.
- Arlt, A., and Schafer, H. (2002). NFkappaB-dependent chemoresistance in solid tumors. *Int J Clin Pharmacol Ther* 40, 336-347.
- Armstrong, J.S. (2006). Mitochondria: a target for cancer therapy. *Br J Pharmacol* 147, 239-248.
- Asou, H., Koshizuka, K., Kyo, T., Takata, N., Kamada, N., and Koeffler, H.P. (2002). Resveratrol, a natural product derived from grapes, is a new inducer of differentiation in human myeloid leukemias. *Int J Hematol* 75, 528-533.
- 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. *Toxicol Appl Pharmacol* 224, 274-283.
- Auclair, S., Silberberg, M., Gueux, E., Morand, C., Mazur, A., Milenkovic, D., and Scalbert, A. (2008). Apple polyphenols and fibers attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Agric Food Chem* 56, 5558-5563.
- Azam, S., Hadi, N., Khan, N.U., and Hadi, S.M. (2004). Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicol In Vitro* 18, 555-561.
- Babu, P.V., and Liu, D. (2008). Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr Med Chem* 15, 1840-1850.
- Bae, Y.S., Oh, H., Rhee, S.G., and Yoo, Y.D. (2011). Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells* 32, 491-509.
- Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L., and Korsmeyer, S.J. (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41, 899-906.
- Bailey, H.H. (1998). L-S,R-buthionine sulfoximine: historical development and clinical issues. *Chemico-biological interactions* 111-112, 239-254.
- Bandeled, O.J., and Osheroff, N. (2007). Bioflavonoids as poisons of human topoisomerase II alpha and II beta. *Biochemistry* 46, 6097-6108.
- Banerjee, M., Singh, P., and Panda, D. (2010). Curcumin suppresses the dynamic instability of microtubules, activates the mitotic checkpoint and induces apoptosis in MCF-7 cells. *FEBS J* 277, 3437-3448.

- Banerjee Mustafi, S., Chakraborty, P.K., and Raha, S. (2010). Modulation of Akt and ERK1/2 pathways by resveratrol in chronic myelogenous leukemia (CML) cells results in the downregulation of Hsp70. *PLoS One* 5, e8719.
- Banerjee, S., Li, Y., Wang, Z., and Sarkar, F.H. (2008). Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Lett* 269, 226-242.
- Barr, P.J., and Tomei, L.D. (1994). Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology (N Y)* 12, 487-493.
- Barros, L.F., Stutzin, A., Calixto, A., Catalan, M., Castro, J., Hetz, C., and Hermosilla, T. (2001). Nonselective cation channels as effectors of free radical-induced rat liver cell necrosis. *Hepatology* 33, 114-122.
- Basanez, G., Sharpe, J.C., Galanis, J., Brandt, T.B., Hardwick, J.M., and Zimmerberg, J. (2002). Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J Biol Chem* 277, 49360-49365.
- Basile, V., Ferrari, E., Lazzari, S., Belluti, S., Pignedoli, F., and Imbriano, C. (2009). Curcumin derivatives: molecular basis of their anti-cancer activity. *Biochem Pharmacol* 78, 1305-1315.
- Bass, D.A., Parce, J.W., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C., and Thomas, M. (1983). Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 130, 1910-1917.
- Baur, J.A., and Sinclair, D.A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5, 493-506.
- Bayet-Robert, M., Kwiatkowski, F., Leheurteur, M., Gachon, F., Planchat, E., Abrial, C., Mouret-Reynier, M.A., Durando, X., Barthomeuf, C., and Chollet, P. (2010). Phase I dose escalation trial of docetaxel plus curcumin in patients with advanced and metastatic breast cancer. *Cancer Biol Ther* 9, 8-14.
- Beg, A.A., and Baltimore, D. (1996). An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274, 782-784.
- Belzacq, A.S., El Hamel, C., Vieira, H.L., Cohen, I., Haouzi, D., Metivier, D., Marchetti, P., Brenner, C., and Kroemer, G. (2001). Adenine nucleotide translocator mediates the mitochondrial membrane permeabilization induced by lonidamine, arsenite and CD437. *Oncogene* 20, 7579-7587.
- Bellosillo, B., Villamor, N., Lopez-Guillermo, A., Marce, S., Bosch, F., Campo, E., Montserrat, E., and Colomer, D. (2002). Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of Bax and Bak in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100, 1810-1816.

Ben-Yoseph, O., Lyons, J.C., Song, C.W., and Ross, B.D. (1998). Mechanism of action of lonidamine in the 9L brain tumor model involves inhibition of lactate efflux and intracellular acidification. *J Neurooncol* 36, 149-157.

Benavente-Garcia, O., and Castillo, J. (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem* 56, 6185-6205.

Bengmark, S., Mesa, M.D., and Gil, A. (2009). Plant-derived health: the effects of turmeric and curcuminoids. *Nutr Hosp* 24, 273-281.

Bernardi, P., Scorrano, L., Colonna, R., Petronilli, V., and Di Lisa, F. (1999). Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 264, 687-701.

Beutner, G., Ruck, A., Riede, B., Welte, W., and Brdiczka, D. (1996). Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett* 396, 189-195.

Bharti, A.C., Shishodia, S., Reuben, J.M., Weber, D., Alexanian, R., Raj-Vadhan, S., Estrov, Z., Talpaz, M., and Aggarwal, B.B. (2004). Nuclear factor-kappaB and STAT3 are constitutively active in CD138+ cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis. *Blood* 103, 3175-3184.

Bhat, K.P., and Pezzuto, J.M. (2001). Resveratrol exhibits cytostatic and antiestrogenic properties with human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa) cells. *Cancer Res* 61, 6137-6144.

Bhullar, K.S., and Rupasinghe, H.P. (2013). Polyphenols: multipotent therapeutic agents in neurodegenerative diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013, 891748.

Bianchini, F., and Vainio, H. (2003). Wine and resveratrol: mechanisms of cancer prevention? *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation* 12, 417-425.

Biswas, S.K., McClure, D., Jimenez, L.A., Megson, I.L., and Rahman, I. (2005). Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibits NF-kappaB activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells: mechanism of free radical scavenging activity. *Antioxid Redox Signal* 7, 32-41.

Bobe, P., Bonardelle, D., Benihoud, K., Opolon, P., and Chelbi-Alix, M.K. (2006). Arsenic trioxide: A promising novel therapeutic agent for lymphoproliferative and autoimmune syndromes in MRL/lpr mice. *Blood* 108, 3967-3975.

Boonstra, J., and Post, J.A. (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337, 1-13.

Borlado, L.R., Redondo, C., Alvarez, B., Jimenez, C., Criado, L.M., Flores, J., Marcos, M.A., Martinez, A.C., Balomenos, D., and Carrera, A.C. (2000). Increased phosphoinositide 3-kinase activity induces a lymphoproliferative disorder and contributes to tumor generation in vivo. *FASEB J* 14, 895-903.

Bratton, S.B., Walker, G., Srinivasula, S.M., Sun, X.M., Butterworth, M., Alnemri, E.S., and Cohen, G.M. (2001). Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J* 20, 998-1009.

Brenner, C., and Grimm, S. (2006). The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene* 25, 4744-4756.

Brookes, P.S., Levonen, A.L., Shiva, S., Sarti, P., and Darley-Usmar, V.M. (2002). Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 33, 755-764.

Brown, C.R., Martin, R.L., Hansen, W.J., Beckmann, R.P., and Welch, W.J. (1993). The constitutive and stress inducible forms of hsp 70 exhibit functional similarities and interact with one another in an ATP-dependent fashion. *J Cell Biol* 120, 1101-1112.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.

Burdon, R.H. (1993). Heat shock proteins in relation to medicine. *Mol Aspects Med* 14, 83-165.

Burdon, R.H. (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 18, 775-794.

Buttke, T.M., and Sandstrom, P.A. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15, 7-10.

Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 58, 79-110.

Cai, J., Yang, J., and Jones, D.P. (1998). Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 1366, 139-149.

Cain, K., Bratton, S.B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D.G., Sun, X.M., and Cohen, G.M. (2000). Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* 275, 6067-6070.

Calvino, E., Estan, M.C., Simon, G.P., Sancho, P., Boyano-Adanez Mdel, C., de Blas, E., Breard, J., and Aller, P. (2011). Increased apoptotic efficacy of lonidamine plus arsenic trioxide combination in human leukemia cells. Reactive oxygen species generation and defensive protein kinase (MEK/ERK, Akt/mTOR) modulation. *Biochem Pharmacol* 82, 1619-1629.

Camacho-Barquero, L., Villegas, I., Sanchez-Calvo, J.M., Talero, E., Sanchez-Fidalgo, S., Motilva, V., and Alarcon de la Lastra, C. (2007). Curcumin, a Curcuma longa constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. *Int Immunopharmacol* 7, 333-342.

Cao, Y., Cao, R., and Brakenhielm, E. (2002). Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. *J Nutr Biochem* 13, 380-390.

Caputo, A., and Silvestrini, B. (1984). Lonidamine, a new approach to cancer therapy. *Oncology* 41 Suppl 1, 2-6.

Castello, L., and Tessitore, L. (2005). Resveratrol inhibits cell cycle progression in U937 cells. *Oncol Rep* 13, 133-137.

Cimino, S., Sortino, G., Favilla, V., Castelli, T., Madonia, M., Sansalone, S., Russo, G.I., and Morgia, G. (2012). Polyphenols: key issues involved in chemoprevention of prostate cancer. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012, 632959.

Cipak, L., Rauko, P., Miadokova, E., Cipakova, I., and Novotny, L. (2003). Effects of flavonoids on cisplatin-induced apoptosis of HL-60 and L1210 leukemia cells. *Leuk Res* 27, 65-72.

Clement, M.V., Hirpara, J.L., Chawdhury, S.H., and Pervaiz, S. (1998). Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood* 92, 996-1002.

Chakraborty, P.K., Mustafi, S.B., Ganguly, S., Chatterjee, M., and Raha, S. (2008). Resveratrol induces apoptosis in K562 (chronic myelogenous leukemia) cells by targeting a key survival protein, heat shock protein 70. *Cancer Sci* 99, 1109-1116.

Chambard, J.C., Lefloch, R., Pouyssegur, J., and Lenormand, P. (2007). ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1299-1310.

Chan, J.Y., Phoo, M.S., Clement, M.V., Pervaiz, S., and Lee, S.C. (2008). Resveratrol displays converse dose-related effects on 5-fluorouracil-evoked colon cancer cell apoptosis: the roles of caspase-6 and p53. *Cancer Biol Ther* 7, 1305-1312.

Chan, M.M., Soprano, K.J., Weinstein, K., and Fong, D. (2006a). Epigallocatechin-3-gallate delivers hydrogen peroxide to induce death of ovarian cancer cells and enhances their cisplatin susceptibility. *J Cell Physiol* 207, 389-396.

Chan, W.H., Wu, H.Y., and Chang, W.H. (2006). Dosage effects of curcumin on cell death types in a human osteoblast cell line. *Food Chem Toxicol* 44, 1362-1371.

Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59, 527-605.

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

Chanvorachote, P., Pongrakhananon, V., Wannachaiyasit, S., Luanpitpong, S., Rojanasakul, Y., and Nimmannit, U. (2009). Curcumin sensitizes lung cancer cells to cisplatin-induced apoptosis through superoxide anion-mediated Bcl-2 degradation. *Cancer Invest* 27, 624-635.

Chen, D., Chan, R., Waxman, S., and Jing, Y. (2006). Buthionine sulfoximine enhancement of arsenic trioxide-induced apoptosis in leukemia and lymphoma cells is mediated via activation of c-Jun NH2-terminal kinase and up-regulation of death receptors. *Cancer Res* 66, 11416-11423.

Chen, G.Q., Shi, X.G., Tang, W., Xiong, S.M., Zhu, J., Cai, X., Han, Z.G., Ni, J.H., Shi, G.Y., Jia, P.M., *et al.* (1997). Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As₂O₃ exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood* 89, 3345-3353.

Chen, G.Q., Zhu, J., Shi, X.G., Ni, J.H., Zhong, H.J., Si, G.Y., Jin, X.L., Tang, W., Li, X.S., Xiong, S.M., *et al.* (1996). In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. *Blood* 88, 1052-1061.

Chen, K.S., Hsiao, Y.C., Kuo, D.Y., Chou, M.C., Chu, S.C., Hsieh, Y.S., and Lin, T.H. (2009). Tannic acid-induced apoptosis and -enhanced sensitivity to arsenic trioxide in human leukemia HL-60 cells. *Leuk Res* 33, 297-307.

Chen, Y., Shu, W., Chen, W., Wu, Q., Liu, H., and Cui, G. (2007). Curcumin, both histone deacetylase and p300/CBP-specific inhibitor, represses the activity of nuclear factor kappa B and Notch 1 in Raji cells. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 101, 427-433.

Chen, Y.C., Tsai, S.H., Shen, S.C., Lin, J.K., and Lee, W.R. (2001). Alternative activation of extracellular signal-regulated protein kinases in curcumin and arsenite-induced HSP70 gene expression in human colorectal carcinoma cells. *Eur J Cell Biol* 80, 213-221.

Chen, Y.R., and Tan, T.H. (1998). Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene* 17, 173-178.

Cheng, A.L., Hsu, C.H., Lin, J.K., Hsu, M.M., Ho, Y.F., Shen, T.S., Ko, J.Y., Lin, J.T., Lin, B.R., Ming-Shiang, W., *et al.* (2001). Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res* 21, 2895-2900.

Chiang, H.L., Terlecky, S.R., Plant, C.P., and Dice, J.F. (1989). A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 246, 382-385.

Cho, J.W., Park, K., Kweon, G.R., Jang, B.C., Baek, W.K., Suh, M.H., Kim, C.W., Lee, K.S., and Suh, S.I. (2005). Curcumin inhibits the expression of COX-2 in UVB-

irradiated human keratinocytes (HaCaT) by inhibiting activation of AP-1: p38 MAP kinase and JNK as potential upstream targets. *Exp Mol Med* 37, 186-192.

Choi, Y.J., Park, J.W., Suh, S.I., Mun, K.C., Bae, J.H., Song, D.K., Kim, S.P., and Kwon, T.K. (2002). Arsenic trioxide-induced apoptosis in U937 cells involve generation of reactive oxygen species and inhibition of Akt. *Int J Oncol* 21, 603-610.

Chung, S., Yao, H., Caito, S., Hwang, J.W., Arunachalam, G., and Rahman, I. (2010). Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys* 501, 79-90.

Cobleigh, M.A. (2011). Other options in the treatment of advanced breast cancer. *Semin Oncol* 38 Suppl 2, S11-16.

Collins, S.J., Gallo, R.C., and Gallagher, R.E. (1977). Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* 270, 347-349.

Constantinou, A., Kiguchi, K., and Huberman, E. (1990). Induction of differentiation and DNA strand breakage in human HL-60 and K-562 leukemia cells by genistein. *Cancer Res* 50, 2618-2624.

Corcoran, A., and Cotter, T.G. (2013). Redox regulation of protein kinases. *FEBS J* 280, 1944-1965.

Costantini, P., Jacotot, E., Decaudin, D., and Kroemer, G. (2000). Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 92, 1042-1053.

Cotman, C.W., and Anderson, A.J. (1995). A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 10, 19-45.

Crissman, H.A., and Steinkamp, J.A. (1973). Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *J Cell Biol* 59, 766-771.

Cross, T.G., Scheel-Toellner, D., Henriquez, N.V., Deacon, E., Salmon, M., and Lord, J.M. (2000). Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res* 256, 34-41.

Cucciolla, V., Borriello, A., Oliva, A., Galletti, P., Zappia, V., and Della Ragione, F. (2007). Resveratrol: from basic science to the clinic. *Cell Cycle* 6, 2495-2510.

Cvitkovic, E. (1998). Cumulative toxicities from cisplatin therapy and current cytoprotective measures. *Cancer Treat Rev* 24, 265-281.

Dai, J., Weinberg, R.S., Waxman, S., and Jing, Y. (1999). Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. *Blood* 93, 268-277.

- Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.
- Davis, R.J. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268, 14553-14556.
- De Cesare, M., Pratesi, G., Giusti, A., Polizzi, D., and Zunino, F. (1998). Stimulation of the apoptotic response as a basis for the therapeutic synergism of lonidamine and cisplatin in combination in human tumour xenografts. *Br J Cancer* 77, 434-439.
- De Duve, C. (1963). The lysosome. *Scientific American* 208, 64-72.
- Della Ragione, F., Cucciolla, V., Criniti, V., Indaco, S., Borriello, A., and Zappia, V. (2002). Antioxidants induce different phenotypes by a distinct modulation of signal transduction. *FEBS Lett* 532, 289-294.
- De Martino, C., Battelli, T., Paggi, M.G., Nista, A., Marcante, M.L., D'Atri, S., Malorni, W., Gallo, M., and Floridi, A. (1984). Effects of Lonidamine on murine and human tumor cells in vitro. A morphological and biochemical study. *Oncology* 41 Suppl 1, 15-29.
- de The, H., Vivanco-Ruiz, M.M., Tiollais, P., Stunnenberg, H., and Dejean, A. (1990). Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. *Nature* 343, 177-180.
- Deeb, D.D., Jiang, H., Gao, X., Divine, G., Dulchavsky, S.A., and Gautam, S.C. (2005). Chemosensitization of hormone-refractory prostate cancer cells by curcumin to TRAIL-induced apoptosis. *Journal of experimental therapeutics & oncology* 5, 81-91.
- Dhanasekaran, D.N., and Reddy, E.P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27, 6245-6251.
- Di Cosimo, S., Ferretti, G., Papaldo, P., Carlini, P., Fabi, A., and Cognetti, F. (2003). Lonidamine: efficacy and safety in clinical trials for the treatment of solid tumors. *Drugs of today* 39, 157-174.
- Dickinson, D.A., Iles, K.E., Zhang, H., Blank, V., and Forman, H.J. (2003). Curcumin alters EpRE and AP-1 binding complexes and elevates glutamate-cysteine ligase gene expression. *FASEB J* 17, 473-475.
- Diaz, Z., Colombo, M., Mann, K.K., Su, H., Smith, K.N., Bohle, D.S., Schipper, H.M., and Miller, W.H., Jr. (2005). Trolox selectively enhances arsenic-mediated oxidative stress and apoptosis in APL and other malignant cell lines. *Blood* 105, 1237-1245.
- Diaz, Z., Mann, K.K., Marcoux, S., Kourelis, M., Colombo, M., Komarnitsky, P.B., and Miller, W.H., Jr. (2008). A novel arsenical has antitumor activity toward As2O3-resistant and MRP1/ABCC1-overexpressing cell lines. *Leukemia* 22, 1853-1863.

- Ding, W.X., Ni, H.M., DiFrancesca, D., Stolz, D.B., and Yin, X.M. (2004). Bid-dependent generation of oxygen radicals promotes death receptor activation-induced apoptosis in murine hepatocytes. *Hepatology* 40, 403-413.
- Ding, Y., Yao, H., Yao, Y., Fai, L.Y., and Zhang, Z. (2013). Protection of Dietary Polyphenols against Oral Cancer. *Nutrients* 5, 2173-2191.
- Dixon, R.A., and Ferreira, D. (2002). Genistein. *Phytochemistry* 60, 205-211.
- Dolado, I., Swat, A., Ajenjo, N., De Vita, G., Cuadrado, A., and Nebreda, A.R. (2007). p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell* 11, 191-205.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95.
- Drose, S., and Brandt, U. (2012). Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol* 748, 145-169.
- Dorrie, J., Gerauer, H., Wachter, Y., and Zunino, S.J. (2001). Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Res* 61, 4731-4739.
- Duthie, G., and Crozier, A. (2000). Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3, 447-451.
- Duvoix, A., Morceau, F., Schnekenburger, M., Delhalle, S., Galteau, M.M., Dicato, M., and Diederich, M. (2003). Curcumin-induced cell death in two leukemia cell lines: K562 and Jurkat. *Ann N Y Acad Sci* 1010, 389-392.
- Eguchi, Y., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. (1997). Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57, 1835-1840.
- Ellis, R.J. (2006). Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding. *Trends Biochem Sci* 31, 395-401.
- Espin, J.C., Garcia-Conesa, M.T., and Tomas-Barberan, F.A. (2007). Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry* 68, 2986-3008.
- Esposti, M.D. (2002). The roles of Bid. *Apoptosis* 7, 433-440.
- Estrov, Z., Shishodia, S., Faderl, S., Harris, D., Van, Q., Kantarjian, H.M., Talpaz, M., and Aggarwal, B.B. (2003). Resveratrol blocks interleukin-1beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kappaB, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Blood* 102, 987-995.
- Evans, C.G., Chang, L., and Gestwicki, J.E. (2010). Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. *J Med Chem* 53, 4585-4602.

- Evens, A.M., Tallman, M.S., and Gartenhaus, R.B. (2004). The potential of arsenic trioxide in the treatment of malignant disease: past, present, and future. *Leuk Res* 28, 891-900.
- Evertts, A.G., and Coller, H.A. (2012). Back to the origin: reconsidering replication, transcription, epigenetics, and cell cycle control. *Genes Cancer* 3, 678-696.
- Ezoe, S. (2012). Secondary leukemia associated with the anti-cancer agent, etoposide, a topoisomerase II inhibitor. *International journal of environmental research and public health* 9, 2444-2453.
- Fadok, V.A., Savill, J.S., Haslett, C., Bratton, D.L., Doherty, D.E., Campbell, P.A., and Henson, P.M. (1992). Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 149, 4029-4035.
- Fan, L.P., Shen, J.Z., Fu, H.Y., Zhou, H.R., Shen, S.F., and Yu, A.F. (2010). [Effect of epigallocatechin-3-galate on human acute monocytic leukemia cell line U937 and its relevant mechanism]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 18, 286-290.
- Fantin, V.R., and Leder, P. (2006). Mitochondriotoxic compounds for cancer therapy. *Oncogene* 25, 4787-4797.
- Fariied, A., Kurnia, D., Fariied, L.S., Usman, N., Miyazaki, T., Kato, H., and Kuwano, H. (2007). Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. *Int J Oncol* 30, 605-613.
- Fernandez, C., Ramos, A.M., Sancho, P., Amran, D., de Blas, E., and Aller, P. (2004). 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate may both potentiate and decrease the generation of apoptosis by the antileukemic agent arsenic trioxide in human promonocytic cells. Regulation by extracellular signal-regulated protein kinases and glutathione. *J Biol Chem* 279, 3877-3884.
- Fernandez-Checa, J.C., and Kaplowitz, N. (1990). The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis. *Anal Biochem* 190, 212-219.
- Ferry, D.R., Smith, A., Malkhandi, J., Fyfe, D.W., deTakats, P.G., Anderson, D., Baker, J., and Kerr, D.J. (1996). Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res* 2, 659-668.
- Festjens, N., Kalai, M., Smet, J., Meeus, A., Van Coster, R., Saelens, X., and Vandenberghe, P. (2006). Butylated hydroxyanisole is more than a reactive oxygen species scavenger. *Cell Death Differ* 13, 166-169.
- Fielding, A.K. (2011). Current treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program* 2011, 231-237.

Fil'chenkov, O.O., and Zavelevych, M.P. (2009). [Comparative effects of flavonoids on cell cycle passage and apoptosis induction in human acute lymphoblastic leukemia MT-4 cells]. *Ukr Biokhim Zh* 81, 33-39.

Filomeni, G., Graziani, I., Rotilio, G., and Ciriolo, M.R. (2007). trans-Resveratrol induces apoptosis in human breast cancer cells MCF-7 by the activation of MAP kinases pathways. *Genes & nutrition* 2, 295-305.

Fontecave, M., Lepoivre, M., Elleingand, E., Gerez, C., and Guittet, O. (1998). Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett* 421, 277-279.

Freshney RI (1987). *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. Alan R. Liss, New York, 2^a ed.

Fridrich, D., Teller, N., Esselen, M., Pahlke, G., and Marko, D. (2008). Comparison of delphinidin, quercetin and (-)-epigallocatechin-3-gallate as inhibitors of the EGFR and the ErbB2 receptor phosphorylation. *Mol Nutr Food Res* 52, 815-822.

Fukushima, T., Kawabata, H., Sawaki, T., Satoh, T., Nakamura, T., Iwao, H., Nakajima, A., Sakai, T., Miki, M., Fujita, Y., *et al.* (2012). Low-dose cytarabine plus aclarubicin for patients with previously untreated acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome ineligible for standard-dose cytarabine plus anthracycline. *Anticancer Res* 32, 1347-1353.

Fulda, S., and Debatin, K.M. (2004). Sensitization for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Cancer Res* 64, 337-346.

Fulda, S., and Debatin, K.M. (2006a). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25, 4798-4811.

Fulda, S., and Debatin, K.M. (2006b). Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review. *Cancer detection and prevention* 30, 217-223.

Galan, A., Garcia-Bermejo, M.L., Troyano, A., Vilaboa, N.E., de Blas, E., Kazanietz, M.G., and Aller, P. (2000). Stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is an early regulatory event for the cadmium-induced apoptosis in human promonocytic cells. *J Biol Chem* 275, 11418-11424.

Galati, G., and O'Brien, P.J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med* 37, 287-303.

Galati, G., Teng, S., Moridani, M.Y., Chan, T.S., and O'Brien, P.J. (2000). Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. *Drug Metabol Drug Interact* 17, 311-349.

Gao, W., Chan, J.Y., Wei, W.I., and Wong, T.S. (2012). Anti-cancer effects of curcumin on head and neck cancers. *Anticancer Agents Med Chem* 12, 1110-1116.

Garcia-Vargas, G.G., and Hernandez-Zavala, A. (1996). Urinary porphyrins and heme biosynthetic enzyme activities measured by HPLC in arsenic toxicity. *Biomedical chromatography : BMC* 10, 278-284.

Gautam, S.C., Gao, X., and Dulchavsky, S. (2007). Immunomodulation by curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595, 321-341.

George, J., Singh, M., Srivastava, A.K., Bhui, K., Roy, P., Chaturvedi, P.K., and Shukla, Y. (2011). Resveratrol and black tea polyphenol combination synergistically suppress mouse skin tumors growth by inhibition of activated MAPKs and p53. *PLoS One* 6, e23395

Giafis, N., Katsoulidis, E., Sassano, A., Tallman, M.S., Higgins, L.S., Nebreda, A.R., Davis, R.J., and Plataniias, L.C. (2006). Role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the generation of arsenic trioxide-dependent cellular responses. *Cancer Res* 66, 6763-6771.

Ghosh, S., and Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 *Suppl*, S81-96.

Gogvadze, V., Robertson, J.D., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2001). Cytochrome c release occurs via Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent mechanisms that are regulated by Bax. *J Biol Chem* 276, 19066-19071.

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*.

Gordon, L. (2005). A green tea component, catechin, rapidly induces apoptosis of myeloid leukemic cells via modulation of reactive oxygen species production in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Haematologica* 90, 290.

Gossner, G., Choi, M., Tan, L., Fogoros, S., Griffith, K.A., Kuenker, M., and Liu, J.R. (2007). Genistein-induced apoptosis and autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 105, 23-30.

Grad, J.M., Cepero, E., and Boise, L.H. (2001). Mitochondria as targets for established and novel anti-cancer agents. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 4, 85-91.

Granado-Serrano, A.B., Martin, M.A., Bravo, L., Goya, L., and Ramos, S. (2006). Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J Nutr* 136, 2715-2721.

Green, D.R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629.

Green, D.R., and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.

Grimm, S., and Brdiczka, D. (2007). The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis* 12, 841-855.

Gross, A., Jockel, J., Wei, M.C., and Korsmeyer, S.J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 17, 3878-3885.

Guarente, L. (2005). Calorie restriction and SIR2 genes--towards a mechanism. *Mechanisms of ageing and development* 126, 923-928.

Guenal, I., Sidoti-de Fraisse, C., Gaumer, S., and Mignotte, B. (1997). Bcl-2 and Hsp27 act at different levels to suppress programmed cell death. *Oncogene* 15, 347-360.

Guha, P., Dey, A., Dhyani, M.V., Sen, R., Chatterjee, M., Chattopadhyay, S., and Bandyopadhyay, S.K. (2010). Calpain and caspase orchestrated death signal to accomplish apoptosis induced by resveratrol and its novel analog hydroxystilbene-1 [correction of hydroxystilbene-1] in cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 334, 381-394.

Guha, P., Dey, A., Sen, R., Chatterjee, M., Chattopadhyay, S., and Bandyopadhyay, S.K. (2011). Intracellular GSH depletion triggered mitochondrial Bax translocation to accomplish resveratrol-induced apoptosis in the U937 cell line. *J Pharmacol Exp Ther* 336, 206-214.

Guidez, F., Li, A.C., Horvai, A., Welch, J.S., and Glass, C.K. (1998). Differential utilization of Ras signaling pathways by macrophage colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte-macrophage CSF receptors during macrophage differentiation. *Mol Cell Biol* 18, 3851-3861.

Gupta, S., Ahmad, N., Nieminen, A.L., and Mukhtar, H. (2000). Growth inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate in androgen-sensitive and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 164, 82-90.

Gupta, S.C., Kannappan, R., Reuter, S., Kim, J.H., and Aggarwal, B.B. (2011). Chemosensitization of tumors by resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 1215, 150-160.

Gupta, S.C., Patchva, S., Koh, W., and Aggarwal, B.B. (2012a). Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39, 283-299.

Gupta, S.C., Sung, B., Kim, J.H., Prasad, S., Li, S., and Aggarwal, B.B. (2012b). Multitargeting by turmeric, the golden spice: From kitchen to clinic. *Mol Nutr Food Res*.

- Hagemann, C., and Blank, J.L. (2001). The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal* 13, 863-875.
- Hampton, M.B., and Orrenius, S. (1997). Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett* 414, 552-556.
- Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., and Ulevitch, R.J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265, 808-811.
- Han, Y.H., Kim, S.Z., Kim, S.H., and Park, W.H. (2008a). Arsenic trioxide inhibits the growth of Calu-6 cells via inducing a G2 arrest of the cell cycle and apoptosis accompanied with the depletion of GSH. *Cancer Lett* 270, 40-55.
- Han, Y.H., Kim, S.Z., Kim, S.H., and Park, W.H. (2008b). Suppression of arsenic trioxide-induced apoptosis in HeLa cells by N-acetylcysteine. *Mol Cells* 26, 18-25.
- 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.
- Hancock, J.T., Desikan, R., and Neill, S.J. (2001). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 29, 345-350.
- Hande, K.R. (1998). Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* 34, 1514-1521.
- Hartmann, J.T., and Lipp, H.P. (2003). Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin Pharmacother* 4, 889-901.
- Hartwell, L.H., and Weinert, T.A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629-634.
- Hatcher, H., Planalp, R., Cho, J., Torti, F.M., and Torti, S.V. (2008). Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol Life Sci* 65, 1631-1652.
- Hayakawa, J., Ohmichi, M., Kurachi, H., Ikegami, H., Kimura, A., Matsuoka, T., Jikihara, H., Mercola, D., and Murata, Y. (1999). Inhibition of extracellular signal-regulated protein kinase or c-Jun N-terminal protein kinase cascade, differentially activated by cisplatin, sensitizes human ovarian cancer cell line. *J Biol Chem* 274, 31648-31654.
- He, L., and Lemasters, J.J. (2002). Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? *FEBS Lett* 512, 1-7.
- Hendrick, J.P., and Hartl, F.U. (1995). The role of molecular chaperones in protein folding. *FASEB J* 9, 1559-1569.

- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Hickman, J.A. (1992). Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev* 11, 121-139.
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-251.
- Holmes-McNary, M., and Baldwin, A.S., Jr. (2000). Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I κ B kinase. *Cancer Res* 60, 3477-3483.
- Hsu, C.H., and Cheng, A.L. (2007). Clinical studies with curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595, 471-480.
- Hu, M., Du, Q., Vancurova, I., Lin, X., Miller, E.J., Simms, H.H., and Wang, P. (2005). Proapoptotic effect of curcumin on human neutrophils: activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Crit Care Med* 33, 2571-2578.
- Hu, M.L. (2011). Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. *Chang Gung Med J* 34, 449-460.
- Hu, Y., Sun, C.Y., Huang, J., Hong, L., Zhang, L., and Chu, Z.B. (2007). Antimyeloma effects of resveratrol through inhibition of angiogenesis. *Chin Med J (Engl)* 120, 1672-1677.
- Huang, P., Feng, L., Oldham, E.A., Keating, M.J., and Plunkett, W. (2000). Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature* 407, 390-395.
- Huang, R.P., Wu, J.X., Fan, Y., and Adamson, E.D. (1996). UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates. *J Cell Biol* 133, 211-220.
- Hung, C.M., Su, Y.H., Lin, H.Y., Lin, J.N., Liu, L.C., Ho, C.T., and Way, T.D. (2012). Demethoxycurcumin Modulates Prostate Cancer Cell Proliferation via AMPK-Induced Down-regulation of HSP70 and EGFR. *J Agric Food Chem*.
- Hung, S.P., Hsu, J.R., Lo, C.P., Huang, H.J., Wang, J.P., and Chen, S.T. (2005). Genistein-induced neuronal differentiation is associated with activation of extracellular signal-regulated kinases and upregulation of p21 and N-cadherin. *J Cell Biochem* 96, 1061-1070.
- Hunger, S.P. (2011). Tyrosine kinase inhibitor use in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic anemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program 2011*, 361-365.
- Hunter, A.M., LaCasse, E.C., and Korneluk, R.G. (2007). The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* 12, 1543-1568.

Huot, J., Houle, F., Rousseau, S., Deschesnes, R.G., Shah, G.M., and Landry, J. (1998). SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *J Cell Biol* 143, 1361-1373.

Hwang, J.T., Ha, J., and Park, O.J. (2005). Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 332, 433-440.

Hwang, J.T., Ha, J., Park, I.J., Lee, S.K., Baik, H.W., Kim, Y.M., and Park, O.J. (2007). Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Lett* 247, 115-121.

Hwang, J.T., Park, I.J., Shin, J.I., Lee, Y.K., Lee, S.K., Baik, H.W., Ha, J., and Park, O.J. (2005). Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 694-699.

Inoue, M., Sakaguchi, N., Isuzugawa, K., Tani, H., and Ogihara, Y. (2000). Role of reactive oxygen species in gallic acid-induced apoptosis. *Biol Pharm Bull* 23, 1153-1157.

Inoue, M., Suzuki, R., Koide, T., Sakaguchi, N., Ogihara, Y., and Yabu, Y. (1994). Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. *Biochem Biophys Res Commun* 204, 898-904.

Inoue, M., Suzuki, R., Sakaguchi, N., Li, Z., Takeda, T., Ogihara, Y., Jiang, B.Y., and Chen, Y. (1995). Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. *Biol Pharm Bull* 18, 1526-1530.

Ionkova, I. (2011). Anticancer lignans--from discovery to biotechnology. *Mini reviews in medicinal chemistry* 11, 843-856.

Ivanov, V.N., Partridge, M.A., Johnson, G.E., Huang, S.X., Zhou, H., and Hei, T.K. (2008). Resveratrol sensitizes melanomas to TRAIL through modulation of antiapoptotic gene expression. *Exp Cell Res* 314, 1163-1176.

Jakubowicz-Gil, J., Paduch, R., Piersiak, T., Glowniak, K., Gawron, A., and Kandeferszerszen, M. (2005). The effect of quercetin on pro-apoptotic activity of cisplatin in HeLa cells. *Biochem Pharmacol* 69, 1343-1350.

Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., *et al.* (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275, 218-220.

Jang, M., and Pezzuto, J.M. (1999). Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Drugs under experimental and clinical research* 25, 65-77.

Jaruga, E., Salvioli, S., Dobrucki, J., Chrul, S., Bandorowicz-Pikula, J., Sikora, E., Franceschi, C., Cossarizza, A., and Bartosz, G. (1998). Apoptosis-like, reversible changes in plasma membrane asymmetry and permeability, and transient modifications in mitochondrial membrane potential induced by curcumin in rat thymocytes. *FEBS Lett* 433, 287-293.

Javvadi, P., Segan, A.T., Tuttle, S.W., and Koumenis, C. (2008). The chemopreventive agent curcumin is a potent radiosensitizer of human cervical tumor cells via increased reactive oxygen species production and overactivation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Pharmacol* 73, 1491-1501.

Jazirehi, A.R., and Bonavida, B. (2004). Resveratrol modifies the expression of apoptotic regulatory proteins and sensitizes non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 3, 71-84.

Jiang, H., Ma, Y., Chen, X., Pan, S., Sun, B., Krissansen, G.W., and Sun, X. (2010). Genistein synergizes with arsenic trioxide to suppress human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 101, 975-983.

Jin, Z., and El-Deiry, W.S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4, 139-163.

Jing, Y. (2004). The PML-RARalpha fusion protein and targeted therapy for acute promyelocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 45(4), 639-648.

Jing, Y., Dai, J., Chalmers-Redman, R.M., Tatton, W.G., and Waxman, S. (1999). Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway. *Blood* 94, 2102-2111.

Jing, Y., and Waxman, S. (1995). Structural requirements for differentiation-induction and growth-inhibition of mouse erythroleukemia cells by isoflavones. *Anticancer Res* 15, 1147-1152.

Juan, M.E., Wenzel, U., Daniel, H., and Planas, J.M. (2008). Resveratrol induces apoptosis through ROS-dependent mitochondria pathway in HT-29 human colorectal carcinoma cells. *J Agric Food Chem* 56, 4813-4818.

Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., and Reed, J.C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4997-5002.

Jurivich, D.A., Sistonen, L., Kroes, R.A., and Morimoto, R.I. (1992). Effect of sodium salicylate on the human heat shock response. *Science* 255, 1243-1245.

Kachadourian, R., and Day, B.J. (2006). Flavonoid-induced glutathione depletion: potential implications for cancer treatment. *Free Radic Biol Med* 41, 65-76.

Kachadourian, R., Leitner, H.M., and Day, B.J. (2007). Selected flavonoids potentiate the toxicity of cisplatin in human lung adenocarcinoma cells: a role for glutathione depletion. *Int J Oncol* 31, 161-168.

Kane, L.P., Shapiro, V.S., Stokoe, D., and Weiss, A. (1999). Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 9, 601-604.

Kang, C.D., Do, I.R., Kim, K.W., Ahn, B.K., Kim, S.H., Chung, B.S., Jhun, B.H., and Yoo, M.A. (1999). Role of Ras/ERK-dependent pathway in the erythroid differentiation of K562 cells. *Exp Mol Med* 31, 76-82.

Kang, N.J., Shin, S.H., Lee, H.J., and Lee, K.W. (2011). Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacol Ther* 130, 310-324.

Kanno, S., Tomizawa, A., Hiura, T., Osanai, Y., Shouji, A., Ujibe, M., Ohtake, T., Kimura, K., and Ishikawa, M. (2005). Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. *Biol Pharm Bull* 28, 527-530.

Kanno, S., Tomizawa, A., Ohtake, T., Koiwai, K., Ujibe, M., and Ishikawa, M. (2006). Naringenin-induced apoptosis via activation of NF-kappaB and necrosis involving the loss of ATP in human promyeloleukemia HL-60 cells. *Toxicol Lett* 166, 131-139.

Karunagaran, D., Joseph, J., and Kumar, T.R. (2007). Cell growth regulation. *Adv Exp Med Biol* 595, 245-268.

Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9, 240-246.

Kawada, M., Ohno, Y., Ri, Y., Ikoma, T., Yuugetu, H., Asai, T., Watanabe, M., Yasuda, N., Akao, S., Takemura, G., *et al.* (2001). Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anti-cancer drugs* 12, 847-852.

Kelkel, M., Jacob, C., Dicato, M., and Diederich, M. (2010). Potential of the dietary antioxidants resveratrol and curcumin in prevention and treatment of hematologic malignancies. *Molecules* 15, 7035-7074.

Khar, A., Ali, A.M., Pardhasaradhi, B.V., Begum, Z., and Anjum, R. (1999). Antitumor activity of curcumin is mediated through the induction of apoptosis in AK-5 tumor cells. *FEBS Lett* 445, 165-168.

Kiang, J.G. (2003). Genistein inhibits herbimycin A-induced over-expression of inducible heat shock protein 70 kDa. *Mol Cell Biochem* 245, 191-199.

Kikuchi, H., Kuribayashi, F., Kiwaki, N., and Nakayama, T. (2010). Curcumin dramatically enhances retinoic acid-induced superoxide generating activity via accumulation of p47-phox and p67-phox proteins in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 395, 61-65.

Kim, J.W., Lee, H.J., Yi, H.G., Kim, B.S., Bang, S.M., Kim, J.S., Kim, I., Yoon, S.S., Lee, J.S., Kim, C.S., *et al.* (2012). Mitoxantrone, etoposide, cytarabine, and melphalan (NEAM) followed by autologous stem cell transplantation for patients with chemosensitive aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Am J Hematol* 87, 479-483.

Kim, S.H., Jun, C.D., Suk, K., Choi, B.J., Lim, H., Park, S., Lee, S.H., Shin, H.Y., Kim, D.K., and Shin, T.Y. (2006). Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicol Sci* 91, 123-131.

Kinningham, K.K., Oberley, T.D., Lin, S., Mattingly, C.A., and St Clair, D.K. (1999). Overexpression of manganese superoxide dismutase protects against mitochondrial-initiated poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cell death. *FASEB J* 13, 1601-1610.

Koishi, M., Hosokawa, N., Sato, M., Nakai, A., Hirayoshi, K., Hiraoka, M., Abe, M., and Nagata, K. (1992). Quercetin, an inhibitor of heat shock protein synthesis, inhibits the acquisition of thermotolerance in a human colon carcinoma cell line. *Japanese journal of cancer research : Gann* 83, 1216-1222.

Konig, A., Wrazel, L., Warrell, R.P., Jr., Rivi, R., Pandolfi, P.P., Jakubowski, A., and Gabrilove, J.L. (1997). Comparative activity of melarsoprol and arsenic trioxide in chronic B-cell leukemia lines. *Blood* 90, 562-570.

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.

Kroemer, G. (1998). The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ* 5, 547.

Kroemer, G. (2002). Introduction: mitochondrial control of apoptosis. *Biochimie* 84, 103-104.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., *et al.* (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16, 3-11.

Kroemer, G., Zamzami, N., and Susin, S.A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18, 44-51.

Kubota, T., Uemura, Y., Kobayashi, M., and Taguchi, H. (2003). Combined effects of resveratrol and paclitaxel on lung cancer cells. *Anticancer Res* 23, 4039-4046.

Kumi-Diaka, J., Merchant, K., Haces, A., Hormann, V., and Johnson, M. (2010). Genistein-selenium combination induces growth arrest in prostate cancer cells. *J Med Food* 13, 842-850.

Kunnumakkara, A.B., Anand, P., and Aggarwal, B.B. (2008). Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett* 269, 199-225.

Kuo, M.L., Huang, T.S., and Lin, J.K. (1996). Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 1317, 95-100.

Kuo, P.C., Liu, H.F., and Chao, J.I. (2004). Survivin and p53 modulate quercetin-induced cell growth inhibition and apoptosis in human lung carcinoma cells. *J Biol Chem* 279, 55875-55885.

Kurata, S. (2000). Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress. *J Biol Chem* 275, 23413-23416.

Labieniec, M., and Gabryelak, T. (2006). Oxidatively modified proteins and DNA in digestive gland cells of the fresh-water mussel *Unio tumidus* in the presence of tannic acid and its derivatives. *Mutation research* 603, 48-55.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lallemant-Breitenbach, V., Zhu, J., Chen, Z., and de The, H. (2012). Curing APL through PML/RARA degradation by As₂O₃. *Trends in molecular medicine* 18, 36-42.

Lam, W.H., Kazi, A., Kuhn, D.J., Chow, L.M., Chan, A.S., Dou, Q.P., and Chan, T.H. (2004). A potential prodrug for a green tea polyphenol proteasome inhibitor: evaluation of the peracetate ester of (-)-epigallocatechin gallate [(-)-EGCG]. *Bioorg Med Chem* 12, 5587-5593.

Lampson, L.A., and Levy, R. (1980). Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J Immunol* 125, 293-299.

Lanotte, M., Martin-Thouvenin, V., Najman, S., Balerini, P., Valensi, F., and Berger, R. (1991). NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood* 77, 1080-1086.

Larochette, N., Decaudin, D., Jacotot, E., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S.A., Zamzami, N., Xie, Z., Reed, J., and Kroemer, G. (1999). Arsenite induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Exp Cell Res* 249, 413-421.

Larrosa, M., Tomas-Barberan, F.A., and Espin, J.C. (2003). Grape polyphenol resveratrol and the related molecule 4-hydroxystilbene induce growth inhibition, apoptosis, S-phase arrest, and upregulation of cyclins A, E, and B1 in human SK-Mel-28 melanoma cells. *J Agric Food Chem* 51, 4576-4584.

Le Bras, M., Borgne-Sanchez, A., Touat, Z., El Dein, O.S., Deniaud, A., Maillier, E., Lecellier, G., Rebouillat, D., Lemaire, C., Kroemer, G., *et al.* (2006).

Chemosensitization by knockdown of adenine nucleotide translocase-2. *Cancer Res* 66, 9143-9152.

Ledda-Columbano, G.M., Coni, P., Curto, M., Giacomini, L., Faa, G., Oliverio, S., Piacentini, M., and Columbano, A. (1991). Induction of two different modes of cell death, apoptosis and necrosis, in rat liver after a single dose of thioacetamide. *Am J Pathol* 139, 1099-1109.

Lee, J., Giordano, S., and Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J* 441, 523-5.

Lee, K.T., Sohn, I.C., Kim, Y.K., Choi, J.H., Choi, J.W., Park, H.J., Itoh, Y., and Miyamoto, K. (2001). Tectorigenin, an isoflavone of *Pueraria thunbergiana* Benth., induces differentiation and apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biol Pharm Bull* 24, 1117-1121.

Lee, S.K., Zhang, W., and Sanderson, B.J. (2008). Selective growth inhibition of human leukemia and human lymphoblastoid cells by resveratrol via cell cycle arrest and apoptosis induction. *J Agric Food Chem* 56, 7572-7577.

Lee, T.C., Cheng, I.C., Shue, J.J., and Wang, T.C. (2011). Cytotoxicity of arsenic trioxide is enhanced by (-)-epigallocatechin-3-gallate via suppression of ferritin in cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 250, 69-77.

Leist, M., and Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 589-598.

Lemarie, A., Morzadec, C., Merino, D., Micheau, O., Fardel, O., and Vernhet, L. (2006). Arsenic trioxide induces apoptosis of human monocytes during macrophagic differentiation through nuclear factor-kappaB-related survival pathway down-regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 316, 304-314.

Lemasters, J.J. (1999). V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* 276, G1-6.

Lemasters, J.J., Nieminen, A.L., Qian, T., Trost, L.C., Elmore, S.P., Nishimura, Y., Crowe, R.A., Cascio, W.E., Bradham, C.A., Brenner, D.A., *et al.* (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1366, 177-196.

Lena, A., Rechichi, M., Salvetti, A., Bartoli, B., Vecchio, D., Scarcelli, V., Amoroso, R., Benvenuti, L., Gagliardi, R., Gremigni, V., *et al.* (2009). Drugs targeting the mitochondrial pore act as cytotoxic and cytostatic agents in temozolomide-resistant glioma cells. *J Transl Med* 7, 13.

Lessene, G., Czabotar, P.E., and Colman, P.M. (2008). BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 7, 989-1000.

- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., and Korsmeyer, S.J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2, 183-192.
- Leu, T.H., and Maa, M.C. (2002). The molecular mechanisms for the antitumorigenic effect of curcumin. *Current medicinal chemistry Anti-cancer agents* 2, 357-370.
- Lev-Ari, S., Vexler, A., Starr, A., Ashkenazy-Voghera, M., Greif, J., Aderka, D., and Ben-Yosef, R. (2007). Curcumin augments gemcitabine cytotoxic effect on pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Cancer Invest* 25, 411-418.
- Levitz, S.M., and Diamond, R.D. (1985). A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *J Infect Dis* 152, 938-945.
- Li, J., and Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27, 6194-6206.
- Li, L., Wang, J., Ye, R.D., Shi, G., Jin, H., Tang, X., and Yi, J. (2008). PML/RAR α fusion protein mediates the unique sensitivity to arsenic cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells: Mechanisms involve the impairment of cAMP signaling and the aberrant regulation of NADPH oxidase. *J Cell Physiol* 217, 486-493.
- Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Li, M., Zhang, Z., Hill, D.L., Chen, X., Wang, H., and Zhang, R. (2005). Genistein, a dietary isoflavone, down-regulates the MDM2 oncogene at both transcriptional and posttranslational levels. *Cancer Res* 65, 8200-8208.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Li, S.Z., Li, K., Zhang, J.H., and Dong, Z. (2013). The effect of quercetin on doxorubicin cytotoxicity in human breast cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem* 13, 352-355.
- Li, T., Wang, W., Chen, H., and Ye, L. (2010). Evaluation of anti-leukemia effect of resveratrol by modulating STAT3 signaling. *Int Immunopharmacol* 10, 18-25.
- Li, W., Nie, S., Yu, Q., and Xie, M. (2009). (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis of human hepatoma cells by mitochondrial pathways related to reactive oxygen species. *J Agric Food Chem* 57, 6685-6691.
- Li, Y., Qu, X., Qu, J., Zhang, Y., Liu, J., Teng, Y., Hu, X., Hou, K., and Liu, Y. (2009b). Arsenic trioxide induces apoptosis and G2/M phase arrest by inducing Cbl to inhibit PI3K/Akt signaling and thereby regulate p53 activation. *Cancer Lett* 284, 208-215.

- Li, Y., and Sarkar, F.H. (2002). Inhibition of nuclear factor kappaB activation in PC3 cells by genistein is mediated via Akt signaling pathway. *Clin Cancer Res* 8, 2369-2377.
- Li, Y.C., Fung, K.P., Kwok, T.T., Lee, C.Y., Suen, Y.K., and Kong, S.K. (2002). Mitochondrial targeting drug lonidamine triggered apoptosis in doxorubicin-resistant HepG2 cells. *Life Sci* 71, 2729-2740.
- Liang, C., Li, H., Shen, C., Lai, J., Shi, Z., Liu, B., and Tao, H.M. (2012). Genistein potentiates the anti-cancer effects of gemcitabine in human osteosarcoma via the downregulation of Akt and nuclear factor-kappaB pathway. *Anticancer Agents Med Chem* 12, 554-563.
- Liang, Y.C., Tsai, S.H., Chen, L., Lin-Shiau, S.Y., and Lin, J.K. (2003). Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells. *Biochem Pharmacol* 65, 1053-1060.
- Liao, P.C., Ng, L.T., Lin, L.T., Richardson, C.D., Wang, G.H., and Lin, C.C. (2010). Resveratrol arrests cell cycle and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma Huh-7 cells. *J Med Food* 13, 1415-1423.
- Liao, Y.F., Hung, H.C., Hour, T.C., Hsu, P.C., Kao, M.C., Tsay, G.J., and Liu, G.Y. (2008). Curcumin induces apoptosis through an ornithine decarboxylase-dependent pathway in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Life Sci* 82, 367-375.
- Ligeret, H., Barthelemy, S., Zini, R., Tillement, J.P., Labidalle, S., and Morin, D. (2004). Effects of curcumin and curcumin derivatives on mitochondrial permeability transition pore. *Free Radic Biol Med* 36, 919-929.
- Limtrakul, P. (2007). Curcumin as chemosensitizer. *Adv Exp Med Biol* 595, 269-300.
- Lin, J.K. (2007). Molecular targets of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595, 227-243.
- Lin, Y.G., Kunnumakkara, A.B., Nair, A., Merritt, W.M., Han, L.Y., Armaiz-Pena, G.N., Kamat, A.A., Spannuth, W.A., Gershenson, D.M., Lutgendorf, S.K., *et al.* (2007). Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor-kappaB pathway. *Clin Cancer Res* 13, 3423-343
- Liu, D., and Chen, Z. (2013). The effect of curcumin on breast cancer cells. *Journal of breast cancer* 16, 133-137.
- Liu, D., Shan, Y., Valluru, L., and Bao, F. (2013). Mn (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin scavenges reactive species, reduces oxidative stress, and improves functional recovery after experimental spinal cord injury in rats: comparison with methylprednisolone. *BMC neuroscience* 14, 23.
- Liu, Q., Hilsenbeck, S., and Gazitt, Y. (2003). Arsenic trioxide-induced apoptosis in myeloma cells: p53-dependent G1 or G2/M cell cycle arrest, activation of caspase-8 or caspase-9, and synergy with APO2/TRAIL. *Blood* 101, 4078-4087.

- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.
- 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. *Biochem J* 389, 259-268.
- Locke, M. (1997). The cellular stress response to exercise: role of stress proteins. *Exerc Sport Sci Rev* 25, 105-136.
- Low, I.C., Chen, Z.X., and Pervaiz, S. (2010). Bcl-2 modulates resveratrol-induced ROS production by regulating mitochondrial respiration in tumor cells. *Antioxid Redox Signal* 13, 807-819.
- Lozano, C., Julia, L., Jimenez, A., Tourino, S., Centelles, J.J., Cascante, M., and Torres, J.L. (2006). Electron-transfer capacity of catechin derivatives and influence on the cell cycle and apoptosis in HT29 cells. *FEBS J* 273, 2475-2486.
- Lozzio, B.B., Lozzi, C.B., and Machado, E. (1976). Human myelogenous (Ph+) leukemia cell line: transplantation into athymic mice. *J Natl Cancer Inst* 56, 627-629.
- Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* 3, 997-1007.
- Ma, Y., Wang, J., Liu, L., Zhu, H., Chen, X., Pan, S., Sun, X., and Jiang, H. (2011). Genistein potentiates the effect of arsenic trioxide against human hepatocellular carcinoma: role of Akt and nuclear factor-kappaB. *Cancer Lett* 301, 75-84.
- Macip, S., Kosoy, A., Lee, S.W., O'Connell, M.J., and Aaronson, S.A. (2006). Oxidative stress induces a prolonged but reversible arrest in p53-null cancer cells, involving a Chk1-dependent G2 checkpoint. *Oncogene* 25, 6037-6047.
- Madlener, S., Illmer, C., Horvath, Z., Saiko, P., Losert, A., Herbacek, I., Grusch, M., Elford, H.L., Krupitza, G., Bernhaus, A., *et al.* (2007). Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett* 245, 156-162.
- Maeno, E., Ishizaki, Y., Kanaseki, T., Hazama, A., and Okada, Y. (2000). Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9487-9492.
- Maiolo, A.T., Foa, P., Cortellaro, M., Lambertenghi-Deliliers, G., Colantoni, A., Cesana, B., Castoldi, G.L., Cazzola, M., Giordano, M., Riccardi, A., *et al.* (1987). Low-dose cytosine arabinoside (Ara-C) therapy in the myelodysplastic syndromes and acute myelogenous leukemia. *Haematologica* 72, 61-65.

Majno, G., and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146, 3-15.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79, 727-747.

Manna, S.K., Mukhopadhyay, A., and Aggarwal, B.B. (2000). Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* 164, 6509-6519.

Marin, Y.E., Wall, B.A., Wang, S., Namkoong, J., Martino, J.J., Suh, J., Lee, H.J., Rabson, A.B., Yang, C.S., Chen, S., *et al.* (2007). Curcumin downregulates the constitutive activity of NF-kappaB and induces apoptosis in novel mouse melanoma cells. *Melanoma Res* 17, 274-283.

Marnett, L.J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21, 361-370.

Martinez-Valverde, I., Periago, M.J., and Ros, G. (2000). [Nutritional importance of phenolic compounds in the diet]. *Arch Latinoam Nutr* 50, 5-18.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., Prevost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C., *et al.* (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281, 2027-2031.

Masuda, M., Wakasaki, T., Toh, S., Shimizu, M., and Adachi, S. (2011). Chemoprevention of Head and Neck Cancer by Green Tea Extract: EGCG-The Role of EGFR Signaling and "Lipid Raft". *J Oncol* 2011, 540148.

Mathews, V., George, B., Chendamarai, E., Lakshmi, K.M., Desire, S., Balasubramanian, P., Viswabandya, A., Thirugnanam, R., Abraham, A., Shaji, R.V., *et al.* (2010). Single-agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: long-term follow-up data. *J Clin Oncol* 28, 3866-3871.

Matsuzawa, A., and Ichijo, H. (2005). Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal* 7, 472-481.

Mayer, M.P., and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62, 670-684.

Mazumder, A., Gupta, M., Perrin, D.M., Sigman, D.S., Rabinovitz, M., and Pommier, Y. (1995). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by a hydrophobic cation: the phenanthroline-cuprous complex. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11, 115-125.

McCullum, G., Keng, P.C., States, J.C., and McCabe, M.J., Jr. (2005). Arsenite delays progression through each cell cycle phase and induces apoptosis following G2/M arrest in U937 myeloid leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther* 313, 877-887.

- McCormack, P.L., and Keam, S.J. (2012). Spotlight on dasatinib in chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 26, 61-64.
- McCubrey, J.A., Lahair, M.M., and Franklin, R.A. (2006). Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal* 8, 1775-1789.
- McIlwain, D.R., Berger, T., and Mak, T.W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a008656.
- McNally, S.J., Harrison, E.M., Ross, J.A., Garden, O.J., and Wigmore, S.J. (2007). Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen species, p38 activation and phosphatase inhibition. *Int J Mol Med* 19, 165-172.
- Meeran, S.M., and Katiyar, S.K. (2008). Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. *Front Biosci* 13, 2191-2202.
- Meiyanto, E., Hermawan, A., and Anindyajati (2012). Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pac J Cancer Prev* 13, 427-436.
- Menon, V.P., and Sudheer, A.R. (2007). Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595, 105-125.
- Mertens, S., Craxton, M., and Goedert, M. (1996). SAP kinase-3, a new member of the family of mammalian stress-activated protein kinases. *FEBS Lett* 383, 273-276.
- Mesa, M.D., Ramírez-Tortosa, M.C., Aguilera, C.M., Ramírez-Boscá, A., Gil, A. (2000). Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los curcuminoides. *Ars Pharmaceutica* 41 Número 1.
- Mezzetti, G., Bagnara, G., Monti, M.G., Bonsi, L., Brunelli, M.A., and Barbiroli, B. (1984). 1 alpha, 25-dihydroxycholecalciferol and human histiocytic lymphoma cell line (U-937): the presence of receptor and inhibition of proliferation. *Life Sci* 34, 2185-2191.
- Milarski, K.L., and Morimoto, R.I. (1989). Mutational analysis of the human HSP70 protein: distinct domains for nucleolar localization and adenosine triphosphate binding. *J Cell Biol* 109, 1947-1962.
- Miller, F.J., Jr., Gutterman, D.D., Rios, C.D., Heistad, D.D., and Davidson, B.L. (1998). Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res* 82, 1298-1305.
- Miller, W.H., Jr., Schipper, H.M., Lee, J.S., Singer, J., and Waxman, S. (2002). Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res* 62, 3893-3903.

- Miloso, M., Bertelli, A.A., Nicolini, G., and Tredici, G. (1999). Resveratrol-induced activation of the mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2, in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 264, 141-144.
- Miranda, M.B., Redner, R.L., and Johnson, D.E. (2007). Inhibition of Src family kinases enhances retinoic acid induced gene expression and myeloid differentiation. *Mol Cancer Ther* 6, 3081-3090.
- Miyahara, T., Katoh, T., Watanabe, M., Mikami, Y., Uchida, S., Hosoe, M., Sakuma, T., Nemoto, N., Takayama, K., and Komurasaki, T. (2004). Involvement of mitogen-activated protein kinases and protein kinase C in cadmium-induced prostaglandin E2 production in primary mouse osteoblastic cells. *Toxicology* 200, 159-167.
- Mnjoyan, Z.H., and Fujise, K. (2003). Profound negative regulatory effects by resveratrol on vascular smooth muscle cells: a role of p53-p21(WAF1/CIP1) pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 546-552.
- Mohapatra, P., Preet, R., Choudhuri, M., Choudhuri, T., and Kundu, C.N. (2011). 5-fluorouracil increases the chemopreventive potentials of resveratrol through DNA damage and MAPK signaling pathway in human colorectal cancer cells. *Oncology research* 19, 311-321.
- Moorman, A.V., Harrison, C.J., Buck, G.A., Richards, S.M., Secker-Walker, L.M., Martineau, M., Vance, G.H., Cherry, A.M., Higgins, R.R., Fielding, A.K., *et al.* (2007). Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood* 109, 3189-3197.
- Morin, D., Barthelemy, S., Zini, R., Labidalle, S., and Tillement, J.P. (2001). Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol oxidation. *FEBS Lett* 495, 131-136.
- Mukherjee, S., Roy, M., Dey, S., and Bhattacharya, R.K. (2007). A Mechanistic Approach for Modulation of Arsenic Toxicity in Human Lymphocytes by Curcumin, an Active Constituent of Medicinal Herb *Curcuma longa* Linn. *J Clin Biochem Nutr* 41, 32-42.
- Muller, C.W., Rey, F.A., Sodeoka, M., Verdine, G.L., and Harrison, S.C. (1995). Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. *Nature* 373, 311-317.
- Murakami, A., Ashida, H., and Terao, J. (2008). Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett* 269, 315-325.
- Nadova, S., Miadokova, E., and Cipak, L. (2007). Flavonoids potentiate the efficacy of cytarabine through modulation of drug-induced apoptosis. *Neoplasma* 54, 202-206.
- Nagaraju, G.P., Aliya, S., Zafar, S.F., Basha, R., Diaz, R., and El-Rayes, B.F. (2012). The impact of curcumin on breast cancer. *Integr Biol (Camb)* 4, 996-1007.

Nakazato, T., Ito, K., Miyakawa, Y., Kinjo, K., Yamada, T., Hozumi, N., Ikeda, Y., and Kizaki, M. (2005b). Catechin, a green tea component, rapidly induces apoptosis of myeloid leukemic cells via modulation of reactive oxygen species production in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Haematologica* 90, 317-325.

Nakazato, T., Ito, K., Ikeda, Y., and Kizaki, M. (2005a). Green tea component, catechin, induces apoptosis of human malignant B cells via production of reactive oxygen species. *Clin Cancer Res* 11, 6040-6049.

Nakazato, T., Sagawa, M., Yamato, K., Xian, M., Yamamoto, T., Suematsu, M., Ikeda, Y., and Kizaki, M. (2007). Myeloperoxidase is a key regulator of oxidative stress mediated apoptosis in myeloid leukemic cells. *Clin Cancer Res* 13, 5436-5445.

Navarro-Antolin, J., Redondo-Horcajo, M., Zaragoza, C., Alvarez-Barrientos, A., Fernandez, A.P., Leon-Gomez, E., Rodrigo, J., and Lamas, S. (2007). Role of peroxynitrite in endothelial damage mediated by Cyclosporine A. *Free Radic Biol Med* 42, 394-403.

Nebreda, A.R., and Porras, A. (2000). p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* 25, 257-260.

Nguyen, A.V., Martinez, M., Stamos, M.J., Moyer, M.P., Planutis, K., Hope, C., and Holcombe, R.F. (2009). Results of a phase I pilot clinical trial examining the effect of plant-derived resveratrol and grape powder on Wnt pathway target gene expression in colonic mucosa and colon cancer. *Cancer management and research* 1, 25-37.

Nguyen, D.T., Hernandez-Montes, E., Vauzour, D., Schonthal, A.H., Rice-Evans, C., Cadenas, E., and Spencer, J.P. (2006). The intracellular genistein metabolite 5,7,3',4'-tetrahydroxyisoflavone mediates G2-M cell cycle arrest in cancer cells via modulation of the p38 signaling pathway. *Free Radic Biol Med* 41, 1225-1239.

Nguyen, T.T., Tran, E., Nguyen, T.H., Do, P.T., Huynh, T.H., and Huynh, H. (2004). The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis* 25, 647-659.

Nicotera, P., Leist, M., and Ferrando-May, E. (1999). Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. *Biochem Soc Symp* 66, 69-73.

Nigro, P., Bloise, E., Turco, M.C., Skhirtladze, A., Montoro, P., Pizza, C., Piacente, S., and Belisario, M.A. (2007). Antiproliferative and pro-apoptotic activity of novel phenolic derivatives of resveratrol. *Life Sci* 81, 873-883.

Ning, S.C., and Hahn, G.M. (1990). Cytotoxicity of lonidamine alone and in combination with other drugs against murine RIF-1 and human HT1080 cells in vitro. *Cancer Res* 50, 7867-7870.

Nonn, L., Duong, D., and Peehl, D.M. (2007). Chemopreventive anti-inflammatory activities of curcumin and other phytochemicals mediated by MAP kinase phosphatase-5 in prostate cells. *Carcinogenesis* 28, 1188-1196.

Notarbartolo, M., Poma, P., Perri, D., Dusonchet, L., Cervello, M., and D'Alessandro, N. (2005). Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with cisplatin or doxorubicin, on human hepatic cancer cells. Analysis of their possible relationship to changes in NF-kB activation levels and in IAP gene expression. *Cancer Lett* 224, 53-65.

Nurse, P. (1997). Checkpoint pathways come of age. *Cell* 91, 865-867.

Oberoi, H.S., Nukolova, N.V., Laquer, F.C., Poluektova, L.Y., Huang, J., Alnouti, Y., Yokohira, M., Arnold, L.L., Kabanov, A.V., Cohen, S.M., *et al.* (2012). Cisplatin-loaded core cross-linked micelles: comparative pharmacokinetics, antitumor activity, and toxicity in mice. *Int J Nanomedicine* 7, 2557-2571.

Okamoto, S., Krainc, D., Sherman, K., and Lipton, S.A. (2000). Antiapoptotic role of the p38 mitogen-activated protein kinase-myocyte enhancer factor 2 transcription factor pathway during neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7561-7566.

Okura, A., Arakawa, H., Oka, H., Yoshinari, T., and Monden, Y. (1988). Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12]Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 157, 183-189.

Olsson, I.L., and Breitman, T.R. (1982). Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by retinoic acid and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-inducing agents. *Cancer Res* 42, 3924-3927.

Ono, K., and Han, J. (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12, 1-13.

Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12, 913-922.

Oudard, S., Carpentier, A., Banu, E., Fauchon, F., Celerier, D., Poupon, M.F., Dutrillaux, B., Andrieu, J.M., and Delattre, J.Y. (2003). Phase II study of lonidamine and diazepam in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 63, 81-86.

Paez, J., and Sellers, W.R. (2003). PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling. *Cancer Treat Res* 115, 145-167.

Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.

Pan, W., Yang, H., Cao, C., Song, X., Wallin, B., Kivlin, R., Lu, S., Hu, G., Di, W., and Wan, Y. (2008). AMPK mediates curcumin-induced cell death in CaOV3 ovarian cancer cells. *Oncol Rep* 20, 1553-1559.

Parekh, P., Motiwale, L., Naik, N., and Rao, K.V. (2011). Downregulation of cyclin D1 is associated with decreased levels of p38 MAP kinases, Akt/PKB and Pak1 during chemopreventive effects of resveratrol in liver cancer cells. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 63, 167-173.

Park, J.G., Yuk, Y., Rhim, H., Yi, S.Y., and Yoo, Y.S. (2002). Role of p38 MAPK in the regulation of apoptosis signaling induced by TNF-alpha in differentiated PC12 cells. *Journal of biochemistry and molecular biology* 35, 267-272.

Park, J.W., Choi, Y.J., Suh, S.I., Baek, W.K., Suh, M.H., Jin, I.N., Min, D.S., Woo, J.H., Chang, J.S., Passaniti, A., *et al.* (2001). Bcl-2 overexpression attenuates resveratrol-induced apoptosis in U937 cells by inhibition of caspase-3 activity. *Carcinogenesis* 22, 1633-1639.

Park, S.S., Kim, Y.N., Jeon, Y.K., Kim, Y.A., Kim, J.E., Kim, H., and Kim, C.W. (2005). Genistein-induced apoptosis via Akt signaling pathway in anaplastic large-cell lymphoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 56, 271-278.

Pauli, D., Arrigo, A.P., and Tissieres, A. (1992). Heat shock response in *Drosophila*. *Experientia* 48, 623-629.

Pelicano, H., Feng, L., Zhou, Y., Carew, J.S., Hileman, E.O., Plunkett, W., Keating, M.J., and Huang, P. (2003). Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J Biol Chem* 278, 37832-37839.

Perkins, C., Kim, C.N., Fang, G., and Bhalla, K.N. (2000). Arsenic induces apoptosis of multidrug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-x(L). *Blood* 95, 1014-1022.

Persons, D.L., Yazlovitskaya, E.M., Cui, W., and Pelling, J.C. (1999). Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clin Cancer Res* 5, 1007-1014.

Petronilli, V., Miotto, G., Canton, M., Brini, M., Colonna, R., Bernardi, P., and Di Lisa, F. (1999). Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J* 76, 725-734.

Pettersson, H.M., Pietras, A., Munksgaard Persson, M., Karlsson, J., Johansson, L., Shoshan, M.C., and Pahlman, S. (2009). Arsenic trioxide is highly cytotoxic to small cell lung carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 8, 160-170.

Pianetti, S., Guo, S., Kavanagh, K.T., and Sonenshein, G.E. (2002). Green tea polyphenol epigallocatechin-3 gallate inhibits Her-2/neu signaling, proliferation, and transformed phenotype of breast cancer cells. *Cancer Res* 62, 652-655.

Pickering, B.M., de Mel, S., Lee, M., Howell, M., Habens, F., Dallman, C.L., Neville, L.A., Potter, K.N., Mann, J., Mann, D.A., *et al.* (2007). Pharmacological inhibitors of NF-kappaB accelerate apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Oncogene* 26, 1166-1177.

Pietenpol, J.A., and Stewart, Z.A. (2002). Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181-182, 475-481.

Pines, J. (1994a). The cell cycle kinases. *Semin Cancer Biol* 5, 305-313.

Pines, J. (1994b). Protein kinases and cell cycle control. *Semin Cell Biol* 5, 399-408.

Porras, A., Zuluaga, S., Black, E., Valladares, A., Alvarez, A.M., Ambrosino, C., Benito, M., and Nebreda, A.R. (2004). P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol Biol Cell* 15, 922-933.

Poncet, D., Boya, P., Metivier, D., Zamzami, N., and Kroemer, G. (2003). Cytofluorometric quantitation of apoptosis-driven inner mitochondrial membrane permeabilization. *Apoptosis* 8, 521-530.

Qiao, Q., Jiang, Y., and Li, G. (2013). Inhibition of the PI3K/AKT-NF-kappaB Pathway With Curcumin Enhanced Radiation-Induced Apoptosis in Human Burkitt's Lymphoma. *Journal of pharmacological sciences* 121, 247-256.

Ragione, F.D., Cucciolla, V., Borriello, A., Pietra, V.D., Racioppi, L., Soldati, G., Manna, C., Galletti, P., and Zappia, V. (1998). Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition. *Biochem Biophys Res Commun* 250, 53-58.

Ragione, F.D., Cucciolla, V., Criniti, V., Indaco, S., Borriello, A., and Zappia, V. (2003). p21Cip1 gene expression is modulated by Egr1: a novel regulatory mechanism involved in the resveratrol antiproliferative effect. *J Biol Chem* 278, 23360-23368.

Rajalingam, K., and Dikic, I. (2009). Inhibitors of apoptosis catch ubiquitin. *Biochem J* 417, e1-3.

Ramos, A.M., and Aller, P. (2008). Quercetin decreases intracellular GSH content and potentiates the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide in human leukemia cell lines. *Biochem Pharmacol* 75, 1912-1923.

Ramos, A.M., Fernandez, C., Amran, D., Esteban, D., de Blas, E., Palacios, M.A., and Aller, P. (2006). Pharmacologic inhibitors of extracellular signal-regulated kinase (ERKs) and c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) decrease glutathione content and sensitize human promonocytic leukemia cells to arsenic trioxide-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 209, 1006-1015.

Ramos, A.M., Fernandez, C., Amran, D., Sancho, P., de Blas, E., and Aller, P. (2005). Pharmacologic inhibitors of PI3K/Akt potentiate the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide via glutathione depletion and increased peroxide accumulation in myeloid leukemia cells. *Blood* 105, 4013-4020.

Ramos, S. (2007). Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem* 18, 427-442.

Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res* 52, 507-526.

Ranelletti, F.O., Ricci, R., Larocca, L.M., Maggiano, N., Capelli, A., Scambia, G., Benedetti-Panici, P., Mancuso, S., Rumi, C., and Piantelli, M. (1992). Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. *Int J Cancer* 50, 486-492.

Rao, Y., Li, R., and Zhang, D. (2013). A drug from poison: how the therapeutic effect of arsenic trioxide (ATO) on acute promyelocytic leukemia (APL) was discovered. *Science China Life sciences*.

Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S.A., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J.M., Garrido, C., *et al.* (2001). Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 3, 839-843.

Ravagnan, L., Marzo, I., Costantini, P., Susin, S.A., Zamzami, N., Petit, P.X., Hirsch, F., Goubern, M., Poupon, M.F., Miccoli, L., *et al.* (1999). Lonidamine triggers apoptosis via a direct, Bcl-2-inhibited effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Oncogene* 18, 2537-2546.

Ravagnan, L., Roumier, T., and Kroemer, G. (2002). Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 192, 131-137.

Reddy, K.B., Nabha, S.M., and Atanaskova, N. (2003). Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 22, 395-403.

Reed, D.J. (1990). Glutathione: toxicological implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30, 603-631.

Reed, J.C. (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387, 773-776

Reuter, S., Eifes, S., Dicato, M., Aggarwal, B.B., and Diederich, M. (2008). Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 76, 1340-1351.

Ricci, J.E., Munoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly-Maitre, B., Perkins, G.A., Yadava, N., Scheffler, I.E., Ellisman, M.H., and Green, D.R. (2004). Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* 117, 773-786.

Ricotti, L., Tesei, A., De Paola, F., Milandri, C., Amadori, D., Frassinetti, G.L., Ulivi, P., and Zoli, W. (2003). Potentiation of antiproliferative drug activity by lonidamine in hepatocellular carcinoma cells. *J Chemother* 15, 480-487.

Rice PL, B.K., Driggers LJ, Ahnen DJ. (2004). Inhibition of extracellular-signal regulated kinases 1/2 is required for apoptosis of human colon cancer cells in vitro by sulindac metabolites. *Cancer Res*.

Riparbelli, M.G., Callaini, G., Tripodi, S.A., Cintorino, M., Tosi, P., and Dallai, R. (1995). Localization of the Bcl-2 protein to the outer mitochondrial membrane by electron microscopy. *Exp Cell Res* 221, 363-369.

Rodriguez-Berriguete, G., Fraile, B., Martinez-Onsurbe, P., Olmedilla, G., Paniagua, R., and Royuela, M. (2012). MAP Kinases and Prostate Cancer. *Journal of signal transduction* 2012, 169170.

Roemer, K., and Mahyar-Roemer, M. (2002). The basis for the chemopreventive action of resveratrol. *Drugs of today* 38, 571-580.

Rojewski, M.T., Baldus, C., Knauf, W., Thiel, E., and Schrezenmeier, H. (2002). Dual effects of arsenic trioxide (As₂O₃) on non-acute promyelocytic leukaemia myeloid cell lines: induction of apoptosis and inhibition of proliferation. *Br J Haematol* 116, 555-563.

Rong, Y., Yang, E.B., Zhang, K., and Mack, P. (2000). Quercetin-induced apoptosis in the monoblastoid cell line U937 in vitro and the regulation of heat shock proteins expression. *Anticancer Res* 20, 4339-4345.

Roux, P.P., and Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 320-344.

Roy, M., Sinha, D., Mukherjee, S., Paul, S., and Bhattacharya, R.K. (2008). Protective effect of dietary phytochemicals against arsenite induced genotoxicity in mammalian V79 cells. *Indian J Exp Biol* 46, 690-697

Rubin, E., Kharbanda, S., Gunji, H., and Kufe, D. (1991). Activation of the c-jun protooncogene in human myeloid leukemia cells treated with etoposide. *Mol Pharmacol* 39, 697-701.

Sabarinathan, D., Mahalakshmi, P., and Vanisree, A.J. (2010). Naringenin promote apoptosis in cerebrally implanted C6 glioma cells. *Mol Cell Biochem* 345, 215-222.

Saeki, K., Hayakawa, S., Isemura, M., and Miyase, T. (2000). Importance of a pyrogallol-type structure in catechin compounds for apoptosis-inducing activity. *Phytochemistry* 53, 391-394.

Saeki, K., Kobayashi, N., Inazawa, Y., Zhang, H., Nishitoh, H., Ichijo, H., Saeki, K., Isemura, M., and Yuo, A. (2002). Oxidation-triggered c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways for apoptosis in human leukaemic cells stimulated by epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a distinct pathway from those of chemically induced and receptor-mediated apoptosis. *Biochem J* 368, 705-720.

Sakagami, H., and Satoh, K. (1997). Prooxidant action of two antioxidants: ascorbic acid and gallic acid. *Anticancer Res* 17, 221-224.

Sakagami, H., Satoh, K., Hatano, T., Yoshida, T., and Okuda, T. (1997). Possible role of radical intensity and oxidation potential for gallic acid-induced apoptosis. *Anticancer Res* 17, 377-380.

Sakaguchi, N., Inoue, M., and Ogihara, Y. (1998). Reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺, common signals for apoptosis induced by gallic acid. *Biochem Pharmacol* 55, 1973-1981.

Saldanha, S.N., and Tollefsbol, T.O. (2012). The role of nutraceuticals in chemoprevention and chemotherapy and their clinical outcomes. *J Oncol* 2012, 192464.

Salvi, M., Brunati, A.M., Clari, G., and Toninello, A. (2002). Interaction of genistein with the mitochondrial electron transport chain results in opening of the membrane transition pore. *Biochim Biophys Acta* 1556, 187-196.

Samali, A., Nordgren, H., Zhivotovsky, B., Peterson, E., and Orrenius, S. (1999). A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 255, 6-11.

Sanchez, Y., Calle, C., de Blas, E., and Aller, P. (2009). Modulation of arsenic trioxide-induced apoptosis by genistein and functionally related agents in U937 human leukaemia cells. Regulation by ROS and mitogen-activated protein kinases. *Chemico-biological interactions* 182, 37-44.

Sanchez, Y., Amran, D., de Blas, E., and Aller, P. (2009). Regulation of genistein-induced differentiation in human acute myeloid leukaemia cells (HL60, NB4) Protein kinase modulation and reactive oxygen species generation. *Biochem Pharmacol* 77, 384-396.

Sanchez, Y., Amran, D., Fernandez, C., de Blas, E., and Aller, P. (2008). Genistein selectively potentiates arsenic trioxide-induced apoptosis in human leukemia cells via reactive oxygen species generation and activation of reactive oxygen species-inducible protein kinases (p38-MAPK, AMPK). *Int J Cancer* 123, 1205-1214.

Sancho, P., Fernandez, C., Yuste, V.J., Amran, D., Ramos, A.M., de Blas, E., Susin, S.A., and Aller, P. (2006). Regulation of apoptosis/necrosis execution in cadmium-treated human promonocytic cells under different forms of oxidative stress. *Apoptosis* 11, 673-686.

Santos, J.A., Carvalho, G.S., Oliveira, V., Raposo, N.R., and da Silva, A.D. (2013). Resveratrol and Analogues: A Review of Antioxidant Activity and Applications to Human Health. *Recent Pat Food Nutr Agric*.

Sarkar, F.H., and Li, Y. (2002). Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastasis Rev* 21, 265-280.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45, 287-306.

Scapagnini, G., Davinelli, S., Drago, F., De Lorenzo, A., and Oriani, G. (2012). Antioxidants as antidepressants: fact or fiction? *CNS drugs* 26, 477-490.

Scarlatti, F., Sala, G., Ricci, C., Maioli, C., Milani, F., Minella, M., Botturi, M., and Ghidoni, R. (2007). Resveratrol sensitization of DU145 prostate cancer cells to ionizing radiation is associated to ceramide increase. *Cancer Lett* 253, 124-130.

Schafer, A.J., and Hawkins, J.R. (1998). DNA variation and the future of human genetics. *Nat Biotechnol* 16, 33-39.

Schneider, U., and Schwenk, H.U. (1977). Characterization of "T" and "non-T" cell lines established from children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma after leukemic transformation. *Haematology and blood transfusion* 20, 265-269.

Schreck, R., Rieber, P., and Baeuerle, P.A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10, 2247-2258.

Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M., and Schaffner, W. (1988). Identification of a novel lymphoid specific octamer binding protein (OTF-2B) by proteolytic clipping bandshift assay (PCBA). *EMBO J* 7, 4221-4229.

Scott, N., Hatlelid, K.M., MacKenzie, N.E., and Carter, D.E. (1993). Reactions of arsenic(III) and arsenic(V) species with glutathione. *Chem Res Toxicol* 6, 102-106.

Scott, D.W., and Loo, G. (2007). Curcumin-induced GADD153 upregulation: modulation by glutathione. *J Cell Biochem* 101, 307-320.

Seger, R., and Krebs, E.G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9, 726-735.

Serrano, A., Palacios, C., Roy, G., Cespon, C., Villar, M.L., Nocito, M., and Gonzalez-Porque, P. (1998). Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. *Arch Biochem Biophys* 350, 49-54.

Shankar, S., Siddiqui, I., and Srivastava, R.K. (2007). 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. *Mol Cell Biochem* 304, 273-285.

Shankar, S., Suthakar, G., and Srivastava, R.K. (2007b). Epigallocatechin-3-gallate inhibits cell cycle and induces apoptosis in pancreatic cancer. *Front Biosci* 12, 5039-5051.

Sharma, R.A., Euden, S.A., Platton, S.L., Cooke, D.N., Shafayat, A., Hewitt, H.R., Marczylo, T.H., Morgan, B., Hemingway, D., Plummer, S.M., *et al.* (2004). Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res* 10, 6847-6854.

- Sharma, S., Chopra, K., Kulkarni, S.K., and Agrewala, J.N. (2007). Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. *Clinical and experimental immunology* 147, 155-163.
- Shen, S.C., Lee, W.R., Yang, L.Y., Tsai, H.H., Yang, L.L., and Chen, Y.C. (2012). Quercetin enhancement of arsenic-induced apoptosis via stimulating ROS-dependent p53 protein ubiquitination in human HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol* 21, 370-375.
- Shehzad, A., Lee, J., and Lee, Y.S. (2013). Curcumin in various cancers. *Biofactors* 39, 56-68.
- Sherman, M., and Multhoff, G. (2007). Heat shock proteins in cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1113, 192-201.
- Shih, A., Davis, F.B., Lin, H.Y., and Davis, P.J. (2002). Resveratrol induces apoptosis in thyroid cancer cell lines via a MAPK- and p53-dependent mechanism. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1223-1232.
- Shishodia, S., Amin, H.M., Lai, R., and Aggarwal, B.B. (2005). Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochem Pharmacol* 70, 700-713.
- Shimizu, M., and Weinstein, I.B. (2005). Modulation of signal transduction by tea catechins and related phytochemicals. *Mutation research* 591, 147-160.
- Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. (2000). Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 577-582.
- Shoji, Y., Uedono, Y., Ishikura, H., Takeyama, N., and Tanaka, T. (1995). DNA damage induced by tumour necrosis factor-alpha in L929 cells is mediated by mitochondrial oxygen radical formation. *Immunology* 84, 543-548.
- Sies, H., and Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 311, 617-631.
- Silvestrini, B. (1991). Lonidamine: an overview. *Semin Oncol* 18(2 Suppl 4):2-6.
- Singh, A.V., Franke, A.A., Blackburn, G.L., and Zhou, J.R. (2006). Soy phytochemicals prevent orthotopic growth and metastasis of bladder cancer in mice by alterations of cancer cell proliferation and apoptosis and tumor angiogenesis. *Cancer Res* 66, 1851-1858.
- Singh, B.N., Shankar, S., and Srivastava, R.K. (2011). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 82, 1807-1821.

Singh, N., Nigam, M., Ranjan, V., Sharma, R., Balapure, A.K., and Rath, S.K. (2009). Caspase mediated enhanced apoptotic action of cyclophosphamide- and resveratrol-treated MCF-7 cells. *Journal of pharmacological sciences* 109, 473-485.

Soignet, S.L., Maslak, P., Wang, Z.G., Jhanwar, S., Calleja, E., Dardashti, L.J., Corso, D., DeBlasio, A., Gabrilove, J., Scheinberg, D.A., *et al.* (1998). Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med* 339, 1341-1348.

Solary, E., Bettaieb, A., Dubrez-Daloz, L., and Corcos, L. (2003). Mitochondria as a target for inducing death of malignant hematopoietic cells. *Leuk Lymphoma* 44, 563-574.

Song, G., Ouyang, G., and Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 9, 59-71.

Sood, P.K., Nahar, U., and Nehru, B. (2012). Stress proteins and glial cell functions during chronic aluminium exposures: protective role of curcumin. *Neurochem Res* 37, 639-646.

Sorger, P.K. (1991). Heat shock factor and the heat shock response. *Cell* 65, 363-366.

Squires, M.S., Hudson, E.A., Howells, L., Sale, S., Houghton, C.E., Jones, J.L., Fox, L.H., Dickens, M., Prigent, S.A., and Manson, M.M. (2003). Relevance of mitogen activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/PKB) pathways to induction of apoptosis by curcumin in breast cells. *Biochem Pharmacol* 65, 361-376.

Srivastava, R.K., Chen, Q., Siddiqui, I., Sarva, K., and Shankar, S. (2007). Linkage of curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis by cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1). *Cell Cycle* 6, 2953-2961.

Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1, 949-957.

States, J.C., Reiners, J.J., Jr., Pounds, J.G., Kaplan, D.J., Beauerle, B.D., McNeely, S.C., Mathieu, P., and McCabe, M.J., Jr. (2002). Arsenite disrupts mitosis and induces apoptosis in SV40-transformed human skin fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol* 180, 83-91.

Stein, B., Yang, M.X., Young, D.B., Janknecht, R., Hunter, T., Murray, B.W., and Barbosa, M.S. (1997). p38-2, a novel mitogen-activated protein kinase with distinct properties. *J Biol Chem* 272, 19509-19517.

Stein, E.M., and Tallman, M.S. (2012). Remission induction in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 96, 164-170.

Su, B., and Karin, M. (1996). Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol* 8, 402-411.

Sugimoto, K., Toyoshima, H., Sakai, R., Miyagawa, K., Hagiwara, K., Ishikawa, F., Takaku, F., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1992). Frequent mutations in the p53 gene in human myeloid leukemia cell lines. *Blood* 79, 2378-2383.

Sun, S.H., Huang, H.C., Huang, C., and Lin, J.K. (2012). Cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231/Her2 cells induced by curcumin. *Eur J Pharmacol* 690, 22-30.

Sundstrom, C., and Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 17, 565-577.

Surh, Y.J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 3, 768-780.

Susin, S.A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prevost, M.C., *et al.* (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192, 571-580.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., *et al.* (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.

Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8, 613-621.

Syng-Ai, C., Kumari, A.L., and Khar, A. (2004). Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. *Mol Cancer Ther* 3, 1101-1108.

Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 231-241.

Tajima, S., Hayashi, R., Tsuchiya, S., Miyake, Y., and Yamamoto, A. (1985). Cells of a human monocytic leukemia cell line (THP-1) synthesize and secrete apolipoprotein E and lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun* 126, 526-531.

Takahata, T., Ookawa, K., Suto, K., Tanaka, M., Yano, H., Nakashima, O., Kojiro, M., Tamura, Y., Tateishi, T., Sakata, Y., *et al.* (2008). Chemosensitivity determinants of irinotecan hydrochloride in hepatocellular carcinoma cell lines. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 102, 399-407.

Tallman, M.S. (2007). Treatment of relapsed or refractory acute promyelocytic leukemia. *Best practice & research Clinical haematology* 20, 57-65.

Tamura, S., Bito, T., Ichihashi, M., and Ueda, M. (2003). Genistein enhances the cisplatin-induced inhibition of cell growth and apoptosis in human malignant melanoma

cells. Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society 16, 470-476.

Tang, D., Wu, D., Hirao, A., Lahti, J.M., Liu, L., Mazza, B., Kidd, V.J., Mak, T.W., and Ingram, A.J. (2002). ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem* 277, 12710-12717.

Tang, S.N., Fu, J., Shankar, S., and Srivastava, R.K. (2012). EGCG enhances the therapeutic potential of gemcitabine and CP690550 by inhibiting STAT3 signaling pathway in human pancreatic cancer. *PLoS One* 7, e31067.

Tanguay, R.M., Wu, Y., and Khandjian, E.W. (1993). Tissue-specific expression of heat shock proteins of the mouse in the absence of stress. *Dev Genet* 14, 112-118.

Tarkowski, M., Kokocinska, M., and Latocha, M. (2013). [Genistein in chemoprevention and treatment]. *Pol Merkur Lekarski* 34, 54-57.

Teiten, M.H., Reuter, S., Schmucker, S., Dicato, M., and Diederich, M. (2009). Induction of heat shock response by curcumin in human leukemia cells. *Cancer Lett* 279, 145-154.

Thanos, D., and Maniatis, T. (1995). NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 80, 529-532.

Thomas, S.M., and Brugge, J.S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 513-609.

Thayyullathil, F., Chathoth, S., Hago, A., Patel, M., and Galadari, S. (2008). Rapid reactive oxygen species (ROS) generation induced by curcumin leads to caspase-dependent and -independent apoptosis in L929 cells. *Free Radic Biol Med* 45, 1403-1412.

Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.

Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., *et al.* (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17907-17911.

Tian, F., Fan, T., Zhang, Y., Jiang, Y., and Zhang, X. (2012). Curcumin potentiates the antitumor effects of 5-FU in treatment of esophageal squamous carcinoma cells through downregulating the activation of NF-kappaB signaling pathway in vitro and in vivo. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 44, 847-855.

Tinhofer, I., Bernhard, D., Senfter, M., Anether, G., Loeffler, M., Kroemer, G., Kofler, R., Csordas, A., and Greil, R. (2001). Resveratrol, a tumor-suppressive compound from

grapes, induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2. *FASEB J* 15, 1613-1615.

Tissieres, A., Mitchell, H.K., and Tracy, U.M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84, 389-398.

Tomita, A., Kiyoi, H., and Naoe, T. (2013). Mechanisms of action and resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (AsO₃) in acute promyelocytic leukemia. *Int J Hematol*.

Tornero, D., Cena, V., Gonzalez- Garcia, C., and Jordan, J. (2002). [The role of the mitochondrial permeability transition pore in neurodegenerative processes]. *Revista de neurologia* 35, 354-361.

Torres, M., and Forman, H.J. (2003). Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors* 17, 287-296.

Tran, P.L., Kim, S.A., Choi, H.S., Yoon, J.H., and Ahn, S.G. (2010). Epigallocatechin-3-gallate suppresses the expression of HSP70 and HSP90 and exhibits anti-tumor activity in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 10, 276.

Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* 8, 205-215.

Troyano, A., Fernandez, C., Sancho, P., de Blas, E., and Aller, P. (2001). Effect of glutathione depletion on antitumor drug toxicity (apoptosis and necrosis) in U-937 human promonocytic cells. The role of intracellular oxidation. *J Biol Chem* 276, 47107-47115.

Troyano, A., Sancho, P., Fernandez, C., de Blas, E., Bernardi, P., and Aller, P. (2003). The selection between apoptosis and necrosis is differentially regulated in hydrogen peroxide-treated and glutathione-depleted human promonocytic cells. *Cell Death Differ* 10, 889-898.

Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2, 1231-1246.

Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26, 171-176.

Ulukaya, E., Acilan, C., and Yilmaz, Y. (2011). Apoptosis: why and how does it occur in biology? *Cell biochemistry and function* 29, 468-480.

Valladares, A., Alvarez, A.M., Ventura, J.J., Roncero, C., Benito, M., and Porras, A. (2000). p38 mitogen-activated protein kinase mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in rat fetal brown adipocytes. *Endocrinology* 141, 4383-4395.

- van Loo, G., Saelens, X., van Gorp, M., MacFarlane, M., Martin, S.J., and Vandenamele, P. (2002). The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 9, 1031-1042.
- van't Land, B., Blijlevens, N.M., Martijn, J., Timal, S., Donnelly, J.P., de Witte, T.J., and M'Rabet, L. (2004). Role of curcumin and the inhibition of NF-kappaB in the onset of chemotherapy-induced mucosal barrier injury. *Leukemia* 18, 276-284.
- Vaux, D.L., and Korsmeyer, S.J. (1999). Cell death in development. *Cell* 96, 245-254.
- Vergne, P., Delvallee, I., and Dumas, C. (1987). Rapid assessment of microspore and pollen development stage in wheat and maize using DAPI and membrane permeabilization. *Stain Technol* 62, 299-304.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.
- Verma, S., Singh, A., and Mishra, A. (2013). Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environ Toxicol Pharmacol* 35, 473-485.
- 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.
- Verrax, J., Dejeans, N., Sid, B., Glorieux, C., and Calderon, P.B. (2011). Intracellular ATP levels determine cell death fate of cancer cells exposed to both standard and redox chemotherapeutic agents. *Biochem Pharmacol* 82, 1540-1548.
- Verrax, J., Taper, H., and Buc Calderon, P. (2008). Targeting cancer cells by an oxidant-based therapy. *Current molecular pharmacology* 1, 80-92.
- Vidya Priyadarsini, R., Senthil Murugan, R., Maitreyi, S., Ramalingam, K., Karunagaran, D., and Nagini, S. (2010). The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF-kappaB inhibition. *Eur J Pharmacol* 649, 84-91.
- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.
- von Ahsen, O., Renken, C., Perkins, G., Kluck, R.M., Bossy-Wetzels, E., and Newmeyer, D.D. (2000). Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol* 150, 1027-1036.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10, 45-65.

Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M.H., Oatis, J.E., Jr., and Walle, U.K. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos* 32, 1377-1382.

Wang, Q., Salman, H., Danilenko, M., and Studzinski, G.P. (2005). Cooperation between antioxidants and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in induction of leukemia HL60 cell differentiation through the JNK/AP-1/Egr-1 pathway. *J Cell Physiol* 204, 964-974.

Wang, Q., Wang, X., and Studzinski, G.P. (2003). Jun N-terminal kinase pathway enhances signaling of monocytic differentiation of human leukemia cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Cell Biochem* 89, 1087-1101.

Wang, X.S., Diener, K., Manthey, C.L., Wang, S., Rosenzweig, B., Bray, J., Delaney, J., Cole, C.N., Chan-Hui, P.Y., Mantlo, N., *et al.* (1997). Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272, 23668-23674.

Wang, Z.Y., and Chen, Z. (2008). Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* 111, 2505-2515.

Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-730.

Welch, W.J. (1991). The role of heat-shock proteins as molecular chaperones. *Curr Opin Cell Biol* 3, 1033-1038.

Weng, C.J., Wu, C.F., Huang, H.W., Wu, C.H., Ho, C.T., and Yen, G.C. (2010). Evaluation of anti-invasion effect of resveratrol and related methoxy analogues on human hepatocarcinoma cells. *J Agric Food Chem* 58, 2886-2894.

Weng, C.J., and Yen, G.C. (2012a). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treat Rev* 38, 76-87.

Weng, C.J., and Yen, G.C. (2012b). Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities. *Cancer Metastasis Rev*.

Weir, N.M., Selvendiran, K., Kutala, V.K., Tong, L., Vishwanath, S., Rajaram, M., Tridandapani, S., Anant, S., and Kuppusamy, P. (2007). Curcumin induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by modulating Akt and p38 MAPK. *Cancer Biol Ther* 6, 178-184.

Willems, L., Tamburini, J., Chapuis, N., Lacombe, C., Mayeux, P., and Bouscary, D. (2012). PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies. *Current oncology reports* 14, 129-138.

Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current opinion in plant biology* 5, 218-223.

Wolter, F., Turchanowa, L., and Stein, J. (2003). Resveratrol-induced modification of polyamine metabolism is accompanied by induction of c-Fos. *Carcinogenesis* 24, 469-474.

Woo, J.H., Kim, Y.H., Choi, Y.J., Kim, D.G., Lee, K.S., Bae, J.H., Min, D.S., Chang, J.S., Jeong, Y.J., Lee, Y.H., *et al.* (2003). Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. *Carcinogenesis* 24, 1199-1208.

Wu, J., Wong, W.W., Khosravi, F., Minden, M.D., and Penn, L.Z. (2004). Blocking the Raf/MEK/ERK pathway sensitizes acute myelogenous leukemia cells to lovastatin-induced apoptosis. *Cancer Res* 64, 6461-6468.

Wu, Y.C., Yen, W.Y., and Yih, L.H. (2008). Requirement of a functional spindle checkpoint for arsenite-induced apoptosis. *J Cell Biochem* 105, 678-687.

Wyllie, A.H. (1987). Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol* 153, 313-316.

Yadav, R.S., Chandravanshi, L.P., Shukla, R.K., Sankhwar, M.L., Ansari, R.W., Shukla, P.K., Pant, A.B., and Khanna, V.K. (2011). Neuroprotective efficacy of curcumin in arsenic induced cholinergic dysfunctions in rats. *Neurotoxicology* 32, 760-768.

Yadav, R.S., Sankhwar, M.L., Shukla, R.K., Chandra, R., Pant, A.B., Islam, F., and Khanna, V.K. (2009). Attenuation of arsenic neurotoxicity by curcumin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 240, 367-376.

Yamamoto, T., Sakaguchi, N., Hachiya, M., Nakayama, F., Yamakawa, M., and Akashi, M. (2009). Role of catalase in monocytic differentiation of U937 cells by TPA: hydrogen peroxide as a second messenger. *Leukemia* 23, 761-769.

Yang, C.S., Wang, X., Lu, G., and Picinich, S.C. (2009). Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat Rev Cancer* 9, 429-439.

Yang, H.L., Chang, W.H., Chia, Y.C., Huang, C.J., Lu, F.J., Hsu, H.K., and Hseu, Y.C. (2006a). *Toona sinensis* extracts induces apoptosis via reactive oxygen species in human premyelocytic leukemia cells. *Food Chem Toxicol* 44, 1978-1988.

Yang, J.H., Hsia, T.C., Kuo, H.M., Chao, P.D., Chou, C.C., Wei, Y.H., and Chung, J.G. (2006b). Inhibition of lung cancer cell growth by quercetin glucuronides via G2/M arrest and induction of apoptosis. *Drug Metab Dispos* 34, 296-304.

Yang, Y.L., and Li, X.M. (2000). The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res* 10, 169-177.

Yen, A., Roberson, M.S., and Varvayanis, S. (1999). Retinoic acid selectively activates the ERK2 but not JNK/SAPK or p38 MAP kinases when inducing myeloid differentiation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35, 527-532.

Yih, L.H., Hsu, N.C., Wu, Y.C., Yen, W.Y., and Kuo, H.H. (2013). Inhibition of AKT enhances mitotic cell apoptosis induced by arsenic trioxide. *Toxicol Appl Pharmacol* 267, 228-237.

Yih, L.H., and Lee, T.C. (2000). Arsenite induces p53 accumulation through an ATM-dependent pathway in human fibroblasts. *Cancer Res* 60, 6346-6352.

Yin, X.M. (2006). Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene* 369, 7-19.

Yoshida, M., Yamamoto, M., and Nikaido, T. (1992). Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res* 52, 6676-6681.

Yu, M., Xue, J., Li, Y., Zhang, W., Ma, D., Liu, L., and Zhang, Z. (2013). Resveratrol protects against arsenic trioxide-induced nephrotoxicity by facilitating arsenic metabolism and decreasing oxidative stress. *Arch Toxicol*.

Yu, W., Fu, Y.C., and Wang, W. (2012). Cellular and molecular effects of resveratrol in health and disease. *J Cell Biochem* 113, 752-759.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-652.

Yuan, S., and Akey, C.W. (2013). Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure* 21, 501-515.

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. *Clin Cancer Res* 12, 3193-3199.

Yuo, A. (2001). Differentiation, apoptosis, and function of human immature and mature myeloid cells: intracellular signaling mechanism. *Int J Hematol* 73, 438-452.

Zafarullah, M., Li, W.Q., Sylvester, J., and Ahmad, M. (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 60, 6-20.

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B., and Kroemer, G. (1995). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 182, 367-377.

Zava, D.T., and Duwe, G. (1997). Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro. *Nutr Cancer* 27, 31-40.

- Zhan, Y., van de Water, B., Wang, Y., and Stevens, J.L. (1999). The roles of caspase-3 and bcl-2 in chemically-induced apoptosis but not necrosis of renal epithelial cells. *Oncogene* 18, 6505-6512.
- Zhang, X., Jia, S., Yang, S., Yang, Y., Yang, T., and Yang, Y. (2012). Arsenic trioxide induces G2/M arrest in hepatocellular carcinoma cells by increasing the tumor suppressor PTEN expression. *J Cell Biochem* 113, 3528-3535.
- Zhang, Y.H., Guo, J.G., Guo, Z.H., and Xie, S.Q. (2011). [Involvement of p38-p53 signal pathway in resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 cells]. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica* 46, 1332-1337.
- Zhao, X.Y., Li, G.Y., Liu, Y., Chai, L.M., Chen, J.X., Zhang, Y., Du, Z.M., Lu, Y.J., and Yang, B.F. (2008). Resveratrol protects against arsenic trioxide-induced cardiotoxicity in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 154, 105-113.
- Zheng, J., and Ramirez, V.D. (2000). Inhibition of mitochondrial proton F0F1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br J Pharmacol* 130, 1115-1123.
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Zou, Y., Spohn, B., and Hung, M.C. (2001). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 3, 973-982.
- Zhuang S, D.J., Kochevar IE. (2000). p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J Biol Chem*.
- Zimmermann, K.C., Bonzon, C., and Green, D.R. (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 92, 57-70.
- Zoratti, M., and Szabo, I. (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241, 139-176.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.
- Zou, J., Huang, Y., Chen, Q., Wang, N., Cao, K., Hsieh, T.C., and Wu, J.M. (1999). Suppression of mitogenesis and regulation of cell cycle traverse by resveratrol in cultured smooth muscle cells. *Int J Oncol* 15, 647-651.
- Zunino, S.J., and Storms, D.H. (2006). Resveratrol-induced apoptosis is enhanced in acute lymphoblastic leukemia cells by modulation of the mitochondrial permeability transition pore. *Cancer Lett* 240, 123-134.

PUBLICACIONES

Los resultados de la presente tesis han dado lugar a la publicación del siguiente artículo:

Sánchez Y*, **Simón GP***, Calviño E, de Blas E, Aller P, 2009. Curcumin stimulates reactive oxygen species production and potentiates apoptosis induction by the antitumor drugs arsenic trioxide and lonidamine in human myeloid leukemia cell lines. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Oct; 335(1):114-23.

* igual contribución al trabajo.

Y ha participado en la elaboración del siguiente artículo:

Calviño E, Estañ MC, **Simón GP**, Sancho P, Boyano-Adánez M del C, de Blas E, Bréard J, Aller P. 2011. Increased apoptotic efficacy of lonidamine plus arsenic trioxide combination in human leukemia cells. Reactive oxygen species generation and defensive protein kinasa (MEK/ERK, Akt/mTOR) modulation. *Biochemical pharmacology.* 82(11):1619-29.

