

TESIS DOCTORAL



**INFLUENCIA DEL MICROAMBIENTE TISULAR EN LA
RESPUESTA CELULAR A LA RADIACIÓN:
IMPORTANCIA DEL ESTADO REDOX**

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Radiología y Medicina Física

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

Sandra Ríos Arrabal

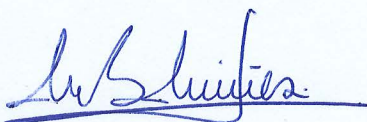
Granada, 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Sandra Ríos Arrabal
D.L.: GR 1895-2014
ISBN: 978-84-9083-075-8

El doctorando Sandra Ríos Arrabal y los directores de la tesis María Isabel Núñez Torres, Josefa León López y Mariana Fátima Fernández Cabrera garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada a de Febrero de 2014

Director/es de la Tesis



Fdo.: María Isabel Núñez Torres

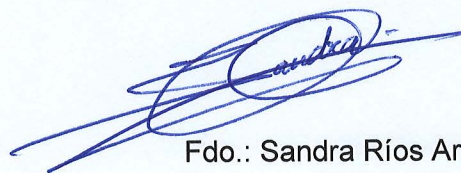


Fdo.: Josefa León López



Fdo.: Mariana Fátima Fernández Cabrera

Doctorando



Fdo.: Sandra Ríos Arrabal

ÍNDICE:

INTRODUCCIÓN

1. RADIOTERAPIA COMO TRATAMIENTO ONCOLÓGICO	1
1.1. Cáncer de mama.....	1
2. LOS RADICALES LIBRES.....	2
2.1. Biología de los radicales libres	2
2.2. Formación de radicales libres.....	3
2.3. Lugar de producción y función de radicales libres.....	5
2.4. Defensa del organismo frente a los radicales libres	6
3. FREE RADICALS IN CARCINOGENESIS	9
3.1. Free radicals and damage in macromolecules. Genetic instability.....	9
3.2. Free radicals as mitogenic signal intermediaries. Remodeling, proliferation, senescence, cell apoptosis, and autophagy	11
3.3. Free radicals and growth factors	13
3.4. Free radicals and tumor suppressor genes	14
3.5. Free radicals and metalloproteases.....	17
3.6. Free radicals and adhesion molecules	18
3.7. Free radicals and extracellular matrix	19
3.8. Free radicals, inflammation, and cancer	19
3.9. Free radicals, ionizing and non-ionizing radiation	21
4. USO DE INHIBIDORES QUIMICOS EN EL BLOQUEO DE LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE.....	23
5. APLICACIÓN DE RNA DE INTERFERENCIA EN BIOLOGÍA MOLECULAR.....	24
5.1. Mecanismo molecular de acción de iRNA (shRNA).....	25
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
6. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	27
7. OBJETIVOS.....	27
MATERIAL Y MÉTODOS	
1. LÍNEAS CELULARES.....	29
1.1. Descripción y mantenimiento de las líneas celulares	29

1.2. Silenciamiento genético mediante RNA de interferencia	30
1.2.1. PCR y Western Blotting	31
1.3. Ensayos de proliferación celular.....	33
2. ESTUDIO DEL PERFIL REDOX.....	34
2.1. Condiciones experimentales.....	34
2.2. Medida de especies reactivas de nitrógeno (RNS) y del oxígeno (ROS).....	36
2.2.1. Medida de la concentración de nitritos.....	36
2.2.2. Medida de especies reactivas del oxígeno (ROS).....	37
2.2.2.1. Citometría de flujo	37
2.3. Medidas de compuestos antioxidantes	38
2.3.1. Glutación Reducido (GSH).....	38
2.3.2. Glutación Oxidado (GSSG)	39
2.4. Medidas de enzimas antioxidantes	40
2.4.1. Glutación Peroxidasa (GPx)	40
2.4.2. Glutación Reductasa (GRd)	41
2.4.3. Medida de proteínas.....	42
3. ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA CELULAR FRENTE RADIACIÓN IONIZANTE.....	43
3.1 Ensayos clonogénicos	43
4. INSTRUMENTACIÓN.....	44
RESULTADOS	
1. CARACTERISTICAS CELULARES.....	51
1.1. Proliferación celular.....	51
1.2. Supervivencia celular frente a radiación ionizante	52
2. ESTUDIO DEL PERFIL REDOX EN LAS LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS.....	53
2.1. Medida de radicales libres	53
2.1.1. Medida de los niveles de especies reactivas del nitrógeno (RNS)	53
2.1.2. Medida de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS)	54
2.2. Medida de elementos antioxidantes.....	57
2.2.1. Medida de GSH y GSSG	57

2.2.2. Medida de GPx y GRd.....	60
3. ESTUDIO DEL PERFIL REDOX EN LAS LÍNEAS CELULARES TRATADAS CON INHIBIDORES QUÍMICOS.....	62
3.1. Medida de GSH y GSSG en el tratamiento con BSO.....	62
3.2. Medida de GPx en el tratamiento con BSO.....	65
3.3. Supervivencia celular a radiación ionizante en líneas celulares tratadas con BSO.....	66
3.4. Medida de GSH y GSSG en el tratamiento con 3-DG	67
3.5. Medida de GPx en el tratamiento con 3-DG	68
3.6. Supervivencia celular a radiación ionizante en líneas celulares tratadas con 3-DG	69
4. ESTUDIO DEL PERFIL REDOX EN LAS LÍNEAS CELULARES TRATADAS MEDIANTE INHIBICIÓN GÉNICA.....	71
4.1. Silenciamiento de GPx1	71
4.2. Medida de GSH y GSSG	73
4.3. Supervivencia celular a radiación ionizante en líneas celulares con el silenciamiento de GPx1	74
DISCUSIÓN	77
CONCLUSIONES	91
ABREVIATURAS	95
BIBLIOGRAFÍA	99

INTRODUCCIÓN

1. RADIOTERAPIA COMO TRATAMIENTO ONCOLÓGICO

1.1. Cáncer de mama

La mayor parte de la investigación realizada en biología tumoral ha estado centrada en entender los mecanismos moleculares relacionados con el proceso de carcinogénesis, progresión tumoral y metástasis. Este hecho ha permitido desarrollar nuevas drogas específicas frente a determinadas rutas de señalización que están implicadas en los procesos celulares que aparecen alterados y conducen al fenotipo maligno.

La Oncología Radioterápica es una de las principales modalidades en el tratamiento del cáncer. Como tratamiento local, su finalidad es conseguir el control loco-regional del tumor mediante la inactivación de las células madre tumorales del tumor primario y de los ganglios linfáticos regionales. La oncología radioterápica es una especialidad que se ha beneficiado de los avances tecnológicos y científicos, lo que ha hecho posible el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y modalidades de tratamiento que emplean terapias más precisas, seguras y eficaces (Vogelzang y cols, 2011; Fraass y cols, 2012; Fay y cols, 2013).

Aproximadamente el 50 % de todos los pacientes con cáncer recibirá radioterapia de alguna forma, sola o en combinación con otras modalidades de tratamiento como la quimioterapia, hormonoterapia, inmunoterapia y terapias biológicas.

El cáncer de mama es un problema principal de salud, con más de 1.000.000 de nuevos casos y 370.000 muertes cada año por todo el mundo (Zurita y cols, 2010). Hoy en día, la radioterapia es el tratamiento de elección mayoritario para su tratamiento, siendo extensamente aplicada en oncología (López y cols, 2005).

El cáncer de mama, cuando es diagnosticado de forma temprana, es abordado con cirugía, obteniéndose un 50-70% en el control local del tumor. Posteriormente se aplica tratamiento radioterápico tanto en la mama como en la región donde se localizan los ganglios linfáticos. El uso de este tratamiento incrementa el control en un 20% unido a un aumento de la supervivencia a largo plazo. A este tratamiento le siguen la hormonoterapia y la quimioterapia (Joiner y cols, 2009). El cáncer de mama

representa un 13% de todos los cánceres diagnosticados, siendo éste también el que tiene mayor porcentaje de pacientes que reciben radioterapia con un 83% de todos los cánceres de mama (Delaney y cols, 2005).

No todos los pacientes responden satisfactoriamente al tratamiento con radiación ionizante. Existen, por un lado, factores clínicos que pueden explicar dichos fracasos, como el tamaño tumoral y/o etapa avanzada del tumor, que se traduce en una mayor muerte celular con la misma dosis de radiación, reduciendo la probabilidad de control local y por otro lado, factores biológicos como el grado de hipoxia, la capacidad de las células que sobreviven y contribuyen al fenómeno de repoblación durante el tiempo de tratamiento (6-7 semanas) y a la radiorresistencia intrínseca de las células del tumor. Es por este motivo que son necesarios tratamientos complementarios para mejorar la radioterapia tanto para aumentar la muerte de células del tumor como para disminuir el daño originado en los tejidos normales que circundan el tumor, que podrían convertirse en reservorio del cáncer. Por esta razón, se hace necesario estudiar las diferencias genéticas y microambientales relacionadas con el tumor, donde van a jugar un papel muy importante, entre otros, los radicales libres presentes tanto en los tejidos normales como tumorales del paciente (Gee y cols, 2003; Begg y cols, 2011).

2. LOS RADICALES LIBRES

2.1. Biología de los radicales libres

El papel que juegan los radicales libres en la génesis de diferentes enfermedades ha sido ampliamente documentado (Okezie y cols, 1991; Polidori y cols, 2001; Jomova y cols, 2011). Además de cumplir funciones celulares específicas, éstos pueden llegar a ser tóxicos para las propias células que los producen o para células cercanas que estén en contacto en un tejido u órgano. Tal es el caso del oxígeno, molécula muy estable que tras su participación en algunas funciones del metabolismo celular puede convertirse en diferentes especies reactivas, algunas de ellas con carácter de radicales libres. Estos radicales libres constituyen el producto o son

utilizados para realizar importantes funciones celulares, especialmente donde la reactividad del oxígeno molecular es insuficiente (Turi y cols, 2002).

La célula genera radicales libres y también degrada estrictamente lo necesario para evitar el daño derivado de una formación no controlada. Sin embargo, diversas circunstancias, tanto de carácter intrínseco como extrínseco, y la actividad bioquímica de la célula, llevan a que ésta pierda el control en la formación y manejo de los radicales libres. Este desequilibrio en la formación y utilización de los radicales libres a nivel tisular, es lo que se conoce como **“estrés oxidativo”**. Ocurre debido a la perturbación del equilibrio entre la formación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y la defensa proporcionada por antioxidantes celulares (Schafer y cols, 2001; Shen y cols, 2011). Este desequilibrio puede causar daño relacionado con diversas patologías humanas (Polidori y cols, 2001). De esta manera, ya se utiliza el término de **“patologías debidas a estrés oxidativo”**, entendidas como aquellas anomalías funcionales o patológicas claramente definidas, que involucran la participación de radicales libres (Mena y cols, 2009; Jomova y cols, 2011). Esta alteración también puede venir afectada por la interacción con diferentes metales como el hierro (Skrzydłewska y cols, 2005; Iolascon y cols, 2009) cobre (Prousek y cols, 2007; Speisky y cols, 2009) cromo (Quiévryn y cols, 2002; Reynolds y cols, 2007) y cobalto (Pourahmad y cols, 2003; Kim y cols, 2008) que conllevan efectos sintomáticos para numerosas enfermedades (Valko y cols, 2006). Muchos procesos inflamatorios que terminan en cáncer, algunas enfermedades de tipo autoinmune y cáncer son atribuidos al efecto directo o indirecto de un estrés oxidativo inducido por radicales libres (Turi y cols, 2002). El empleo de quimioterapia y la radioterapia en el tratamiento del cáncer, también va a favorecer un entorno de estrés oxidativo (Halliwell y cols, 2007; Panis y cols, 2012).

2.2. Formación de radicales libres

Los radicales libres van a presentar una gran inestabilidad y alta reactividad que vendrán determinadas por la presencia de un número impar de electrones en la órbita más externa de sus átomos, hecho que explica la agresividad con la que actúan, ya que

para intentar lograr su "equilibrio" tienden a unirse con electrones de átomos vecinos, dando lugar a reacciones en cadena (Halliwell y cols, 1999; Griendling y cols, 2000).

En primer lugar se forma el radical libre "superóxido" ($O_2^{\cdot-}$) mediante la actuación de la enzima NADPH oxidasa. La mayor producción de este radical superóxido tiene lugar en la mitocondria (Cadenas y cols, 1998). Posteriormente se forma el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), con gran reactividad, mediante la actuación de superóxido dismutasa (SOD) en un proceso conocido como dismutación que ocurre cuando el radical superóxido reacciona consigo mismo formando oxígeno y peróxido de hidrógeno (Griendling y cols, 2000). Un nuevo proceso de reducción, mediante la reacción de Fenton, transforma el peróxido de hidrógeno en el radical libre hidroxilo ($\cdot OH$), y finalmente se forma como producto final el agua mediado por la actuación de catalasas (CAT) o glutatión peroxidasa (GPx) (Griendling y cols, 2000; Jomova y cols, 2011). También en los casos en los que una molécula de oxígeno se une a un protón se formará otro radical libre conocido como radical hidroperóxido ($HO_2^{\cdot-}$) (Cuzzocrea y cols, 2001). A las diferentes formas reactivas del oxígeno se les llama ROS (tabla 1) (Griendling y cols, 2000; Jian y cols, 2005; Valko y cols, 2007).

TABLA 1. Esquema representativo de las diferentes especies reactivas del oxígeno y nitrógeno.

ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO		ESPECIES REACTIVAS DEL NITRÓGENO	
Anión superóxido	$O_2 \xrightarrow[\text{oxidase}]{\text{NADPH}} O_2^{\cdot-}$	Oxido nítrico	$L\text{-Arginina} \xrightarrow[\text{NOS}]{L\text{-Citrulina}} NO\cdot$
Peróxido de hidrógeno	$O_2^{\cdot-} \xrightarrow[\text{SOD}]{O_2} H_2O_2$	Peroxinitrito	$NO\cdot \xrightarrow[\text{O}_2]{O_2^{\cdot-}} ONOO^-$
Radical hidróxilo	$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Fenton reaction}} \cdot OH$	Dióxido de nitrógeno	$ONOO^- \downarrow \rightarrow NO_2\cdot$
Radical hidroperóxido	$O_2 \xrightarrow{H^+} HO_2^{\cdot-}$	Anhídrido nitroso	$NO\cdot \downarrow \rightarrow N_2O_3$

También existen especies reactivas de Nitrógeno (RNS) (tabla 1), bajo estas siglas se incluyen, entre otros, el radical libre Oxído Nítrico ($NO\cdot$), el peroxinitrito ($ONOO^-$), el radical dióxido de nitrógeno ($NO_2\cdot$) y el nitrito (NO_2^-) (Mahelková y cols, 2008). El $NO\cdot$ es sintetizado a partir del grupo guanidino de L-arginina por una enzima

miembro de la familia de óxido nítrico sintetasa (NOSs). La formación de ONOO^- se produce mediante la reacción del $\text{NO}\bullet$ con una molécula de O_2^- (Cuzzocrea y cols, 2001). En esta reacción se generará como intermediario otro radical libre, el dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\bullet$) que podrá reaccionar, con el $\text{NO}\bullet$, para finalmente formar el Anhídrido nitroso, trióxido de nitrógeno (N_2O_3) (Ridnour y cols, 2004; Cuzzocrea y cols, 2001; Valko y cols, 2007).

La enzima NOS tiene diferentes isoformas: neuronal (nNOS o NOSI), inducible (iNOS o NOSII), endotelial (eNOS o NOSIII) mitocondrial (mtNOS), todas son dependientes de NADPH y calmodulina (Singh y cols, 2011). La eNOS es importante en el desarrollo tumoral puesto que va a modular diferentes procesos relacionados con el cáncer como son la apoptosis, angiogénesis, ciclo celular, invasión y metástasis (Dudzinski y cols, 2007). Muchas de las acciones biológicas de $\text{NO}\bullet$ son mediadas por cGMP. El $\text{NO}\bullet$ difunde a células adyacentes y entra fácilmente en el citosol, donde activa cGMP uniéndose al componente “hemo” del hierro girando sobre el anillo de porfirina. Sus efectos citotóxicos, en altas concentraciones, implican la inhibición de enzimas mitocondriales como ubiquinona oxido reductasa, succinato oxido reductasa y aconitasa que son importantes en el metabolismo celular (Nathan y cols, 1992; Cuzzocrea y cols, 2001).

2.3. Lugar de producción y función de radicales libres

Diferentes sistemas metabólicos celulares van a producir constantemente radicales libres del oxígeno. En las mitocondrias se consume el 80% del oxígeno molecular, de éste un 5% se transforma en radicales libres superóxido e hidroxilo. En el retículoendoplasmático liso se metabolizan tanto sustancias endógenas (prostaglandinas, ácidos grasos, etc.) como exógenas (drogas, colorantes, saborizantes, antioxidantes, etc.), consumiendo un 15% del oxígeno molecular, del cual se estima que entre el 20 - 30% se transforma en radicales libres, particularmente en radicales hidroxilo.

También los macrófagos y leucocitos, como mecanismos de defensa contra las bacterias y virus, contribuyen a la formación de radicales libres. En la síntesis de prostaglandinas se utilizan radicales libres, del mismo modo que en la síntesis del

colesterol y las hormonas esteroideas. La hidroxilación de los aminoácidos lisina y prolina a hidroxilisina e hidroxiprolina respectivamente, necesarios para la biosíntesis del colágeno, requiere la participación del radical libre hidroxilo (Wright y cols, 1994).

Por lo tanto los radicales libres, por su función celular, van a ser fundamentales en el metabolismo normal de una célula. No obstante, su presencia constituye un riesgo, especialmente para las grandes moléculas como los ácidos nucleicos, las proteínas, los carbohidratos polimerizados (polisacáridos) y los lípidos, que son preferentemente dañados por los radicales libres oxigenados (Davies y cols, 1987; Wright y cols, 1994; Ferrari y cols, 2009; Ziech y cols, 2010).

2.4. Defensa del organismo frente a los radicales libres

Los antioxidantes constituyen la primera fuente de protección del cuerpo frente a los radicales libres y otros oxidantes, pues son los compuestos que detienen el ataque y la formación de radicales dentro de la célula. Al conjunto de antioxidantes que se encuentran en el organismo se le conoce como estado total de antioxidantes y se nombran bajo las siglas en inglés de TAS (Teixeira y cols, 2013). Estos antioxidantes se encargan de convertirlos en moléculas menos dañinas para el organismo. Ejemplos de estos antioxidantes son las siguientes enzimas: la catalasa de los peroxisomas (CAT), la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la hemooxigenasa (HO-1) (Jones y cols, 2000). Por otro lado es importante considerar el glutatión, que es un compuesto antioxidante responsable del mantenimiento de la homeostasis redox intracelular. Este equilibrio redox es alterado en condiciones de hipoxia, como ocurre en el caso de tumores, con la producción de ROS y NO• (Ogunrinu y cols, 2010). El glutatión existe en los estados reducido (GSH) y oxidado (disulfuro de glutatión, GSSG).

En el estado reducido, es utilizado por la GPx, principal enzima antioxidante, secuestrando ROS y transformándose en su forma oxidada para finalmente ser reciclado mediante la actuación de la enzima glutatión reductasa (GRd). Esta enzima emplea como fuente de electrones la coenzima NADPH, la cual proviene principalmente de la ruta de las pentosas fosfato. El GSH es un cofactor esencial para las enzimas antioxidantes llamadas GSH peroxidasas como GPx, las cuales son utilizadas para detoxificar peróxidos, como por ejemplo el peróxido de hidrógeno, generado en las membranas celulares, que reacciona con el GSH (figura 1).

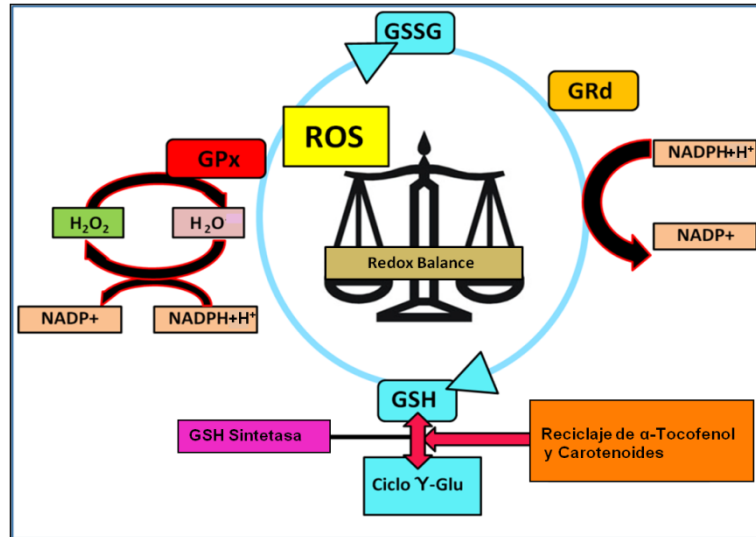


FIGURA 1. Representación funcional del sistema de protección antioxidante

Los peróxidos de hidrogeno van a tener un doble papel en carcinogénesis que explicaremos más adelante (Brigelius y cols, 2009). En las células y tejidos sanos, más del 90% del glutatión total está en la forma reducida (GSH) y menos del 10% existe en la forma disulfuro (GSSG) (Griffith y cols, 1999). Un aumento de la proporción entre GSSG y GSH se considera un indicativo de estrés oxidativo (Martínez y cols, 2006; Valko y cols, 2007; Badjatia y cols, 2010; Delwar y cols, 2011). Es por ello que, en este contexto, los enzimas antioxidantes van a jugar un papel clave.

Como ya comentamos anteriormente, existe un enzima considerado como uno de los más importantes en el sistema antioxidante, la GPx. Hoy en día hay descritas hasta 8 isoformas de glutatión peroxidasa, las isoformas GPx1-4 se encuentran en mamíferos y son selenoproteínas que van a contener selenocisteína en su centro catalítico. La isoforma GPx6 también es una selenoproteína que sólo se ha descrito en humanos. Las isoformas 7 y 8 no contienen selenio y en su lugar tienen cisteína en su centro catalítico (Brigelius-flohé y cols, 2009; Brigelius-flohé y cols, 2012). Todas ellas realizan su función antioxidante en diferentes compartimentos celulares; por ejemplo, la isoforma GPx1 se localiza en el citoplasma y en la mitocondria, la GPx2 en el epitelio intestinal y la GPx3 en el plasma. La isoforma GPx5, que contiene en lugar de serina una cisteína, se secreta en el epidídimo, la GPx6 la podemos encontrar en el epitelio olfativo (Brigelius-flohé y cols, 2012), la GPx7 ha sido encontrada en el lumen del retículo endoplasmático (Nguyen y cols, 2010) y, por último, la isoforma GPx8 es una

proteína de membrana que localiza en la membrana del retículo endoplasmático (Nguyen y cols, 2010).

Las diferentes isoformas van a estar implicadas en diferentes procesos, en algunos casos, van a participar varias de ellas compartiendo su función. La isoforma GPx1 participa en procesos tales como la diabetes (Wang y cols, 2008), la inflamación (Bozinovski y cols, 2012), y el cáncer (Baliga y cols, 2007; Baliga y cols, 2008). En estos dos últimos procesos también participan las isoformas GPx2 y 3 (Tham y cols, 2002; Chu y cols, 2004; Yu y cols, 2007; Brigelius-flohé y cols, 2012). La isoforma GPx3 también participa en obesidad, asociada con estrés oxidativo (Keaney y cols, 2003). La isoforma GPx4 está implicada en el proceso de apoptosis (Norberg y cols, 2010) y también interviene, al igual que la isoforma GPx5, en el proceso de fertilidad (Conrad y cols, 2005; Seligman y cols, 2005). Las isoformas GPx6, 7 y 8, aún hoy en día, queda por aclarar en qué procesos diferentes se van a ver involucradas (Brigelius-flohé y cols, 2012).

La isoforma GPx1 en concreto, juega un papel muy importante en la detoxificación del peróxido de hidrógeno. Diferentes estudios han puesto de manifiesto que tiene una función antioxidante muy importante in vivo y que su labor no puede ser reemplazada por otras selenoproteínas en cuanto a la protección que ofrece frente estrés oxidativo (Flohé y cols, 1989; Ho y cols, 1997; de Haan y cols, 1998). En este sentido, su relación con el cáncer va a ser importante. Se ha observado que este enzima se encuentra alterado en diferentes tipos de células cancerosas. La sobre-expresión de GPx1 puede mostrar efectos antitumorogénicos, eliminando agentes oxidantes. Por otro lado, también podría favorecer la tumorogénesis en células transformadas, bloqueando los mecanismos de apoptosis (Hockenbery y cols, 1993; Cullen y cols, 2003; Liu y cols, 2004; Lei y cols 2007).

Se ha estudiado la relación existente entre p53 y GPx1 en el caso de células gigantes de tumor óseo, tanto benigno como maligno, y se ha observado que existe una relación directa entre la expresión de p53 y GPx1. En los casos analizados donde el gen p53 se encontraba mutado y se sobre-expresaba, GPx1 se mostraba también sobre-expresada. El mayor porcentaje de expresión encontrado de GPx1 en este estudio, se observó en un grupo que presentaba recurrencia de la enfermedad y mayor grado de malignidad, así como el desarrollo de metástasis. Por lo tanto, parece

que las mutaciones en p53 van a jugar un papel importante tanto en el riesgo de recurrencia local como en la malignidad en tumores de células gigantes de tumor óseo y parece que esto lo hará interactuando de alguna forma con Gpx1 (Okubo y cols, 2013). En cambio, en otros trabajos revisados en la literatura científica se ha demostrado que la inducción de la expresión de GPx1 estimulada por TGF- β 1 podría estar protegiendo a líneas celulares de cáncer colorectal del daño inducido por oxidación mediante H₂O₂ (Huang y cols, 2012). Por otro lado, hay estudios que relacionan TGF- β con la inducción mediada por ROS, de la transición epitelio mesénquima en MCF-7 y en células epiteliales tubulares del riñón (Rhyu y cols, 2005; Favre y cols, 2010). Esta inducción puede verse afectada por la sobre-expresión de PNC1 (proteína transportadora de nucleótidos pirimidina). Cuando PNC1 es sobre-expresada disminuye los niveles de ROS y cuando se encuentra suprimida incrementará los niveles de los mismos (Floyd y cols, 2007). La sobre-expresión de PNC1 suprimiría la inducción por TGF- β de la transición epitelio mesénquima siendo por lo tanto dependiente esta última de ROS (Favre y cols, 2010).

3. FREE RADICALS IN CARCINOGENESIS

ROS and RNS contribute in different ways to carcinogenesis and the malignant progression of tumor cells, enhancing their metastatic potential. In fact, they are now considered a distinctive characteristic of cancer. These species lead to genomic damage and genetic instability, and they participate as intermediaries in mitogenic and survival signals *via* growth factor receptors and adhesion molecules, promoting cell mobility, inducing inflammation/repair and angiogenesis in the tumor microenvironment (Klaunig et al, 2004; Valko et al, 2006; Valko et al, 2007; Roberts et al, 2009; Pani et al, 2010; Klaunig et al, 2010; Pande et al, 2011; Fuchs et al, 2013; Pervin et al, 2013).

3.1. Free radicals and damage in macromolecules. Genetic instability

Free radicals may produce breaks and considerable damage in the DNA molecule, producing mutations and eventually cancer. The main source of mutations in

live organisms is DNA damage by oxidation, with an estimated frequency of 10^4 lesions/cell/day in human cells (Coussens et al, 2002; Klaunig et al, 2010). The amino acids that form proteins may also undergo alterations that modify their molecular structure, hindering their biological action. In the case of enzymes, oxidative damage may hinder their catalytic action. Polysaccharides, which play a part in epithelium protection and/or lubrication roles, may also be affected, thereby reducing defenses and favoring inflammations (Zaremba et al, 2010).

Lipids, especially those containing polyunsaturated fatty acids, are especially prone to non-controlled oxidation induced by free radicals. They produce major damage in cell membranes, where these fatty acids have an essential function. The phrase “we age because we oxidize” has been cited by various authors over many years (Wright et al, 1994). There is evidence that oxidation products accumulate in aged individuals. The model of damage to purine and pyrimidine bases suggests that at least part of the damage is inflicted by $\bullet\text{OH}$, suggesting that $\bullet\text{OH}$ is formed in the nucleus. ROS/RNS can also damage mitochondrial DNA, and this damage acquires importance in both human diseases and the aging process (Cuzzocrea et al, 2001). Figure 2 represents the role of ROS/RNS in the carcinogenesis process as previously described.

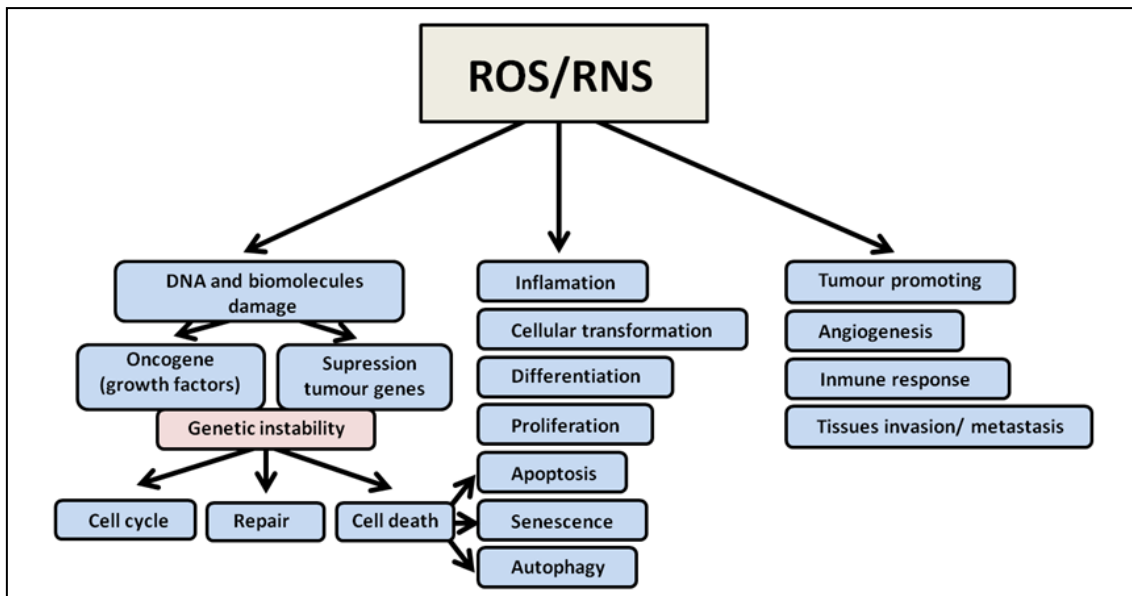


FIGURE 2.ROS/RNS role in the carcinogenesis process. Oxygen and nitrogen reactive species produce damage in the DNA and other biomolecules and play a major role in genetic instability, affecting progression through the cell cycle, cell repair, and the type of cell death (apoptosis, senescence, or autophagy). Free radicals are also important in cell transformation, differentiation, and cell proliferation processes and may be useful for evaluating the tissue inflammatory response. Finally, with respect to carcinogenesis, these radicals have been implicated in tumor progression, angiogenesis, the immune response, and the invasive and metastatic potential of tumor cells.

3.2. Free radicals as mitogenic signal intermediaries. Remodeling, proliferation, senescence, cell apoptosis, and autophagy

The mitogenic response in which mitogen activated protein kinases (MAPKs) and cytokine-mediated signals participate can be reduced by antioxidant enzymes through a direct action on ROS. MAPKs participate in intracellular signal transduction pathways, promoting cell differentiation and survival, arresting growth, apoptosis, and senescence, and thereby generating resistance to radiotherapy and chemotherapy (de la Cruz-Morcillo et al, 2013). The action of ROS as second messenger in inactive receptor transduction continues with the activation of cascade signaling, controlling various cell events such as proliferation, apoptosis, and inflammation. ROS acts on the growth factor stimulus after receptor tyrosine kinases (RTKs) and small GTP proteins – such as Ras and Rac-, and before MAPK members. Ras and Rac proteins appear to be directly related to the production of superoxide anions and therefore to cell transformation. Examples include fibroblasts, whose transformation is largely affected by ROS formation (Behrend et al, 2003). Depending on the cell system, different members of the MAPK family, including p38 MAPK, ERK1 (kinase 1-regulated extracellular signal), and JNK (c-Jun, the Terminal of N- kinase) have proven to have ROS-sensitive kinase activity. The transduction of the cascade signal induced by ROS, culminates in the phosphorylation and transcriptional activation of c-Jun and c-Fos subunits of the AP-1 active nuclear transcription factor (activating protein 1), which in turn activates genes involved in cell proliferation (Behrend et al, 2003; Valko et al, 2006).

Although the ERK pathway is often activated by mitogenic stimuli, p38 can be stimulated by various stress stimuli. The JNK pathway is involved in responses related to oxidative stress, hence controlling oncogenic expression, and it also mediates in cell death by p53-induced apoptosis (Schramek et al, 2011; Raj et al, 2012). JNK inhibition produces changes in senescence and causes a rapid increase in ROS production in the mitochondria and in the response to DNA damage in breast carcinoma cells (MCF-7). This ROS production is attributed to the suppression of Bcl-2 (B cells of lymphoma 2) phosphorylation, causing DNA damage and stimulating the activation of p53 (Lee et al, 2009). Activation of the JNK signaling pathway involves an anti-tumorigenic response,

controlling the oncogene expression. This response is related to the activation of oncogenes that depend on oxidative stress and are controlled by p53 (Schrameket al, 2011).

ROS also intervene in the regulation of the PI3K/AKT (phosphatidyl inositol 3-kinase/protein kinase) pathway, which is related to cell growth, survival, and the activation of transcription factors, e.g., hypoxia inducible factors (HIFs) (Weinberg et al, 2009).

ROS play an important role by favoring activation of the autophagy pathway (serine/threonine protein kinase) mTOR in the setting of oxidative stress. Various studies have reported on the role of ROS in the regulation of genes implicated in this process, including Atg4, beclin-1, and p62 (Mathew et al, 2009; Ravikumar et al, 2010; Z-y et al, 2011; Li et al, 2012). Nutritional deficit leads to an ROS increase that eventually affects mTOR *via* the PI3K/AKT pathway, thereby activating autophagy. PI3K is altered in different tumor types, with consequent effects on the autophagic process (Meley et al, 2006; Scherz et al, 2007; Wong et al, 2010). Oxidative stress in the tumor microenvironment also leads to mitochondrial and aerobic glycolysis dysfunction. It has been observed that cancerous epithelial cells have increased mitochondrial oxidative capacity, showing an elevated enzymatic activity of cytochrome c oxidase (COX) in comparison to normal ductal epithelial cells (Whitaker et al, 2011).

The mitochondrial utilization of NO• involves production of the superoxide anion and of hydrogen peroxide, a species that can spread beyond mitochondria and participate in the modulation of cell proliferation, apoptosis, cell transformation, and cancer. A high level of oxidants has been found in many types of cancer cells, and the introduction of chemical and antioxidant substances can inhibit the proliferation of tumor cells, indicating a critical role for ROS as mediator in the loss of growth control (Behrend et al, 2003; Galliet al, 2003; Batyet al, 2005). NO• is one of the most powerful apoptosis regulators, capable of both inducing and blocking this type of programmed cell death (Donovan et al, 2001; Bulottaet al, 2001). The balance between cancer and cell development is represented by levels of cyclin D1 and MAPKs in tumors and tissues in development. The expression of cyclin D1, a protein involved in cell proliferation control and activation of the pro-proliferative protein ERK1/2 or pro-apoptotic protein p38 MAPK in rat liver tumor cells, is subject to dual effects of H₂O₂:

exposure to high concentrations of H_2O_2 increases the expression of p38 and decreases the expression of ERK1 (Chodoshet al 2002; Galliet al, 2003).

ROS favor the cell senescence observed in the response to constitutively active MAPK proteins. Thus, H_2O_2 produces senescence by halting growth in G1, which is accompanied by an increase in the regulation of tumor suppressor p53 and its transcriptional target p21 (Chen et al, 1998; Behrendet al, 2003). Interestingly, the overexpression of p21 induces an increase in ROS levels, favoring cell senescence. Hence, ROS levels act as key mediators in cell transformation, inducing cell cycle arrest, apoptosis, and cell senescence (Behrend et al, 2003; Batyet al, 2005).

The overexpression of the Nox1 gene (analog of NADPH oxidase) in NIH 3T3 fibroblasts of mice induces excess production of ROS and a transformed phenotype. Consequently, PI3-K (phosphoinositide-e-kinase), RAC, and NADPH oxidase are key players in ROS-mediated cell transformation processes. Rac1 and NADPH oxidase, by producing the $O_2^{\cdot-}$, are also involved in death by apoptosis. This Nox1 overexpression is also observed in different prostate cancer cell lines (PC3, DU145, LNCaP) compared to normal cells, resulting in an increase in ROS (e.g., $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2), indicating that the NAD(P)H oxidase (Nox) system is involved in the extra-mitochondrial generation of ROS and plays a key role in the development of the malignant phenotype in prostate cancer cells (Kumar et al, 2008; Luo et al, 2009).

Different members of the Bcl-2 and Bcl-xL family function as antagonists of ROS production in apoptosis, protecting cells from apoptotic induction by exogenous oxidants (Behrend et al, 2003). One example of the capacity of ROS to induce apoptosis is the action of surfactin, alipoptide produced by *B.subtilis*, which has antitumor, antimicrobial, and anti-mycoplasma activity that phosphorylates JNK in breast cancer cells (MCF-7). This capacity was demonstrated by using N-acetylcysteine/catalase (antioxidant action) to block ROS, which led to the inhibition of apoptosis in the MCF-7 cells (Cao y cols, 2010).

3.3. Free radicals and growth factors

According to recent studies, ROS/RNS participate in the activation of hepatic stellate cells, which are characterized by the production of extracellular matrix and

intense proliferation. The interference between parenchymal cells and non-parenchymal cells plays a major role in hepatic damage and fibrogenesis. ROS participate in fibrogenesis by increasing expression of the platelet growth factor (Muriel et al, 2009; Iglesias-De la Cruz et al, 2001). Most hepatocellular carcinomas originate in cirrhotic livers, and a common hepatocarcinogenesis mechanism is chronic inflammation associated with severe oxidative stress. NO• expression can inhibit or promote tumor development, according to the cell setting and concentration. In its pro-tumorigenic role, NO• induces DNA damage and enhances angiogenesis by stimulating the vascular endothelial growth factor (VEGF), contributing to tumor growth and cell invasion. In a mouse model, studies on inflammation-related colon cancer demonstrated that the genetic deletion of NOS2 may lead to a reduction in tumorigenic capacity and that the inhibition of its activity may reduce the tumor load. Conversely, increased NO• levels also have anti-tumorigenic effects, killing malignant cells and enabling the immune system to eliminate cancerous cells (Galli et al, 2003; Vesper et al, 2010). In breast cancer, A case-control study of serum VEGF levels in breast cancer patients reported elevated malondialdehyde (MDA) levels and TAS levels in the cancer patients (Pande et al, 2011). The same authors also demonstrated a positive correlation between oxidative damage, estimated as 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) levels, and the progression of breast cancer (Pande et al, 2012).

ROS production in tumors induces the regulation of nuclear genes associated with higher metastatic potential: MCL-1 (anti-apoptotic, myeloid leukemia cell 1), HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1 α), and VEGF (Mena et al, 2009).

It has been observed that in highly invasive breast tumor cells, such as MDA-MB-231, the mechanisms that regulate intracellular levels of ROS participate in inhibiting both invasion and migration through a deficiency in OLA1 (negative regulator gene of the antioxidant cell response) (J-w et al, 2009).

3.4. Free radicals and tumor suppressor genes

ROS act directly or indirectly on a wide range of molecules, including protein tyrosine phosphatase (PTP), whose activity is susceptible to the cell redox state and is mainly modified by ROS. PTP has emerged as a type of receptor for ROS signaling, and

its activation initiates a signal transduction flow in which MAPKs frequently intervene. At the end point of this pathway, signals are generally connected to the transcriptional activity in the nucleus. In some cases, signals promote cell proliferation by inducing the expression of proto-oncogenes, including c-fos and c-myc (Mori et al, 2004; Luo et al, 2009).

The increase in NO• has pro-tumorigenic or anti-tumorigenic effects according to the status of the p53 tumor suppressor gene. There is a negative feedback loop between NO• and p53 (Ambs et al, 1998): NO• produces stabilization and accumulation of p53, while the activation of p53 suppresses NOS2. Therefore, NO• leads to an increase in the activity of p53, which in turn promotes apoptosis, cell cycle arrest, and senescence in damaged cells. Hence, NO• may have anti-tumorigenic properties. In the absence of p53, there are cells that are not sensitive to NO• -induced apoptosis or cell cycle arrest; however, in other cell types, NO• can induce cell proliferation. A lesser induction of sarcomas and lymphomas was observed in NOS2-deleted mice that lacked p53, which is compatible with the idea that p53 and NO• cooperate to regulate tumor formation. NO• has antitumor activity, inhibiting cell proliferation, promoting differentiation, and reducing the spread of metastases spreading in different types of tumor cells; it also has pro-tumor activity, favoring tumor growth (Forrester et al, 1996; Brennan et al, 2002; Galli et al, 2003; Zhou et al, 2012).

The transcriptional targets of p53 tumor suppressor gene include antioxidant enzymes and RRM2B genes that regulate the codification of the ribonucleotide reductase subunit, preventing DNA dysfunction in the mitochondrion. The ATM gene is a critical mediator in the response to DNA damage and was also found to stabilize mitochondrial DNA by regulating ribonucleotide reductases. These observations reveal the important role of ROS in tumorigenesis and suggest that optimization of the mitochondrial function (e.g. by redox metabolism and maintaining intracellular oxygen homeostasis) may have a protective role against oxidative damage of genomic DNA (Sung et al, 2010; Goh et al, 2011). Sablina et al (2005) reported that low concentrations of p53 favor the expression of antioxidant genes under conditions of

low cell stress, whereas p53 shows oxidant function to favor the expression of genes that promote both an increase in ROS and induction to apoptosis (Sablina et al, 2005).

BRCA1 is involved in ROS production and in the response to oxidative stress, exerting antioxidant activity by inducing the expression of antioxidant enzymes. It is a multifunctional protein involved in numerous cell processes, including cell cycle control, maintenance of genetic stability, DNA damage repair, apoptosis, and the transcription of different genes. Deficiencies in BRCA1 gene in the presence of H₂O₂ induce the exportation of phosphorylated protein Smad3 from the nucleus to cell cytoplasm (cytoplasmic factor that binds with other proteins to activate or inhibit the transcription of specific genes); this reduces the Smad3-Smad4 interaction mediated by TGF- β (growth factor responsible for activating Smads by phosphorylation) and slightly decreases the transcriptional activity of both proteins, as evidenced in studies on the response to oxidative stress in breast cancer cell lines (e.g., MCF-7) (Li et al, 2009). In mice, deficiencies in this gene were found to produce an excess of ROS production and increase their sensitivity to oxidative stress (Xiao et al 2007; Li et al, 2009).

SIRT3, a tumor suppressor localized in the mitochondrion, is required to maintain mitochondrial integrity and metabolism under conditions of oxidative stress. This gene belongs to a family of sirtuins that regulates a wide variety of intracellular processes and is formed by seven NAD⁺-dependent deacetylase proteins in different cell compartments, including the nucleus (SIRT1, SIRT6, and SIRT7), mitochondrion (SIRT3, SIRT4, and SIRT5), and cytoplasm (SIRT2) (Kim et al, 2010). A deficiency in SIRT3 was reported to increase O₂^{-•} in the mitochondrion, decreasing apoptosis induced by oxidative stress in response to doses of ionizing radiation from 2 to 5 Gy (Kim et al, 2010; Tao et al, 2010).

SMAR1 tumor suppressor gene (cell cycle and apoptotic gene transcription regulator) is repressed in many cases of high histological grade breast cancer and therefore cannot bind to AKR1-4 (antioxidant activity, blocking ROS, and detoxifying), an action mediated by ATM. Hence, it cannot be translocated to the nucleus to exert its function in DNA repair, increasing the antioxidant activity of AKR and favoring tumor progression (Singh et al, 2010).

Both ROS and RNS (RONS) can be increased by oncogene activation. Thus, the activation of RAS signaling leads to a considerable increase in RONS production and contributes to RAS-induced carcinogenesis. RONS can also inhibit tumor formation in certain cell settings, producing inflammation-induced cell senescence in epithelial cells (Schetter et al, 2010).

3.5. Free radicals and metalloproteases

Metalloproteases (MMPs) belong to a family of proteins characterized by a zinc atom in their catalytic site. The members of this family have an important role in cell biology. MMPs can bind to the cell membrane or be secreted into the tumor microenvironment, favoring the disintegration of the extracellular matrix and thereby permitting cells to invade and metastasize (Artacho et al, 2012a). This family includes around 24 members (Leonardo et al, 2009). Nitric oxide activates MMP-9 by nitrosylation of cysteine residues of the pro-peptide, removing the peptides that maintain their catalytic zinc site inactive (Rosenberger et al, 2002; Jian et al, 2005).

Blockade of ROS production by inhibition of the Nox system with a specific cell proliferation inhibitor (e.g., hydroethidine) modulates the activity of the extracellular signaling cascade regulated by ERK1/2 and p38 MAPK (Gurjaret et al, 2001). Finally, it arrests the cell cycle in the G2/M phase, decreases MMP-9 activity, and produces a loss in mitochondrial potential, explaining the increased cell death and reduced cell invasiveness (Kumar et al, 2008).

It has been shown that the overexpression of murine manganese superoxide dismutase (*mgsod2*), which is dependent on the production of H_2O_2 , increases the activity of transcription factors critical for MMP expression and also improves MMP-1 promoter activity *via* Ras – MAPK. Furthermore, the overexpression of Sod2 increases the mRNA levels of MMPs-2,-3,-7,-10,-9,-11, enhancing the metastatic capacity of fibrosarcoma cells implanted in immunodeficient mice (Nelson et al, 2003).

It has been observed that the overexpression of human manganese superoxide dismutase (MnSOD) in the MCF-7 breast cancer cell line stimulates the activation of MMP-2 and increases the levels of ROS (Zhang et al, 2002). The activity of MMP-2 can be modulated according to intracellular levels of RONS. Radiation produces ROS,

including $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 and MnSOD transforms $O_2^{\cdot-}$ into H_2O_2 , which in turn activates MMP-2. In contrast, NO^{\cdot} hinders the formation of ROS by competition. The antioxidant enzymes that remove H_2O_2 , such as CAT and GPx, mentioned above, contribute to MMP-2 inactivation and reduce the tumor invasiveness derived from the action of this MMP (Zhang et al, 2002).

The expression of MMP-3 stimulates the production of Rac1b, a hyperactive form of Rac1 that stimulates ROS production and DNA damage, producing chromosomal instability (Colotta et al, 2009).

3.6. Free radicals and adhesion molecules

Various authors have described cases of post-surgical trauma in which a local inflammatory reaction starts with the focalization of polymorphonuclear (PMN) cells. These activated cells produce ROS that improve the adhesion of tumor cells to the mesothelium, an essential step in tumor progression. A study of the interaction between tumor and endothelial cells in colon and pancreas carcinoma found that levels of adhesion molecules were higher in the presence of the $O_2^{\cdot-}$ (e.g., E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1), increasing the adhesion percentage (Ten et al, 2006).

E-cadherin is a critical mediator in cell adhesion, and its alteration is associated with the dissemination of cancer cells and formation of metastasis (Thiery et al, 2002; Wang et al, 2013). Activation of the Src gene (tyrosine kinase that regulates intracellular signals in cell proliferation) takes place by s-nitrosylation through the action of NO^{\cdot} . β -estradiol-stimulated activation decreases the expression of E-cadherin in MCF-7 breast cancer cell (Rahman et al, 2010). Mori et al observed that E-cadherins change their localization after daily treatment with H_2O_2 for 4 days, with signals dispersed throughout cytoplasm as small dots, suggesting a vesicular localization, with residues at cell margins (Mori et al, 2004; Kheradmand et al, 1998).

Tumor cells may present a situation of epithelium-mesenchymal transition (EMT), by which the transformed cells separate from the basal lamina and reorganize their cytoskeleton, favoring their motility and migration through the surrounding tissue (Polyak et al, 2009). Subsequently, the extracellular matrix (ECM) around the primary tumor must be remodeled in order to permit tumor cells enter the bloodstream. Integrins have an important role in the ECM as support and in cell

binding, and they also participate in cell signaling and therefore the regulation of various processes, including cell proliferation, survival, and migration. There are different signaling pathways for integrins in breast cancer such as TGF- β , PKC, MAPKs, AKT, NF- κ B, and PI3K. Integrin effectors from the Rho-GTPase family, including RhoA, Rac 1, and Cdc42, are involved in the stimulation of cell adhesion and consequently induce ROS production (Vera-Ramirez et al, 2011). In this context, the induction of EMT by ROS modifies the cells of the mammary epithelium and produces Rac-1 overexpression, thereby favoring their invasive capacity (Mori et al, 2004; Vera-Ramirez et al, 2011).

3.7. Free radicals and extracellular matrix

The ECM plays an important role in cell differentiation and apoptosis. Collagen is the main component of the ECM and inhibits the signal of the estrogen receptor (ESR) generator of the hydroxyl radical via Fe²⁺ by the Fenton reaction. Free radicals are important in collagen synthesis and may increase the gene expression of human mesangial cells in the ECM. The hydroxyl radical induces the apoptotic pathway in human tumor cells. Some studies have suggested that collagen blocks the generation of the radical to protect damaged fibroblasts; therefore, collagen remodeling is influenced by free radicals (He et al, 2002; Sethy-Coraciet al, 2005). It has been observed that glucose deprivation may induce ROS production during tumorigenesis, producing a selection of alterations that allow cells to move away from the environment with excess oxidative damage. Antioxidants facilitate the survival of these cells and enhance the formation of cell colonies that are not bound to the ECM. According to these findings, antioxidants promote the survival of cells lacking anchorage to the ECM, which suggests that they may have a dual function in regard to the tumorigenesis process (Schafer et al, 2009).

3.8. Free radicals, inflammation, and cancer

An inflammatory stimulus leads to the recruitment and activation of various immunological cells, including macrophages, neutrophils, and dendritic cells, which facilitate the release and accumulation of RONS. ROS, such as the O₂⁻• and H₂O₂, are

released by leucocytes and other phagocytic cells accumulated in infection sites and wounds. These radicals play an important role in the microbiocidal activity of the innate immune response (Grivennikov et al, 2010). Correct RONS regulation is vital for generating an effective immune response and reducing tissue damage. Activated neutrophils use superoxide radicals as a defense mechanism against bacteria, and this excess release of oxidants is induced by growth factors. ROS production in non-phagocytic cells takes place through activation of the RTK growth receptor (receptor of tyrosine kinase), including activation by different factors, such as platelet growth factor, basic fibroblast growth factor, and epidermal growth factor. Cytokines, tumor necrosis factor, interferon- γ , and interleukins are also ROS-inducers (Coussens et al, 2002; Behrend et al, 2003; Purdomet al, 2005). Furthermore, inflammation in breast cancer is regulated by c-myc, which is modulated by the MAPK pathway, and ROS participate in this signaling pathway, favoring the proliferation and progression of the cancer (Bhattarai et al, 2011). Research is currently under way on the role of obesity-related oxidative stress in chronic inflammation during the onset and progression of breast cancer (Crujeiraset al, 2013).

The NOS2 enzyme is capable of producing very high levels of NO• in response to inflammatory stimuli. It may also S-nitrosylate COX-2 and increases its proinflammatory activity. NOS2 can induce various factors, including inflammatory cytokines and NF- κ B. NOS2 induction in phagocytic cells, such as monocytes, macrophages, and neutrophils, leads to the overexpression of NO•, a key mediator in the immune-inflammatory response. The cell response is determined by the NO• levels in both tumor cells and the tumor microenvironment (Schetter et al, 2010).

The relationship between inflammation and carcinogenesis is increasingly well documented, with numerous reports of cancer originating at sites of previous chronic inflammation (Grivennikov et al, 2010). Studies have been published on changes in morphology and in gene expression of mouse mammary epithelial cells (NMuMG) after prolonged exposure to H₂O₂, which simulates chronic inflammation. Under these oxidation conditions, a phenotypic cell conversion with striking similarities to malignant transformation was observed, including a fibroblastic morphology with intercellular spaces, implying a decrease in intercellular connections (Mori et al, 2004).

RONS and inflammatory cytokines (TNF and IL-1 β) induce the expression of HIF-1 α in cancerous cells by displacing and negatively regulating the c-Myc of MSH2/MSH6 promoter, members of the MMR family (mismatch repair), which are repairers of insertions and deletions in bases. Hydrogen peroxide inactivates MMRs, damaging the enzymes at protein level. NO \bullet induce the positive regulation of DNA methyltransferase, favoring methylation and producing the loss of expression and silencing of the hMLH1 gene, a member of the MMR family. Both NO \bullet and IL-6 enhance DNA methyltransferase activity (Colotta et al, 2009; Artacho et al, 2012b).

NO \bullet induces the hyperphosphorylation of the retinoblastoma protein, releasing the E2F1 factor, which is negatively regulated by Mad2 and is overexpressed in various tumor types, favoring chromosomal instability (Colotta et al, 2009).

The \bullet OH produced during inflammation are very harmful and have been implicated in base modifications, including the formation of thymine, thymidine glycol, 8-OHdG and 5-hydroxymethyluracil. 8-OHdG is a modified guanine that induces a point mutation in the daughter DNA strand and is widely used as an indicator of DNA damage (Glet et al, 2011; Kumar et al, 2012). This mutation is one of the most frequent in different cancers (Wood et al, 2007).

3.9. Free radicals, ionizing and non-ionizing radiation

Ionizing radiation falls directly on DNA, generating charged particles or electrons that carry the kinetic energy provided by photons (X rays, γ rays), producing breaks in phosphodiester bonds. This represents around 30% of DNA damage (Jeggo et al, 2009; Kempner et al, 2011). The remaining damage derives from the action of free radicals. The \bullet OH, which has high biological relevance, is generated by the interaction of ionizing radiation (e.g., X- or gamma rays) with the water molecule in a process known as water "radiolysis". The deposition of energy from radiation also generates hydrogen atoms and hydrated electrons and other molecular products. These include molecular hydrogen, hydrogen peroxide, and peroxyxynitrite, compounds that generate DNA-damage like 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua), 8-OH-dG, 8-oxoguanine and consequently single- and double-strand DNA breaks (Glet et al, 2011).

As already noted, free radicals are important factors in carcinogenesis (Anastassopoulou et al, 2002; Marnett et al, 2000). In the human body, the $\bullet\text{OH}$ has an extraordinarily short life due to collisions with the different and abundant molecules in the biological environment. Scientists have concluded that radiotherapy generates the $\bullet\text{OH}$, which is the free radical most associated with cell death. For its part, the $\text{NO}\bullet$ appears to act as radiosensitizer under conditions of hypoxia, mimicking the effects of oxygen relating on radiation-induced DNA damage (De Ridder et al, 2008; Oronsky et al, 2012; Folkes et al, 2013). The main late complication after radiotherapy in breast cancer is the fibrosis that results from radiation-induced inflammatory responses (Paquette et al, 2007).

Studies on the levels of redox protein and ionizing radiation in breast cancer patients have shown the high cytoplasmic expression of glutathione-S-transferase and low cytoplasmic and nuclear expression of glutathione-peroxidase 3 are correlated with an increase in the risk of local recurrence. Regulation of the redox system in these patients may contribute to protect them against the oxidative stress induced by ionizing radiation (Woolston et al, 2011).

Murley and coworkers observed elevated SOD2 activity when the RKO36 cell line was exposed to a 2Gy X-ray dose and reported a higher resistance to radiation in exposed cells, known as the effect of a response adapted to low radiation doses. According to these authors, SOD2 plays an important role in this response impairment by inducing the superoxide anion, which triggers a ROS cascade that produces damage in the cell nucleus and mitochondria (Murley et al, 2011). It was found that SOD activity is higher in malignant *versus* benign breast tumors, which appears to indicate that excess ROS may predict carcinogenesis (Hasan et al, 2012).

In the case of non-ionizing radiations, exposure to radiofrequency electromagnetic waves (RF-EMW) for a short time period may increase the presence of NADH oxidase enzymes in the cell membrane, augmenting ROS production (Friedman et al, 2007). ROS activate MMPs, which release the epidermal growth factor and activate ERK. Chronic exposure to RF-EMW induces kinase alterations and activates p38 MAPK, which in turn induces phosphorylation through the thermal shock of proteins inhibiting the apoptosis pathway (Leszczynski et al, 2002). Hence, radiation from mobile telephony may accumulate damage in cell DNA, producing uncontrolled

cell proliferation. Chronic exposure to RF-EMW decreases the activity of different catalase enzymes, such as SOD and GPx, reducing the antioxidant capacity of cells (Desai et al, 2009). It has also been observed that exposure to extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMF) induces DNA damage in different tumor cell lines. The effect of ELF-EMF on cell proliferation and DNA damage in studied tumor cell lines is inhibited by pretreatment with antioxidants, demonstrating the role of the redox state in cells (Wolf et al, 2005).

4. USO DE INHIBIDORES QUIMICOS EN EL BLOQUEO DE LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE

Los inhibidores químicos utilizados en este trabajo han sido deoxiglucosona (3-DG) y el butionina sulfoximina (BSO). La 3-DG es un inhibidor de la enzima GPx y le afectará de manera dosis-dependiente. Este inhibidor se detectó, en un principio, como intermediario en la reacción de Maillard en condiciones in vitro. Estudios posteriores han demostrado que es sintetizado en el cuerpo humano mediante la misma reacción Maillard y la vía Piliol (Niwa y cols, 2001). 3-DG va a afectar a la proliferación celular de diferentes líneas celulares, y aquellas más susceptibles de su inhibición son las que muestran niveles bajos de GSH y serán también más sensibles si se encuentran en su fase S del ciclo celular. Mediante la reacción de Maillard, 3-DG se va sintetizar por nuestro organismo, alterando la actividad de enzimas antioxidantes y, como consecuencia, favoreciendo el estrés oxidativo respondiendo a un ciclo de retroalimentación positiva (Shinoda y cols, 1994; Niwa y cols, 2001). A este inhibidor químico también se le atribuyen efectos anticancerosos, y se ha estudiado que en líneas celulares de cáncer hepático va a tener un efecto dependiente de p53, inhibiendo su capacidad de invasión (Loarca y cols, 2013).

Otro inhibidor químico que se ha utilizado ha sido el (BSO). Este compuesto inhibe a los enzimas GPx y a la γ -Glutamyl-cisteina-sintetasa, por lo que limita la tasa de síntesis de GSH e induce estrés oxidativo por depleción de GSH (Gouazé y cols, 2001; Lewis y cols, 2008; Wang y cols, 2006; Liebmann y cols, 1993; Reliene y cols, 2006). La

administración de este agente químico, al provoca una disminución del compuesto GSH, se va a asociar a daño tisular y a apoptosis celular (Takahashi y cols, 2010).

5. APLICACIÓN DE RNA DE INTERFERENCIA EN BIOLOGÍA MOLECULAR

Desde los años 90 se viene estudiando la función del RNA de interferencia y se sabe que interfiere en la regulación de genes y células de todos los organismos (Fire y cols, 1998). Las terapias basadas en el uso del RNA se pueden clasificar según el mecanismo de actividad que incluye la inhibición traslacional del mRNA (antisentido), los RNA de interferencia (iRNA), las moléculas catalíticamente activas de RNA (ribozimas) y los RNAs que se unen a proteínas y a otras moléculas que actúan como ligandos (aptamers) (Burnett y cols, 2012).

Con respecto al uso del iRNA, cada vez está siendo más utilizado en terapias frente al cáncer. Se trata de un proceso natural mediante el cual la expresión de un determinado gen puede ser bloqueada de una forma altamente específica y de forma selectiva. Existen dos tipos de moléculas, el RNA de interferencia pequeño y de doble cadena, sintetizado químicamente (siRNA) o los basados en vectores como es el short hairpin shRNA (horquilla corta) (Fire y cols, 1998). Ambos van a ser diferentes en cuanto a su mecanismo de acción, vías de interferencia, efectos y aplicaciones (Rao y cols, 2009). Mientras que los siRNA son oligonucleótidos antisentido que se van a localizar tanto en el núcleo como en el citoplasma, los shRNA van a ser sintetizados en el núcleo de la célula para, posteriormente, ser transportados al citoplasma donde se incorporarán al complejo RISC para su activación. Los shRNA continuamente pueden ser sintetizados por la maquinaria de la célula hospedadora, por lo tanto, su efecto debería ser mucho más duradero. Por otro lado, las concentraciones necesarias para un silenciamiento eficaz, son por lo general bajas, menos de 5 copias de shRNA, que integrados en el genoma de la célula hospedadora, son suficientes para proporcionar un efecto de silenciamiento estable. El uso de shRNA se convierte en una ventaja con respecto a los siRNA que son requeridos en mayor concentración, impidiendo estabilizar el efecto realizando otros efectos de interferencia no deseados a largo plazo. Por otro lado, el uso de shRNA nos permite utilizar vectores virales y plásmidos

que nos permitirán manipularlos para poder ser regulados e inducidos (Gossen y cols, 1992; Gupta y cols, 2004; Dickins y cols, 2005).

5.1. Mecanismo molecular de acción de iRNA (shRNA)

Después de introducir el shRNA en su vector, en el citoplasma, el vector necesitará ser transportado al núcleo para su posterior transcripción. La primera transcripción genera un pre-shRNA siguiendo una ruta similar a la que siguen los primeros transcriptos de microRNA. La primera transcripción es procesada por el complejo Drosha/DGCR8 que formará los pre-shRNAs. A continuación son transportados al citoplasma vía exportin 5 para ser cargados en el complejo Dicer/TRBP/PACT donde seguidamente serán procesados a shRNA maduro. Este shRNA maduro sigue en el complejo Dicer/TRBP/PACT y permanecerá unido a la proteína Argonata que forma parte del complejo RISC. En este punto se produce la función del RNA de interferencia, bien por escisión o degradación del mRNA, o por supresión translacional vía p-bodies que son pequeños cuerpos degradadores (Pillai y cols, 2005; Thermann y cols, 2007; Valencia-Sanchez y cols, 2006; Parker y cols, 2007).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

6. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Este trabajo se ha planteado para dar respuesta a la siguiente hipótesis: la radiosensibilidad de las células de cáncer de mama está relacionada con la capacidad que estas células tienen para responder y eliminar el estrés oxidativo inducido por radiación ionizante.

Conocer el papel que ejercen, los radicales libres, sobre diferentes líneas celulares tumorales de mama y entender la influencia de sus sistemas antioxidantes en la capacidad de respuesta frente al daño inducido por los radicales libres generados por la radiación ionizante, permitirá entender las diferencias en la radiorresistencia que presentan los pacientes al mismo tratamiento y de esta forma modificar las condiciones que determinen una mejor respuesta. La relación existente, entre la presencia de radicales libres y el proceso de carcinogénesis, convierte a estas especies reactivas y a las enzimas implicadas en su metabolismo en futuras dianas terapéuticas en una enfermedad como es el cáncer.

7. OBJETIVOS

Los objetivos principales de este estudio han sido:

- 1) Conocer la evolución en el tiempo de los niveles de radicales libres y elementos del sistema antioxidante tras aplicar una determinada dosis de radiación ionizante (rayos X) a las diferentes líneas celulares de cáncer de mama.
- 2) Estudiar la influencia de los niveles de diferentes elementos del sistema antioxidante como el glutatión y el enzima glutatión peroxidasa (GPx), mediante el uso de inhibidores químicos y silenciamiento mediante RNA de interferencia, en la respuesta frente a radiación ionizante.
- 3) Comprobar si el estado del perfil redox, a lo largo del tiempo, condiciona la capacidad de respuesta frente al tratamiento con radiación ionizante.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. LÍNEAS CELULARES

1.1. Descripción y mantenimiento de las líneas celulares

Las líneas celulares que hemos utilizado en nuestro trabajo son dos líneas epiteliales de adenocarcinoma humano de mama:

1. MCF-7 (ECACC, 86012803) con el gen p53 en estado salvaje, ER α -positivo, y baja expresión del gen HER2.
2. MDA-MB-231 (ATCC, HTB-26) con el gen p53 mutado, ER α -negativo y baja expresión del gen HER2 (Papanikolaou y cols, 2009).

Ambas líneas celulares han sido adquiridas del banco de líneas celulares que se encuentra situado en el Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada.

Para dar respuesta a los objetivos planteados en este trabajo de Tesis Doctoral, en nuestro laboratorio, se ha llevado a cabo un silenciamiento estable del gen GPx1 mediante el empleo de RNA de interferencia (shRNA) en las dos líneas celulares anteriormente descritas. De esta manera, se han establecido las líneas celulares MDA-MB-231 shGPx1 y su control MDA-MB-231 \emptyset GPx1 y MCF-7 shGPx1 y su control MCF-7 \emptyset GPx1.

Las células han sido mantenidas en cultivo a 37°C en atmósfera del 5% de CO₂ y del 5% de O₂ saturada de humedad. Cada 3-4 días se les cambió el medio de cultivo y cuando las células llegaron al 80-90% de confluencia fueron despegadas con 1 volumen de tripsina a pH 7.5. La tripsina se inactivó con 2 volúmenes de medio y a continuación se sembraron, aproximadamente 1/3, en frascos de 25cm² de superficie con un 80% de medio de cultivo. El medio de cultivo utilizado fue DMEM con 4.5g/L de Glucosa y L-Glutamina (Lonza, OMB187), 2.5mg/ml (Invitrogen, MPP-32-01) y 10% de suero bovino fetal (FBS) (Lonza, OSB005H2). Para las líneas silenciadas se añadió 0.1 μ g/ml de puromicina (Santa Cruz Biotechnology, sc-108071A) utilizado como antibiótico de selección para el silenciamiento de GPx1.

1.2. Silenciamiento genético mediante RNA de interferencia

Para realizar el silenciamiento de GPx1 seguimos el protocolo descrito por Santa Cruz Biotechnology. Sembramos 200000 células/pocillo en una placa de 6 pocillos (9,6 cm²), cuando alcanzaron una confluencia entre el 50-70% realizamos la transfección. Se prepararon dos soluciones, la solución A contenía 1µg de GPx1 sh RNA Plasmid 0,2µg/µl (Santa Cruz Biotechnology, sc-40646-SH) y hasta 100µl de shRNA Plasmid transfección Medium (Santa Cruz Biotechnology, sc-108062), la solución B contenía 3µl de shRNA Plasmid Transfección Reagent 0,2µg/µl (Santa Cruz Biotechnology, sc-108061) y hasta 100µl de shRNA Plasmid transfección Medium (Santa Cruz Biotechnology, sc-108062). La proporción de GPx1 shRNA Plasmid (Santa Cruz Biotechnology, sc-40646-SH) y ShRNA Plasmid Transfección Reagent (Santa Cruz Biotechnology, sc-108061) fue 1:3.

De la misma forma, se procedió para realizar la transfección con el control utilizado para confirmar la selectividad de nuestro plásmido, Control shRNA Plasmid-A (0,2µg/µl) (Santa Cruz Biotechnology, sc-108060). Solución A y B se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 45'. Se lavaron las células con 2ml de medio de cultivo, descrito anteriormente, sin FBS y a continuación añadimos el 20% de la solución mixta y completamos hasta 1ml con medio de cultivo sin FBS. Incubamos durante 5-7 horas en condiciones normales a 37°C y normoxia con un 95% de humedad. Transcurrido este tiempo se añadió un volumen de medio de cultivo al 10% de FBS y a las 48 horas se inició la selección con antibiótico. El antibiótico utilizado fue la puromicina (Santa Cruz Biotechnology, sc-108071A), se realizó previamente una determinación de la toxicidad de este antibiótico en nuestras líneas celulares para determinar la cantidad óptima del mismo (Santa Cruz Biotechnology, sc-108071A).

Para su realización se sembraron las células y a las 24 horas se les añadió diferentes cantidades de puromicina (0.2, 0.4, 0.6 y 0.8µg). Posteriormente, se les cambió el medio de cultivo a las 48 horas y durante los 4 días siguientes.

Transcurrido este tiempo, se les midió la cantidad de células supervivientes con una técnica colorimétrica como es la sulforrodamina al 0.4%. La concentración óptima para la selección fue entre 0.3-0.5µg/ml de puromicina (Santa Cruz Biotechnology, sc-108071A). Estas concentraciones de antibiótico fueron reducidas a 0.1µg/ml (Santa

Cruz Biotechnology, sc-108071A) transcurrido un tiempo en cultivo. Al cabo de una semana y después de mantener las células con el antibiótico de selección, procedimos a aislar los diferentes clones para mantenerlos en cultivo unas dos semanas más. Una vez obtenidos los diferentes clones procedimos para su confirmación por PCR y posteriormente por Western Blotting.

1.2.1. PCR y Western Blotting

Para la confirmación del silenciamiento se realizó una extracción de RNA según el protocolo descrito por la casa comercial qiagen (RNeasy Mini Handbook, Qiagen). Una vez obtenido el lisado celular con el buffer de lisis, se añadió un volumen de etanol al 70% para re-suspenderlo. A continuación, se añadió a las columnas para posteriormente centrifugar a 10000rpm durante 15". Se descartó el decantado y se añadió buffer RW1, repitiendo este paso. A continuación, se añadió buffer RPE y se centrifugó dos veces aumentando el tiempo de centrifugado en la segunda ocasión. Finalmente se procedió a la elución añadiendo un volumen (30-50µl) de agua libre de RNasa y centrifugando durante un minuto a 10000rpm. Posteriormente, y después de cuantificar el RNA, se realizó una RT-PCR para obtener cDNA. Para realizar la RT-PCR se utilizó el modelo (2720 Thermal Cycler Applied Biosystems) siguiendo el protocolo descrito por BioRad. Los reactivos necesarios para un volumen de reacción de 20 µl son: 0,5µg de RNA, 20% de 5xiScript, (Bio Rad, 170-8891), 5% de Rtas (Bio Rad, 170-8891) y completar con H₂O bidestilada. Posteriormente, se procedió a realizar una PCR para la determinación de la expresión del gen GPx1. Para ello, se utilizó el equipo CFX384TM Real-Time PCR Systems (BioRad) y se aplicó el protocolo descrito por BioRad CFX96TM y CFX384TM Real-Time PCR Systems. Los "primers" se utilizaron en las siguientes concentraciones: 300nM de "primer" A (sc-40646-PR), 300nM de "primer" B (sc-40646-PR), 10% de cDNA, 50% de SsoaFast EVAGreen supermix (Bio Rad, 172-5205) y completar con H₂O destilada hasta un volumen de 10µl de reacción. Como genes controles se utilizaron 100nM de 18S "primer" A (Sigma, HA01142260) y 100nM de "primer" B (Sigma, HA01142261) y 100nM de GADPH "primer" A (Sigma, HA01142258) y 100nM de "primer" B (Sigma, HA01142258).

El gradiente de temperatura utilizado para la PCR fue el siguiente:

1. Activación enzimática con un 95°C de temperatura, 30" y 1 ciclo.
2. Desnaturalización con 95°C de temperatura, 1-5" y 40 ciclos.
3. "Annealing" con 60°C de temperatura para GPx1, 52°C para GADPH y 57,9°C para 18S, 1-5" y 40 ciclos. Melt curve con 65-95°C de temperatura, 2-5" y 1 ciclo.

Para terminar los datos fueron procesados mediante el programa Bio-Rad CFX Manager 2.0 y, posteriormente, analizados con el programa GraphPad Prism 5 Demo.

De esta forma, se determinó el grado de silenciamiento adquirido en los diferentes clones.

Finalmente, se realizaron western blot para confirmar la ausencia de proteína.

El primer paso fue obtener un pellet celular de los diferentes clones seleccionados, tras comprobar por PCR, su silenciamiento. A continuación, se lisaron con un volumen de 50 µl de buffer de lisis compuesto por 1% de PMFS (Phenylmethanesulfonyl Fluoride) (Sigma, P7626), 1% de inhibidor de fosfatasa (Sigma, P5726), 1% de inhibidor de proteasa (Sigma, P8340) y un 97% de RIPA (Sigma, R0278).

A continuación, se incubaron en hielo unos 30' y, posteriormente, se centrifugaron a máxima velocidad durante 10' a 4°C. El sobrenadante, se diluyó 1:25 y 1:50 en Tris-HCl 20mM a pH 7.4, y a continuación, se añadió 10µl por triplicado y por muestra a una placa de 96 pocillos de fondo plano. También se preparó la curva patrón con concentraciones de 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA) 1mg/ml en Tris-HCl 20mM a pH 7.4. Se añadió 200µl de reactivo de Bradford (Biorad, 109640) diluido 1:5 en agua. Se incubó durante 5' a temperatura ambiente y se procedió a su lectura en el espectrofotómetro, (DyNiex Technologies) con absorbancia de 595nm.

El siguiente paso fue desnaturalizar las proteínas. Para ello se utilizó una cantidad de proteínas de 100 µg en un volumen de 20µl de reacción con un 25% de tampón 4X (Bio Rad, 161-0791) y 5% de XT Reducing Agent (Bio Rad, 161-0792), el resto se completó con H₂O bidestilada. A continuación, se sometieron a 95 °C de temperatura (ThermoStat plus eppendorf) durante 5'. Transcurrido este tiempo las muestras se corrieron en un gel que contiene un porcentaje de poliacrilamida del 12% (BioRad, 456-1043), junto con 5µl de un peso molecular Presion plus protein kaleidoscope standards (Bio Rad, 161-0375) que se utilizan de referencia para localizar

nuestra proteína en el gel. Después se montó en una cubeta Mini Protean tetra System Warning de Bio Rad con tampón de corrido, conectado a una fuente eléctrica PowerPac Basic de Bio Rad con una intensidad de 200 voltios y un amperaje de 25mA.

Una vez finalizado el proceso, se procedió a realizar la transferencia a una membrana de nitrocelulosa (Bio Rad, 162-0177) previamente tratada durante 30" con methanol al 100%, 1' en H₂O y 15' en tampón de transferencia. Este paso se realizó para acondicionar la membrana y favorecer así el proceso de transferencia de las proteínas que se encuentran en el gel. Una vez lista la membrana, se coloca sobre ella el gel y a modo de sándwich se pusieron dos papeles de filtro especiales Protean XL Size (Bio Rad, 17003969) previamente mantenidos en tampón de transferencia. Una vez unido todo, se pasa un rodillo para evitar las burbujas que puedan interferir en la transferencia y se coloca en el equipo de transferencia (Trans-Blot turbo transfer System de Bio Rad). La transferencia duró unos 30'.

Finalmente, se corta la membrana y se pone a incubar durante toda la noche con una dilución 1/1000 de anticuerpo primario GPx1 (Bionova, EPR3312) con Blotting Grade Blocker (Bio Rad, 170-6404) al 5% en tampón TBS-T 1X. Al día siguiente, se realizaron tres lavados, de la membrana, de 5' con TBS-T 1X. A continuación, se incubaron durante una hora con una dilución 1/2000 del anticuerpo secundario anti rabbit IgG HRP (Abcam, ab6721) frente al anticuerpo primario con Blotting Grade Blocker (Bio Rad, 170-6404) al 5% en tampón TBS-T 1X. Finalmente, tras volver a lavar con TBS-T 1X se incubó con una concentración 1:1, durante 5' con el reactivo de revelado Inmun-Star Wester Chemoluminescence KIT (Bio Rad, 170-5070).

Transcurrido este tiempo, se procedió al revelado mediante el equipo (ChemiDoc XRS System PC de Bio Rad).

1.3. Ensayos de proliferación celular

La cinética de proliferación de las dos líneas celulares se ha llevado a cabo mediante la técnica de la sulforrodamina_B, colorante que tiñe las proteínas de las células y permite relacionar un determinado número de células con un valor determinado de densidad óptica. Se procedió de la siguiente forma:

1. Las células en cultivo, tanto MCF-7 como MDA-MB-231, fueron tripsinizadas, siguiendo los pasos anteriormente descritos y se contaron en cámara de Neubauer.
2. Se prepararon por duplicado concentraciones celulares seriadas, de $10-100 \times 10^3$ células por mililitro. A continuación se añadieron 0.5ml de cada concentración y por duplicado en una placa de 48 pocillos. Las células permanecieron un día en el incubador. El medio utilizado fue el descrito anteriormente. Este experimento se realizó por triplicado.
3. El día siguiente se eliminó el medio y se lavó cada pocillo con el mismo volumen de PBS 1X pH 7.4 atemperado. Se repitió el paso anterior, se eliminó el PBS 1X pH 7.4 y se dejó secar de nuevo.
4. Posteriormente, se fijaron las células con ácido tricloroacético al 10% hasta cubrir el fondo. Se incubó durante 20' en frío y, finalmente, se lavó varias veces con agua y se dejó secar en papel de filtro.
5. A continuación se tiñó con el colorante sulforrodamina al 0.4% con etanol cubriendo el fondo. El colorante se dejó actuar durante 2-3' y se lavó con ácido glacial al 1% en agua destilada para retirar el exceso de colorante. Se secó de nuevo sobre papel de filtro.
6. El último paso consistió en solubilizar el colorante fijado en las células para, posteriormente, medirlo. Para ello, se añadió 0.5ml/pocillo de trishidrometilominometano atemperado y se pasó 0.2ml por duplicado y por pocillo a una placa de 96 pocillos para proceder a su lectura y obtener el valor de absorbancia a 492nm.

2. ESTUDIO DEL PERFIL RÉDOX

2.1. Condiciones experimentales

Las líneas celulares, MDA-MB-231, MDA-MB-231 shGPx1, MDA-MB-231 \emptyset GPx1, MCF-7, MCF-7 shGPx1, MCF-7 \emptyset GPx1, se mantuvieron en cultivo bajo las mismas condiciones explicadas previamente y, cuando las células alcanzaron el 70-80% de confluencia, se llevó a cabo la irradiación. Las células fueron irradiadas con una dosis

de 2Gy y todas permanecieron el mismo tiempo fuera del incubador para evitar, en la medida de lo posible, el error de manipulación.

En los casos en los que se utilizaron los inhibidores químicos, las células fueron pretratadas con éstos durante 24 horas antes de ser irradiadas. Los inhibidores utilizados en este trabajo y previamente descritos en el apartado 5 de la introducción, han sido deoxiglucosona (3-DG), que actúa de manera dosis-dependiente sobre el enzima GPx reduciendo su actividad (Niwa y cols, 2001) y butionina sulfoximina (BSO) que interacciona tanto con el enzima GPx como con el compuesto antioxidante glutatión reducido, GSH (Gouazé y cols, 2001; Lewis y cols, 2008). Una vez alcanzada la confluencia celular óptima, se trató con 100µM de BSO 500mg (Sigma Aldrich, B2515) (Gouazé y cols, 2001) y 150mM de 3-DG 50mg (Sigma Aldrich, 75762) (Niwa y cols, 2001), transcurridas 24 horas se cambió el medio a las células y, posteriormente fueron irradiadas. Una vez irradiadas, las células se pusieron de nuevo en el incubador donde permanecieron el tiempo adecuado para el experimento. A continuación, transcurridos los diferentes tiempos (72, 48, 24 horas, 210, 180, 150, 120, 90, 60, 45, 30, 15, 0 minutos) se recogió el sobrenadante y el “pellet” celular (figura 1).

En los casos en los que se realizaron medidas en el sobrenadante, aproximadamente media hora antes de irradiar se procedió al cambio de medio y se sustituyó por medio sin rojo fenol (Gibco, 21063-029) homólogo al utilizado en cultivo, para impedir que interfiera en la medición. Se recogió el sobrenadante de los diferentes puntos experimentales (incluido el punto control no irradiado). También se recogieron los pellet celulares, una vez retirado el medio de cultivo se añadió PBS 1X, pH 7.4. Con ayuda de una rasqueta se raspó toda la superficie del soporte, posteriormente se pasó a un eppendorf de 1 ml, se centrifugó a 1800rpm durante 5' y a 4°C, a continuación se desechó el sobrenadante y se conservó el pellet. Las muestras se congelaron a -20°C hasta su posterior tratamiento. Estos experimentos se realizaron por triplicado para cada una de las medidas realizadas.

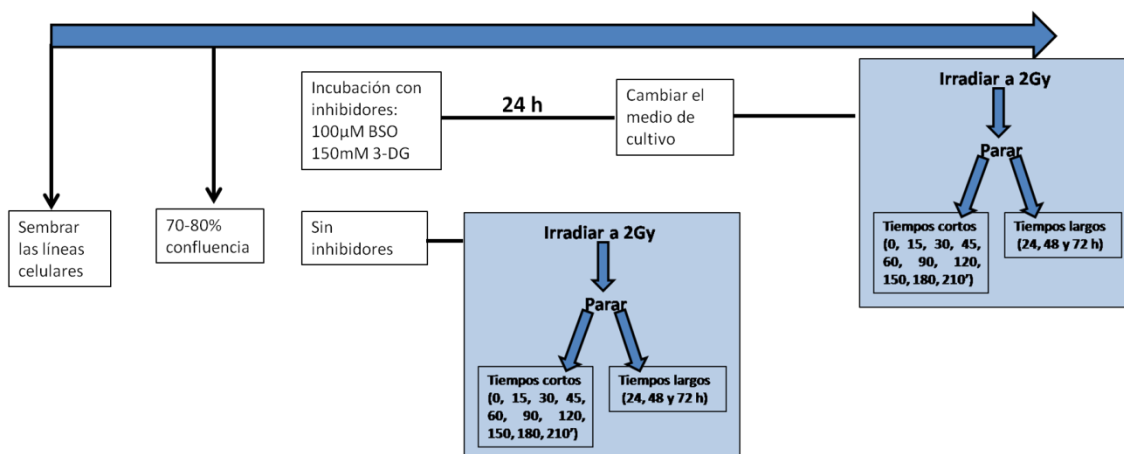


FIGURA 1. Esquema del procedimiento experimental desarrollado

2.2. Medida de especies reactivas de nitrógeno (RNS) y del oxígeno (ROS)

2.2.1. Medida de la concentración de nitritos

Como ya se ha detallado en el apartado 2.2 de introducción, los radicales libres son conocidos como especies reactivas del oxígeno (ROS). Los ROS más relevantes son el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el peroxinitrito ($\text{NO}_2\bullet$). El óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) también es considerado como un radical libre, es un compuesto con una vida media muy corta, por lo que no es posible utilizar métodos convencionales para su detección (Mahelková y cols, 2008). Como la mayor parte del $\text{NO}\bullet$ en el organismo se encuentra en forma de nitrito y nitrato, se puede utilizar la concentración de estos aniones para realizar una medida cuantitativa de la producción de $\text{NO}\bullet$ (Zanón y cols, 2008).

La concentración de nitritos (nmol/ml) se ha medido por triplicado en el sobrenadante de células tumorales (MDA-MB-231 y MCF-7) cultivadas en monocapa. Las medidas se efectuaron a diferentes tiempos tras administrar una dosis de 2 Gy de radiación como queda explicado en el apartado anterior.

Para poder realizar la medición de nitritos se ha aplicado el protocolo descrito en el trabajo de Verdon (Verdon y cols, 1995). Las muestras se trataron con el enzima nitrato reductasa y el cofactor $\text{NAD(P)}\text{H}^+$ para, finalmente, mediante una reacción de reducción transformar los nitratos en nitritos. Su presencia se evidencia mediante la unión con el reactivo de Griess que forma un complejo coloreado que se lee posteriormente por espectrofotometría.

Para la realización de estas medidas, en primer lugar, se procedió a la descongelación de las diferentes muestras de sobrenadantes, a continuación se añadieron 50µl de sobrenadante por duplicado y por muestra a una placa de 96 pocillos de fondo plano. Posteriormente, se añadió a cada pocillo de muestra el 0.05% de NaOH 1.25%, 30mU de Nitrato Reductasa 2000mU/ml (Sigma, N7265), 50mU de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa 25U/ml (Sigma, G6378), 750µM de glucosa 6-fosfato 20mM (Sigma, G7375), 2.13mM de tampón fosfato 14mM pH 7.4 y, finalmente, 3µM de B-nicotinamida ademina dinucleótido fosfato (NADPH) 30µM (Sigma, N1630). Posteriormente, se incubó durante 60' a temperatura ambiente. En el transcurso de este periodo de incubación, se preparó la curva patrón añadiendo 50µl de muestra patrón y 1 volumen de tampón fosfato 14mM pH7.4. Las concentraciones a partir del blanco fueron de 15, 30, 45, 60, 75, 90nmol/ml de NaNO₂ 100µM en tampón fosfato 14mM, pH7.4. Finalizado el periodo de incubación, se añadió a cada pocillo 1 volumen de reactivo de Griess compuesto por una proporción 1:1 de sulfanilamida 1% (Sigma, S9251) y N-1 naptiletileno-diamino dihidroclorido (NEDA) 0.1% (Sigma, N9125). Se incubó durante 10' a temperatura ambiente y se procedió a su lectura en el espectrofotómetro, Dyniex Technologies con absorbancias de 540nm. Los datos se procesaron utilizando hoja de cálculo de Excel y el programa estadístico GraphPad Prism 5 Demo.

2.2.2. Medida de especies reactivas del oxígeno (ROS)

2.2.2.1. Citometría de flujo

Para determinar los niveles de ROS se ha utilizado un kit de Enzo ("ROS Total/Superoxide Detection Kit") (ENZO Life Sciences, 51010), se trata de una técnica que permite estimar, mediante citometria de flujo y microscopia de fluorescencia, por un lado los niveles de ROS totales y por otro los de radicales superoxido (Zhang y cols, 1999; Tarpey y cols, 2001; Batandier, 2002; Gomes y cols, 2005; Wardman y cols, 2007). Se realizaron los mismos pasos ya explicados anteriormente en las mismas condiciones en ambas líneas celulares. Las células se lavaron dos veces con "wash buffer" 1X y a continuación se añadió 3ml de este "buffer" y se despegaron las células con ayuda de una rasqueta, posteriormente se centrifugaron a temperatura ambiente

durante 5' a 2000rpm. Finalmente, se desechó el sobrenadante y se añadió un volumen de 500 µl de Wash buffer, con 1µM de "oxidative stress detection reagent" (verde) 5mM y 1µM de "superoxide detection reagent" (naranja) 5mM. Se incubaron a 37° en oscuridad durante 30' y, transcurrido este tiempo, las muestras se procesaron por citometría de flujo en un equipo modelo FACSAria II 2L de Becton Dickinson. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se analizaron utilizando hoja de cálculo de Excel y el programa estadístico GraphPad Prism 5 Demo.

2.3. Medidas de compuestos antioxidantes

El glutatión es un compuesto antioxidante que existe en los estados reducido (GSH) y oxidado en forma de disulfuro de glutatión (GSSG). Como ya explicamos en el apartado 2.4 de introducción, en el estado reducido, secuestra especies reactivas de oxígeno (ROS), transformándose en su forma oxidada mediante la actuación de la enzima glutatión peroxidasa. En las células y tejidos sanos, más del 90% de glutatión total está en la forma reducida (GSH) y menos del 10% existe en la forma disulfuro (GSSG) (Martínez y cols, 2006; Delwar y cols, 2011). Un aumento de la proporción entre GSSG y GSH se considera indicativo de estrés oxidativo. Para realizar estas medidas se ha seguido el protocolo descrito en el trabajo de Sies (Sies y cols, 1984).

2.3.1. Glutatión reducido (GSH)

Las medidas de los niveles de glutatión (µg/ml) se han realizado por triplicado en el "pellet" celular de ambas líneas celulares tras ser irradiadas.

El fundamento de esta técnica es el siguiente: El GSH reacciona específicamente con el O-ftalaldehído (OPT) a pH 8, aunque se ve afectado por pequeñas variaciones en el pH. El GSSG reacciona con el OPT a pH muy alcalino (>11) y no se afecta por pequeñas variaciones del pH.

Sin embargo, a pH alcalino se incrementa considerablemente la tasa de oxidación del GSH, lo que provocaría una sobreestimación de la concentración de GSSG. Para evitar este fenómeno, se incubó previamente la muestra con N-etil-maleinimida (NEM), que se une específicamente al GSH e impide su oxidación.

Para medir GSH, inicialmente se procedió a la descongelación de las muestras. Una vez descongelados los "pellets" se lisaron con tampón de hemolisis compuesto

por tampón fosfato 10mM y EDTA 1mM a pH 6.25, se probaron varias proporciones, 1:10 y 1:20 siendo la proporción de 1:10 la óptima para ambas líneas celulares. Se dejó actuar el tampón de hemólisis 5' a 4°C, se añadió el mismo volumen de tricloroacético (TCA) al 10% y se centrifugaron a máxima velocidad durante 15' y a 4°C. Las proteínas precipitaron, se desecharon éstas y se conservó el sobrenadante. A continuación, por triplicado, cada muestra se añadió a una placa de 96 pocillos donde se mezclaron 10µl de cada muestra, 0.37mM de OPT 7.4mM (Sigma, P0657) y 90mM de tampón fosfato-EDTA 100mM, 5mM respectivamente a pH 8. Se preparó la curva patrón mezclando 10µl de muestra patrón GSH (Sigma, G6529), 0.37mM de OPT 7.4mM (Sigma, P0657) y 90mM de tampón fosfato-EDTA 100mM, 5mM respectivamente a pH 8. Las concentraciones de las muestras patrón GSH a partir del blanco fueron de 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40µg/ml de GSH (Sigma, G6529) en tampón fosfato-EDTA 100mM, 5mM respectivamente a pH 8. Tras una incubación de 15' a temperatura ambiente se procedió a la lectura de fluorescencia en lector de placa (DyNiex Technologies), con absorbancias de $\lambda_{exc}=350nm$ y $\lambda_{em}=420nm$. Los datos se procesaron utilizando hoja de cálculo de Excel y el programa estadístico GraphPad Prism 5 Demo.

2.3.2. Glutati3n oxidado (GSSG)

Para medir la concentraci3n de GSSG (µg/ml) se procedió como ya se ha descrito anteriormente, se lisaron las muestras con tamp3n de hemólisis compuesto por tamp3n fosfato 10mM y EDTA 1mM a pH 6.25, se probaron varias proporciones, 1:10 y 1:20 siendo la proporción de 1:10 la óptima para la línea celular MDA-MB-231 y 1:5 para la línea celular MCF-7. Se dejó actuar durante 5' a 4°C, se añadió el mismo volumen de tricloroacético (TCA) al 10% y se centrifugaron a máxima velocidad durante 15' a 4°C conservando el sobrenadante. A continuación mezclamos 25µl del lisado anterior con 11,43mM de NEM 40mM (Sigma, E3876). Se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se neutralizó con 860µM de NaOH 0.1N. Finalmente, por triplicado, cada muestra se pasó a una placa de 96 pocillos donde se mezclaron 10µl de cada muestra con 0.37mM de OPT 7.4mM (Sigma, P0657) y 90mM de NaOH 0.1N. Se preparó la curva patr3n mezclando 10µl de muestra patr3n GSSG (Sigma, G4626) con 0.37mM de OPT 7.4mM (Sigma, P0657) y 90mM de NaOH 0.1N.

Las concentraciones de las muestras patrón GSSG a partir del blanco fueron de 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 μ g/ml de GSSG (Sigma, G4626) en NaOH 0.1N. Tras una incubación de 15' a temperatura ambiente, se procedió a la lectura de fluorescencia en lector de placa marca, Dyniex Technologies, con absorbancias de $\lambda_{exc}=350\text{nm}$ y $\lambda_{em}=420\text{nm}$. Los datos se procesaron utilizando hoja de cálculo de Excel y el programa estadístico GraphPad Prism 5 Demo.

2.4. Medidas de enzimas antioxidantes

2.4.1. Glutación peroxidasa (GPx)

Se ha medido la actividad enzimática de la GPx (nmol/min mg de proteínas) por triplado en ambas líneas celulares irradiadas, como se ha comentado anteriormente. La glutación peroxidasa es un enzima antioxidante que se va a encargar de disminuir la acción dañina de los ROS mediante la actuación, por oxidación, del glutación y, para ello, se ha utilizado el protocolo descrito en el trabajo de *Rotruck* (Rotruck y cols, 1973).

En primer lugar, las muestras fueron descongeladas. Una vez descongelados, los "pellets" se lisaron con tampón de hemolisis compuesto por tampón fosfato 10mM y EDTA 1mM a pH 6.25, se probaron, de nuevo, varias proporciones, 1:10 y 1:20 siendo la proporción de 1:10 la óptima para ambas líneas celulares. Se dejó reposar durante 5' a 4°C y se centrifugaron a máxima velocidad 10', a 4°C y se conservó el sobrenadante. A continuación, se procedió al ajuste de la dilución de cumeno hidroperóxido (CH). El CH a altas concentraciones oxida al NADPH. Se probaron varias diluciones hasta que la pendiente de la recta de descenso de absorbancia fue insignificante, aunque no nula. Se hicieron varias diluciones desde 1:100 hasta 1:1000. Para ello se midieron las siguientes diluciones: 1:100, 1:200, 1:400, 1:600, 1:800, 1:1000 de CH 36mM (Sigma, 247502).

Se añadió en un "eppendorf" 4mM de tampón fosfato 100mM, pH7.5-EDTA 1mM (TA), 200 μ M de B-nicotinamida ademina dinucleótido fosfato (NADPH) 20mM (Sigma, N1630), 2mM de GSH 20mM (Sigma, G6529), 4.3mM de azida sódica 0.43M (Sigma, S8032), 0.33U/ml de glutación reductasa (GRd) 460U/ml (Sigma, G3664) y se completó hasta 500 μ l con TA. Posteriormente, se incubó durante 5' a temperatura ambiente, añadiendo diferentes concentraciones de cumeno hidroperóxido e

inmediatamente leyendo la disminución de la absorbancia a 340nm durante 3'. La concentración idónea para realizar todas las medidas fue la dilución 1:200 de CH 36mM (Sigma, 247502). Para cada muestra medimos tanto la reacción no catalizada (blanco de muestra) como reacción catalizada.

La reacción no catalizada se compone de 20µl de la muestra, 4.3mM de azida sódica 0.43M (Sigma, S8032), 200µM de B-nicotinamida ademina dinucleótido fosfato (NADPH) 20Mm (Sigma, N1630) y 94 mM de TA 100mM.

La reacción catalizada se compone de 20µl de la muestra, 200µM de B-nicotinamida ademina dinucleótido fosfato (NADPH) 20mM (Sigma, N1630), 2mM de GSH 20mM (Sigma, G6529), 4.3mM de azida sódica 0.43M (Sigma, S8032), 0.33U/ml de glutatión reductasa (Grd) 460U/ml (Sigma, G3664) y 83.2mM de TA 100mM.

Para ambas reacciones se incubó durante 5' a temperatura ambiente, se añadió 5.75µM de CH 180µM (Sigma, 247502) y finalmente se leyó la disminución de la absorbancia en espectrofotómetro (Bionate 3 Thermo Spectronic), con absorbancia de 340nm durante 3'.

Los resultados se obtuvieron mediante los siguientes cálculos:

$$1- \Delta A_{340} (\text{min}^{-1}) = A_{340} (\text{REACCIÓN CATALIZADA}) - A_{340} (\text{REACCIÓN NO CATALIZADA})$$

$$2- \text{ACTIVIDAD GPx (n mol/ min mg PROT)} = (A_{340}/0.00622) (\text{volumen medido/volumen de muestra}) \text{FD (1/[PROT])}$$

Si expresamos [PROT]= mg/ml.

Los datos obtenidos se procesaron utilizando la hoja de cálculo de Excel y el programa estadístico GraphPad Prism 5 Demo.

2.4.2. Glutatión reductasa (GRd)

Para determinar la actividad enzimática de GRd (nmol/min mg proteínas) se procedió igual que para el caso de la GPx, en este caso se utilizó el protocolo descrito por Carlberg (Carlberg y cols, 1985). Este enzima recicla el glutatión, lo transforma en su forma reducida a partir de la oxidada, para de esta forma poder seguir ejerciendo su acción protectora frente los ROS.

Las muestras fueron descongeladas y posteriormente los "pellets" se lisaron con tampón de hemolisis compuesto por tampón fosfato 10mM y EDTA 1mM a pH

6.25, se probaron varias proporciones, 1:5 y 1:10 siendo la proporción de 1:5 la óptima para ambas líneas celulares. Se dejó reposar durante 5' a 4°C y se centrifugaron a máxima velocidad durante 10' a 4°C y se conservó el sobrenadante. Para cada muestra se midió tanto la reacción no catalizada (blanco de muestra) como la reacción catalizada.

En este caso, la reacción no catalizada se compone de 17.5µl de muestra, 8.6mM de azida sódica 0.43M y 91mM de TA 100mM. La reacción catalizada se compone de 17.5µl de muestra, 8.6mM de azida sódica 0.43M (Sigma, S8032), 2.5mM de GSSG 75mM (Sigma, G4626) y 87.7mM de TA 100mM.

Para ambas reacciones se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, se añadió 0.4mM de B-nicotinamida ademina dinucleótido fosfato (NADPH) 20mM (Sigma, N1630) y, finalmente, se leyó la disminución de la absorbancia en espectrofotómetro (Bionate 3 Thermo Spectronic), con absorbancia de 340nm durante 3'. Los datos se procesaron igual que para el caso de la enzima GPx.

2.4.3. Medida de proteínas

Los resultados de actividad enzimática tanto de glutatión peroxidasa como reductasa y los valores de las medidas de glutatión, reducido y oxidado, se ajustaron en función de la concentración en miligramos por mililitro de proteínas totales. Para ello, se realizaron los mismos pasos ya explicados anteriormente, por triplicado, bajo las mismas condiciones y en ambas líneas celulares. El protocolo que se siguió fue el de *Bradford* (Bradford, 1976) que se trata de un método colorimétrico que permite cuantificar proteínas de forma rápida. Las muestras se lisaron con tampón de hemólisis compuesto por tampón fosfato 10mM y EDTA 1mM a pH 6.25, se probaron varias proporciones, 1:10 y 1:20 siendo la proporción de 1:10 la óptima para ambas líneas celulares. Se dejó reposar durante 5' a 4°C y se centrifugaron a máxima velocidad durante 10' a 4°C y se conservó el sobrenadante.

Posteriormente, se diluyó la muestra 1:5 y 1:10 en Tris-HCl 20mM a pH 7.4, a continuación, añadimos 10µl por triplicado y por muestra a una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se preparó la curva patrón con concentraciones que a partir del blanco fueron de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA) 1mg/ml en Tris-HCl 20mM a pH 7.4. Se añade 200µl de reactivo de Bradford (Biorad, 109640) diluido 1:5 en agua. Se incubó durante 5' a temperatura ambiente y se procedió a su

lectura en el espectrofotómetro, (DyNiex Technologies) con absorbancia de 595 nm. Los datos fueron procesados utilizando hoja de cálculo de Excel y el programa estadístico GraphPad Prism 5 Demo.

3. ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA CELULAR FRENTE RADIACIÓN IONIZANTE

3.1. Ensayos clonogénicos

Estos experimentos permitieron estimar la supervivencia celular, en ambas líneas celulares, mediante la realización de curvas dosis-respuesta. Para llevar a cabo la irradiación se ha utilizado un equipo de rayos X (Krautkramer-Foster, modelo Smart del 2006) y bajo unas condiciones de intensidad y potencia de 4.5mA y 200Kv, respectivamente. Las dosis de radiación ionizante, rayos X, empleadas han sido 0,5, 1, 2, 4 y 6 Gy.

Para realizar estos ensayos, inicialmente se procedió, igual que en el apartado anterior, realizando concentraciones seriadas de células, de 200-1400 células por mililitro y por duplicado. Posteriormente se sembraron en frascos de 25cm² y se dejaron en cultivo durante un día. Transcurrido este tiempo las células fueron irradiadas. Las dosis utilizadas fueron 0.5, 1, 2, 4, 6 Gy y un control sin irradiar. A cada dosis de radiación le corresponde una concentración determinada de células que va en aumento conforme se incrementa la dosis de radiación utilizada. Después de ser irradiadas se mantuvieron en el incubador durante dos semanas. En los casos en los que utilizamos los inhibidores químicos, las células fueron pretratadas durante 24 horas antes de ser irradiadas con 150mM de deoxiglucosona (3-DG) 50mg (Sigma Aldrich, 75762) y 100µM de BSO 500mg de Butionina Sulfoximina (BSO) (Sigma Aldrich, B2515). Transcurrido estas 24 horas se les cambio el medio y posteriormente fueron irradiadas.

Finalmente, las células se extrajeron del incubador, se les retiró el medio de cultivo y se añadió violeta de genciana (ICN Biomedicals, 101775), colorante que se utilizó para teñir las colonias. Se dejó actuar durante 2-3' y se lavaron con abundante agua. Se dejó secar y se procedió al recuento del número de colonias utilizando un

Influencia del microambiente tisular en la respuesta celular a la radiación: Importancia del estado redox

microscopio óptico. Se consideró colonia a toda aquella agrupación de células con, al menos, 50 células. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

La fracción de supervivencia celular (FS) se calculó mediante la expresión:

$$FS = \frac{\text{Número de colonias observado}}{\text{Número de células sembrado} \times \text{eficiencia de clonaje}}$$

Los datos de supervivencia obtenidos se ajustaron al modelo lineal-cuadrático y de esta forma se han podido calcular los valores de fracción de supervivencia a 2 Gy (FS₂) y los parámetros α y β de la curva de supervivencia celular como indicadores de la radiosensibilidad intrínseca.

La ecuación matemática del modelo lineal cuadrático (L-Q) es la siguiente:

$$FS = \exp [-(\alpha D + \beta D^2)]$$

4. INSTRUMENTACIÓN

Para el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral se ha utilizado la instrumentación disponible en la unidad de apoyo a la investigación (UNAI) del hospital universitario San Cecilio de Granada.

Campana de flujo laminar:

Para el mantenimiento del cultivo celular utilizado en este trabajo, hemos trabajado bajo condiciones de esterilidad y en campana de flujo laminar modelo Telstar Bio-II-A/M, Class II Cabinet con certificado EN-12469-2000. Este tipo de campana nos permite controlar la contaminación microbiológica en el aire mediante dos procedimientos básicos simultáneos. Uno la introducción de aire estéril por medio de filtros absolutos HEPA ya que éstos retienen partículas desde 0.3 micras en adelante y su diseño interno obliga a las partículas a detenerse en el medio filtrante, su alta eficiencia es de 99.99% permite asegurar este resultado. El segundo procedimiento es introducir esa masa de aire ultrafiltrado en un ambiente confinado a

velocidades muy bajas con lo cual el aire avanza en una sola dirección tomando la forma de los objetos que encuentra a su paso por el área evitando contaminación exterior y aquella que podría provenir de los objetos dentro de la zona de trabajo. Este equipo tiene una excelente función cuando se manejan productos, materiales y procesos que tengan un riesgo bajo, protegiendo al personal, al producto y al medio ambiente.

Incubador:

El incubador utilizado en el mantenimiento de nuestro cultivo celular es el modelo Sanyo CO₂ Inc con unas dimensiones interiores de 490 x 523 x 665 mm y exteriores de 620 x 710 x 900 mm. Ofrece un rango de concentración de CO₂ que va desde 0 al 20% siendo el utilizado en cultivo celular el del 5%, este CO₂ es suministrado desde el exterior mediante conexión a una botella de gas CO₂. Alcanza temperaturas de hasta 50°C manteniendo un control de temperatura de 37°C para cultivo celular con una humedad del 95%. Para el mantenimiento de esta humedad contienen una bandeja con agua que incluye un sensor de nivel. Para garantizar el control de las condiciones estériles está provisto de una lámpara ultravioleta interna. Tienen doble cierre con una puerta de cristal que aísla del exterior y está en contacto con la parte interna del incubador y más al exterior contiene otra puerta con un revestimiento aislante especial para el mantenimiento de las condiciones óptimas de cultivo celular.

Microscopio óptico:

Para el control del crecimiento continuo en cultivo celular de las líneas utilizadas en este trabajo hemos utilizado un microscopio óptico situado en la sala de cultivo celular y de modelo Olympus 1X51 conectado a una fuente de alimentación Olympus TH4-200. Este microscopio óptico está provisto de tres objetivos de diferente graduación que van desde el menor de 4x de color rojo, pasando por el de 10x de color amarillo y terminando por el de 20x de color blanco.

Equipo de rayos X:

Para llevar a cabo la irradiación se ha utilizado un irradiador para animales de experimentación y cultivos celulares. Este equipo de rayos X (Krautkramer-Foster, modelo Smart del 2006) se utiliza bajo unas condiciones de intensidad y potencia de 4.5mA y 200Kv, respectivamente. Este equipo esta compuesto de una unidad tanque SMART 200 con tubo direccional refrigerado por aire con ventilador y con una potencia que oscila entre los 60 y los 200Kv en pasos de 1Kv. El rango de mA va desde los 0,5mA a los 4,5mA en pasos de 0,1mA. También contiene una unidad de control SMART 583 con pulsadores para Rayos X en ON que ilumina en verde cuando se encuentra en stand-by y OFF que emite luz roja cuando ON se encuentra activado en alta tensión. Un conmutador con llaves en tres posiciones (ON, OFF y safe) y un teclado con 16 teclas para introducir y modificar diferentes parámetros entre los cuales se encuentra el tiempo, dependiendo de la dosis, en Greis (Gy), que queramos aplicar, los Kv y los mA.

En este monitor también se podrá controlar la temperatura, presión, mediante el comando "función 99". Esta cabina de rayos X está fabricada en forma de paneles de plomo laminado entre placas de acero. Todo ello montado en soporte de acero para facilitar su sujeción. Para la eliminación de fugas de radiación en irradiaciones sin colimador, se añadió una lámina de plomo en el solapamiento interior de la puerta. Las dimensiones son: 1030 mm de largo, 600 mm de ancho y 1015 + 850 mm (patas) de alto. También contiene un soporte para tubo bipolar de rayos X, monitor de radiación y diversos accesorios y mejoras como son un portamuestras regulable en altura, plataforma rotativa para mejorar la heterogeneidad del campo, aislamiento acústico del tubo y colimadores entre otros. Este equipo de rayos x se encuentra ubicado en un área específica y concreta de instalaciones radiactivas de segunda categoría y bajo la inspección anual del Consejo de seguridad Nuclear con revisiones semanales y mensuales del servicio de radiofísica y protección radiológica y el supervisor de dicho área respectivamente, pertenecientes al Hospital Clínico Universitario San Cecilio.

Equipo de RT-PCR:

Este termociclador, modelo 2720 Thermal Cycler de Applied Biosystems, permite utilizar un número máximo de 96 muestras en tubos de 200µl de capacidad. Es

un instrumento que nos sirve tanto para realizar PCR como secuenciar diferentes muestras.

Equipo de PCR:

El equipo CFX384™ Real-Time PCR Systems de BioRad se trata de un sistema de detección que combina, un termociclador C1000 Touch™ con una reacción óptica modulada CFX384™ de fácil uso tratándose de una forma rápida para la obtención de datos. Se trata de un equipo con alta precisión y sensibilidad que permite en tiempo real y mediante práctico software, trabajar con los resultados de forma funcional. Contiene un sistema óptico compuesto por 5 filtros LEDs y 5 filtros fotodiodos, 4 puntos de detección y tiene su propia autonomía para trabajar de forma independiente sin necesidad de estar conectado a un ordenador.

Nanofotómetro:

Para la cuantificación del material genético, en nuestro caso concreto hemos realizado medidas de RNA, hemos utilizado un espectrofotómetro modelo NanoPhotometer Pearl de Bionova científica. Este aparato nos permite medir dsDNA, ssDNA, RNA y proteínas. Estas medidas podrán ser tomadas en volúmenes muy pequeños entre los 0,7-10µl determinando concentraciones desde 2-8000ng/µl y en función de los diferentes factores de dilución (FD) (5, 10, 50 y 100) que utilizemos para realizar la cuantificación, siendo de 2-400ng/µl para el FD 5, 3-800 ng/µl para el FD 10, 16,5-4000 para FD 50 y de 33-8000 si utilizamos el FD 100. Su rango de absorbancia va desde 0,010 a 1,6 Abs con una exactitud de ± 2 nm.

ChemiDoc XRS System PC:

Este equipo es un sistema avanzado de detección quimioluminiscente. Este sistema permite la cuantificación de imágenes quimioluminiscentes, fluorescentes y muestras colorimétricas. Podrá ser utilizado con diferentes métodos de detección usados para la realización de diferentes técnicas como son la de western blotting, detección de ácidos nucleicos, electroforesis en geles de 2 dimensiones, densitometría y contaje de colonias. Este equipo contiene una cámara de alta resolución con 1,44

megapíxel y un software Quantity One 1-D que permite analizar las imágenes obtenidas.

Microscopio de Fluorescencia:

Hemos utilizado dos Microscopios de fluorescencia, un microscopio invertido DMIRB Laser Leica Confocal Espectral TSC-SP2 (Láser Argón 458 nm, 488 nm; Láser He/Ne 543 nm, 633 nm) y un microscopio Leica DMRB con cámara color Leica CD200. El uso de ambos tipos de microscopio nos ha permitido visualizar y determinar diferentes moléculas en nuestras muestras de cultivo celular. La aplicación de distintos marcadores que van a emitir fluorescencia a diferente longitud de onda y el uso de estos microscopios, nos permitirá la obtención de imágenes que representaran los diferentes colores en función de las diferentes moléculas marcadas.

Citómetro:

El citómetro utilizado en esta tesis es el modelo FACSAria II 2L (Láser 488nm, láser 633 nm). Este citómetro permite la determinación de 9 parámetros (FSC, SSC, 5 detectores fluorescencia para láser 488, 2 detectores fluorescencia láser 633) con sistema de separación celular (cell sorting). Nos va a permitir realizar las diferentes medidas como son el ciclo celular, estrés oxidativo, despolarización mitocondrial, muerte celular (apoptosis, necrosis, autofagia), fenotipage, cuantificación de proteínas de membrana o intracelulares, aislamiento celular de poblaciones puras y determinación de citoquinas (Multiplex Bead Array System).

Lector de placas Dyniex Technologies Triad:

Este espectrofotómetro nos permite medir a diferentes longitudes de onda. Contiene filtros de emisión y de excitación. La longitud de onda para medir la fluorescencia en la parte superior es entre 230 y 750nm y en la parte inferior es de 300 a 650nm. Con este aparato podemos medir muestras utilizando placas multipocillo. Se pueden utilizar placas de 6, 12, 24, 48 y 96 pocillos. Contiene un total de 4 filtros, EX21 para medir absorbancia de 540 nm, EX2 para las absorbancias de 260, 340, 405, 450, 595 y 620 nm, EXP1 para medir fluorescencia de 370, 485 y 535 nm y por último EMP para medir florescencias de 430, 535, 595 y 625 nm.

Otros instrumentos que se han utilizado son:

Baño termostático - Memmert

Microcentrífuga - eppendorf 5415R

Centrífuga - eppendorf 5810R

Micro pipetas (1 canal) - eppendorf research plus (0,5 - 10 μ l; 10 - 100 μ l; 20 - 200 μ l; 100 - 1000 μ l).

RESULTADOS

1. CARACTERISTICAS CELULARES

1.1. Proliferación celular

La figura 1 muestra la cinética de proliferación de las líneas MCF-7 y MDA-MB-231.

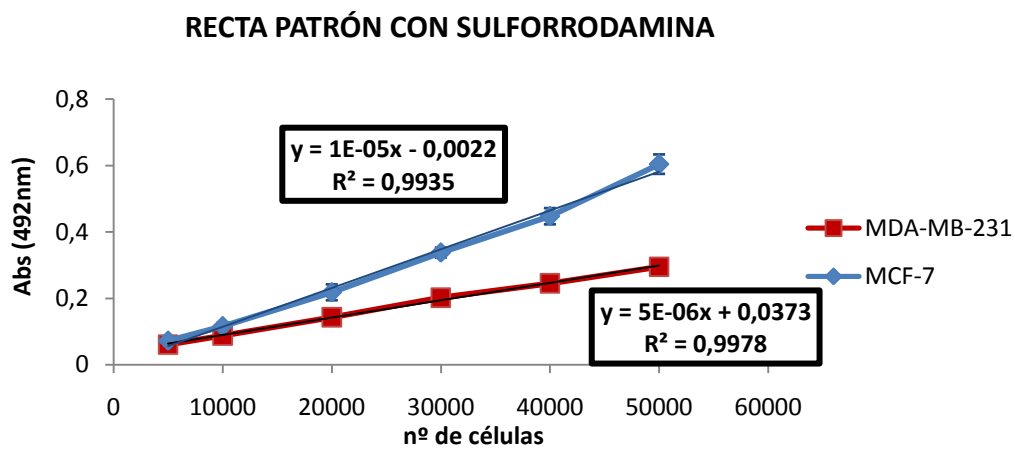


FIGURA 1. Recta patrón con sulforrodamina B. En el eje de ordenadas aparecen los valores de absorbancia 492nm. En el eje de abscisas se representa el número de células. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos por triplicado.

Como se representa en la figura anterior, la línea celular MCF-7 presenta una cinética de proliferación mayor que la línea celular MDA-MB-231.

1.2. Supervivencia celular frente a radiación ionizante

La figura 2 muestra los valores obtenidos de la fracción de supervivencia para diferentes dosis de radiación (1-6 Gy) en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.

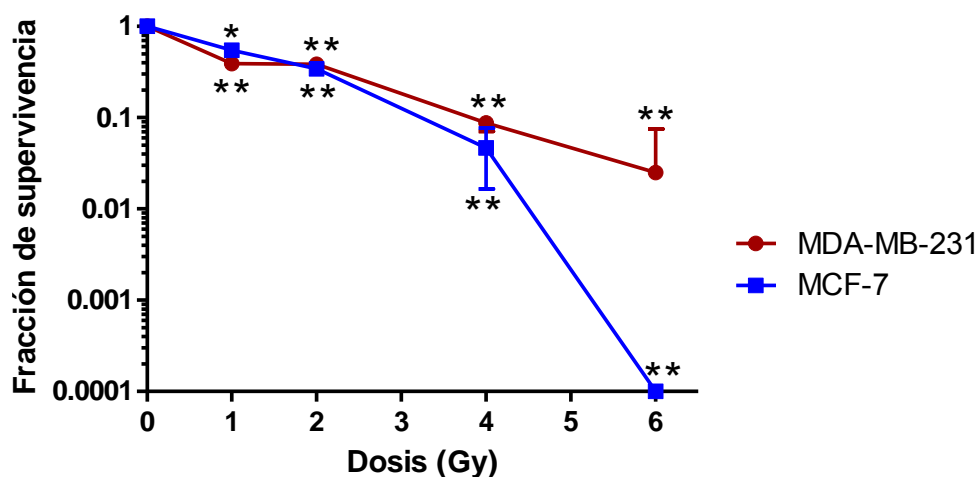


FIGURA 2. Fracción de supervivencia observada para diferentes dosis de radiación. En el eje de ordenadas se muestra la fracción de supervivencia en escala logarítmica y en el eje de abscisas se representan las diferentes dosis de radiación utilizada para cada línea celular, MCF-7 y MDA-MB-231. Los valores representan la media \pm DE de tres experimentos por triplicado. ** $P < 0,0001$ vs CONTROL.

TABLA 1. Fracción de supervivencia observada para una dosis de 2 Gy de radiación ionizante en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. En la primera columna aparecen los valores de fracción de la supervivencia obtenidos a 2 Gy, en la segunda y tercera columna se representan los valores de los parámetros α y β .

	SF_{2Gy}	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-2})
MDA-MB-231	$0,385000 \pm 0,06137317$	$0,7583 \pm 0,1136$	$0,04571 \pm 0,03606$
MCF-7	$0,3416667 \pm 0,009831921$	$0,5183 \pm 0,05438$	$-0,03765 \pm 0,02686$

Entre ambas líneas celulares analizadas, se observa una diferente respuesta frente a radiación ionizante presentando una respuesta radiosensible la línea celular MCF-7 y radorresistente la línea celular MDA-MB-231. Esta sensibilidad aumenta con la dosis de radiación recibida en ambas líneas celulares.

2. ESTUDIO DEL PERFIL REDOX EN LAS LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS

Tal y como se describe en el apartado 2.2 de materiales y métodos, se han realizado medidas de especies reactivas de nitrógeno (RNS), de oxígeno (ROS) y de elementos antioxidantes.

2.1. Medida de radicales libres

2.1.1. Medida de los niveles de especies reactivas del nitrógeno (RNS)

En la figura número 3 se representan los niveles de nitritos medidos a diferentes tiempos tras irradiación con una dosis de 2 Gy en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.

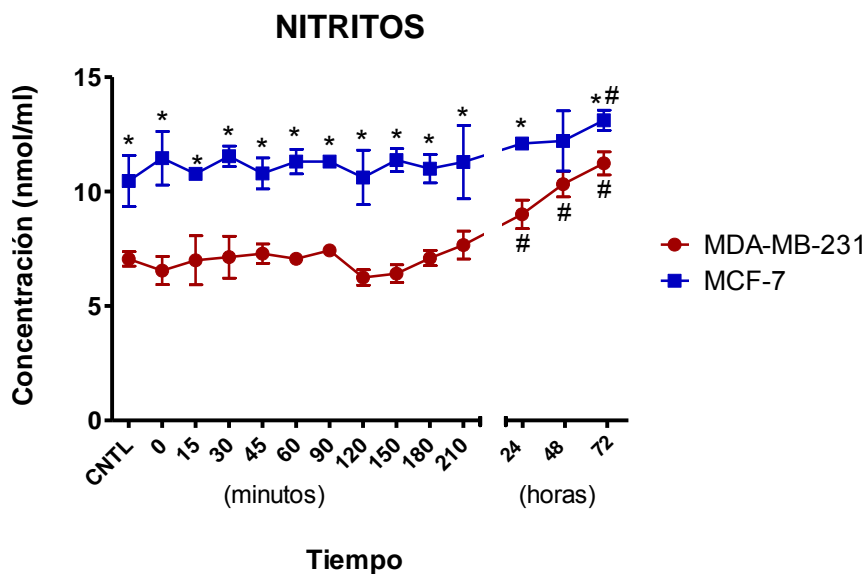


FIGURA 3. Media de los niveles de nitritos a diferentes tiempos medidos tras irradiación en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. En el eje de ordenadas se representa la concentración de nitritos (nmol/ml). En el eje de abscisas se observa el tiempo transcurrido después de la irradiación dividido en dos: 1) tiempos cortos donde se sitúa el control sin irradiar y de 0 a 210 minutos; 2) tiempos largos de 24 a 72 horas. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos por triplicado. # $P < 0,05$ vs control, * $P < 0,05$ vs MCF-7.

Para los tiempos cortos, los niveles de nitritos, a partir de los 15 minutos hasta las 3 horas, tanto para MDA-MB-231 como para MCF-7, siguen un patrón

oscilatorio. Para los tiempos largos, en la línea celular MDA-MB-231 se observa un incremento significativo desde las 24 hasta las 72 horas, en concreto en este punto, a las 72 horas, se observa un aumento significativo de los niveles de nitritos en ambas líneas celulares. De forma significativa, salvo a las 48 horas, la línea celular MCF-7 presenta mayores niveles de nitritos que la línea celular MDA-MB-231, a todos los tiempos analizados.

2.1.2. Medida de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS)

En la figura 4 se representa el porcentaje de células que expresan ROS medidos a diferentes tiempos en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 después de haber sido irradiadas con una dosis de 2Gy.

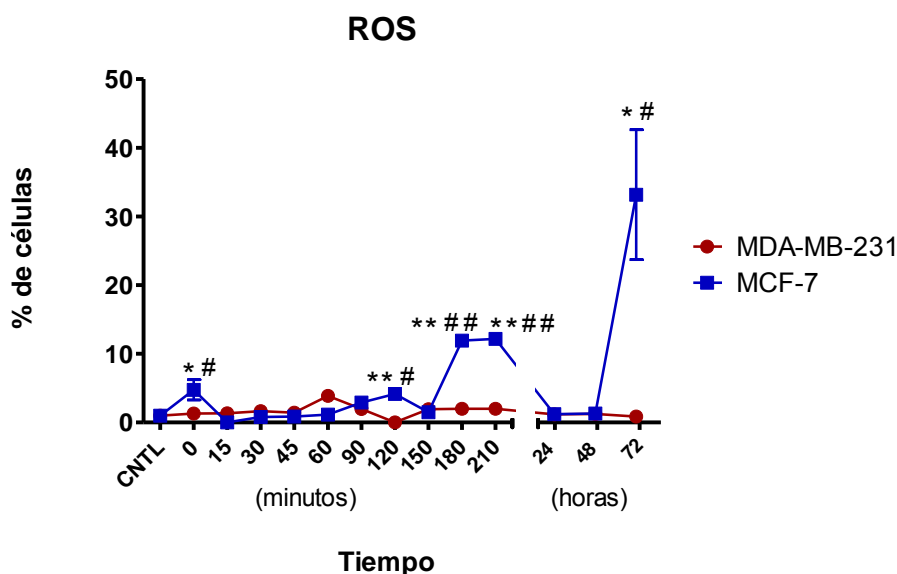


FIGURA 4. Media del porcentaje de células que expresan ROS a diferentes tiempos medidos tras irradiación en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que expresan ROS. En el eje de abscisas se observa el tiempo transcurrido después de la irradiación dividido en dos: 1) tiempos cortos donde se representa el control sin irradiar y de 0 a 210 minutos; 2) tiempos largos de 24 a 72 horas. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos por triplicado. * P<0,05 vs MDA-MB-231, # P<0,05 vs CONTROL, ** P<0,0001 vs MDA-MB-231, ### P<0,0001 vs CONTROL.

El porcentaje de células que expresan ROS, en los tiempos cortos, muestra un patrón oscilatorio en ambas líneas con un incremento significativo respecto al control para el caso de MCF-7 en los tiempos 0, 120, 180 y 210 minutos, alcanzando el

valormáximo a las 72 horas. Estos valores son significativamente superiores a los obtenidos en la línea celular MDA-MB-231 a esos mismos tiempos.

En la figura 5 se representa el porcentaje de células que expresan radical superóxido medidos a diferentes tiempos en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 después de haber sido irradiadas con una dosis de 2Gy.

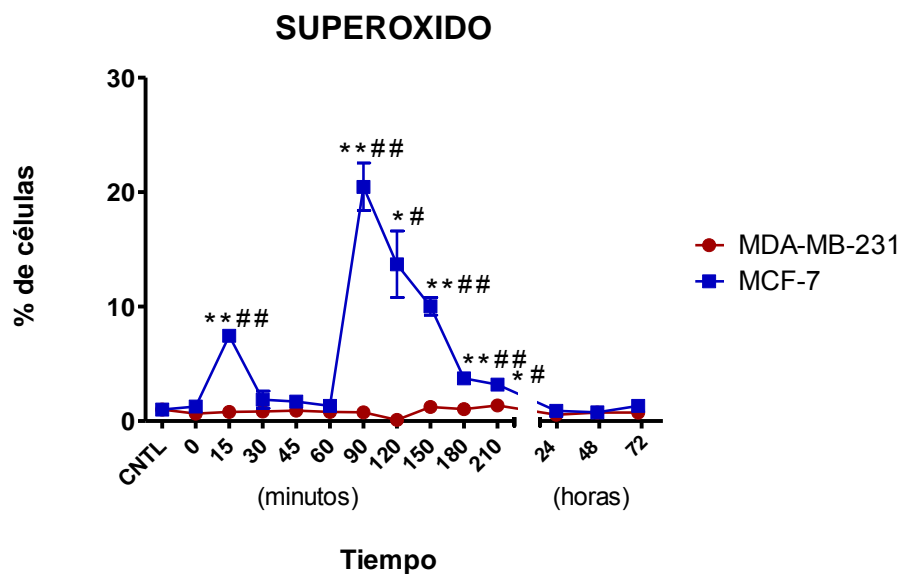


FIGURA 5. Media del porcentaje de células que expresan superóxido a diferentes tiempos tras irradiación medidos en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que expresan superóxido. El eje de abscisas muestra el tiempo transcurrido después de la irradiación dividido en dos: 1) tiempos cortos donde se representa el control sin irradiar y de 0 a 210 minutos; 2) tiempos largos de 24 a 72 horas. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos por triplicado. * $P < 0,05$ vs MDA-MB-231, # $P < 0,05$ vs CONTROL, ** $P < 0,0001$ vs MDA-MB-231, ### $P < 0,0001$ vs CONTROL.

La línea celular MCF-7, en los tiempos cortos, muestra de forma significativa, mayor porcentaje de células que expresan el radical superóxido que la línea celular MDA-MB-231. En la línea celular MCF-7 se observan incrementos significativos respecto al control a los 15, 90, 120, 150, 180 y 210 minutos, tras recibir una dosis de 2 Gy de radiación ionizante. Estos porcentajes, en los tiempos cortos, son superiores en MCF-7 que en MDA-MB-231. No se encuentran diferencias importantes entre ambas líneas celulares en los tiempos largos.

En la figura 6 se representa el porcentaje de células que expresan conjuntamente superóxido y ROS medidos a diferentes tiempos en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 después de haber sido irradiadas con una dosis de 2Gy

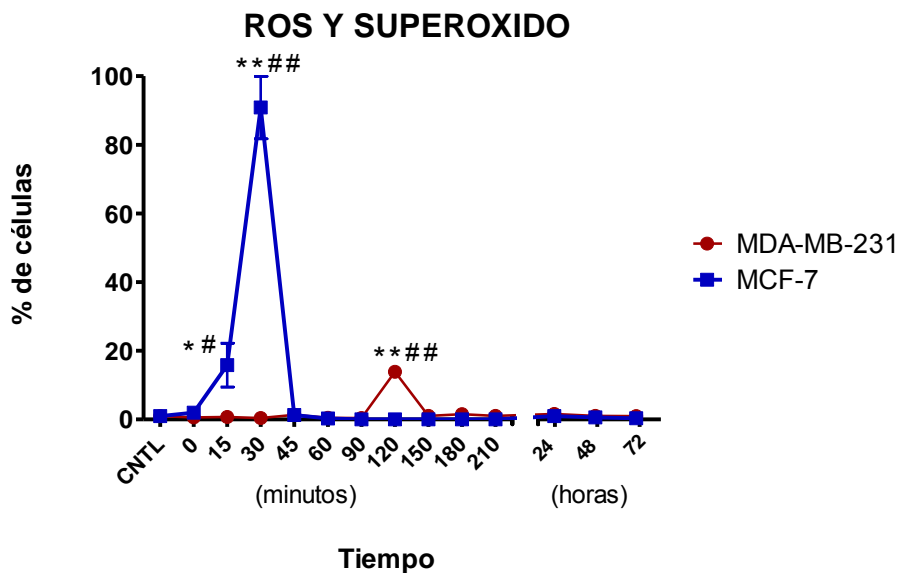


FIGURA 6. Media del porcentaje de células que expresan superóxido y ROS a diferentes tiempos tras irradiación medidos en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que expresan superóxido y ROS. En el eje de abscisas observamos el tiempo transcurrido después de la irradiación dividido en dos: 1) tiempos cortos donde se sitúa el control sin irradiar y de 0 a 210 minutos; 2) tiempos largos de 24 a 72 horas. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos por triplicado. * $P < 0,05$ vs MDA-MB-231, # $P < 0,05$ vs CONTROL, ** $P < 0,0001$ vs MDA-MB-231, ### $P < 0,0001$ vs CONTROL.

El porcentaje de células que expresan tanto ROS como superóxido en los tiempos 15 y 30 minutos para la línea celular MCF-7 son significativamente superiores a los obtenidos en la línea celular MDA-MB-231. Sólo se observa un incremento significativo en MDA-MB-231, respecto de MCF-7, a los 120 minutos.

2.2. Medida de elementos antioxidantes

2.2.1. Medida de GSH y GSSG

La figura 7 muestra los niveles de glutatión reducido (GSH) en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 para diferentes tiempos después de haber sido irradiadas con una dosis de 2Gy.

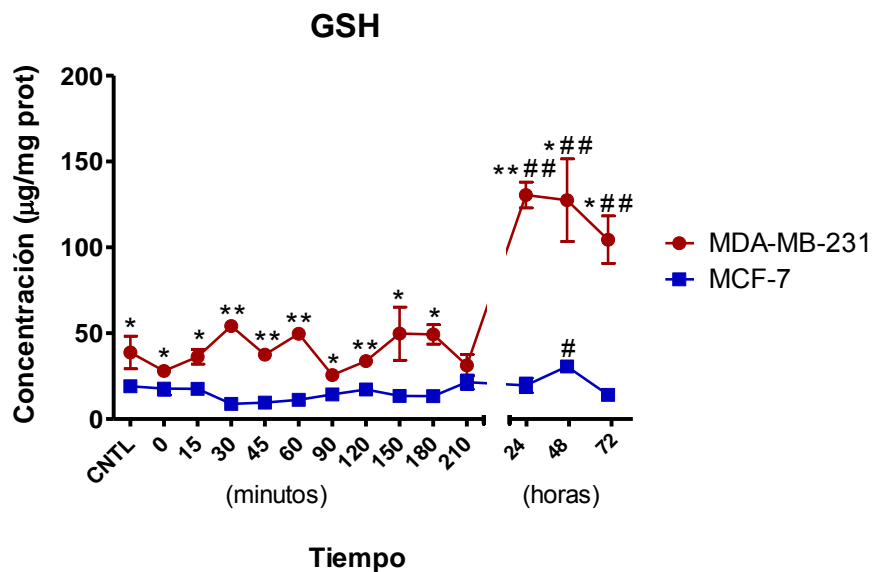


FIGURA 7. Media de los niveles de GSH para diferentes tiempos tras irradiación medidos en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. En el eje de ordenadas se muestra la concentración de GSH ($\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteínas). En el eje de abscisas se representa el tiempo transcurrido después de la irradiación dividido en dos: 1) tiempos cortos donde se sitúa el control sin irradiar y de 0 a 210 minutos; 2) tiempos largos de 24 a 72 horas. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos por triplicado. * $P < 0,05$ vs MCF-7, ** $P < 0,0001$ vs MCF-7, ## $P < 0,0001$ vs CONTROL.

La concentraciones de GSH, en la línea celular MDA-MB-231, muestran valores máximos y significativos respecto del control, a las 24, 48 y 72 horas. Con respecto a los valores de GSH para la línea celular MCF-7, éstos muestran un incremento a las 48 horas, alcanzado valores significativos respecto al control. Los niveles obtenidos de GSH son significativamente superiores en MDA-MB-231 respecto a MCF-7 a todos los tiempos analizados, salvo a 210 minutos, siendo esta diferencia mayor en los tiempos largos.

La figura 8 muestra los niveles de glutatión oxidado (GSSG) en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 para diferentes tiempos después de haber sido irradiadas con una dosis de 2Gy.

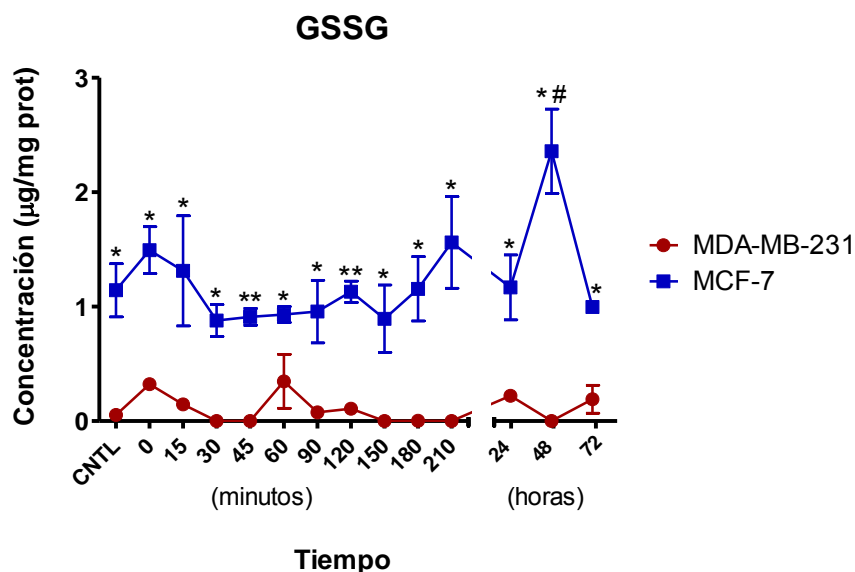


FIGURA 8. Media de los niveles de GSSG para diferentes tiempos tras irradiación medidos en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. En el eje de ordenadas se muestra la concentración de GSSG ($\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteínas). En el eje de abscisas se representa el tiempo transcurrido después de la irradiación dividido en dos: 1) tiempos cortos donde se sitúa el control sin irradiar y de 0 a 210 minutos; 2) tiempos largos de 24 a 72 horas. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos por triplicado. * $P < 0,05$ vs MDA-MB-231, # $P < 0,05$ vs CONTROL.

Si observamos los niveles de GSSG, la línea celular MDA-MB-231 no va a presentar diferencias importantes a lo largo del tiempo. Los valores obtenidos en la línea celular MCF-7, en todos los tiempos analizados, son significativamente superiores a los obtenidos en la línea celular MDA-MB-231. Los valores máximos de GSSG en la línea celular MCF-7 se obtienen a las 48 horas.

En la figura 9 se representan los valores absolutos de los niveles de GSH con respecto al total GST (GSH+GSSG), a diferentes tiempos después de recibir una dosis de radiación de 2Gy en ambas líneas celulares, MCF-7 y MDA-MB-231.

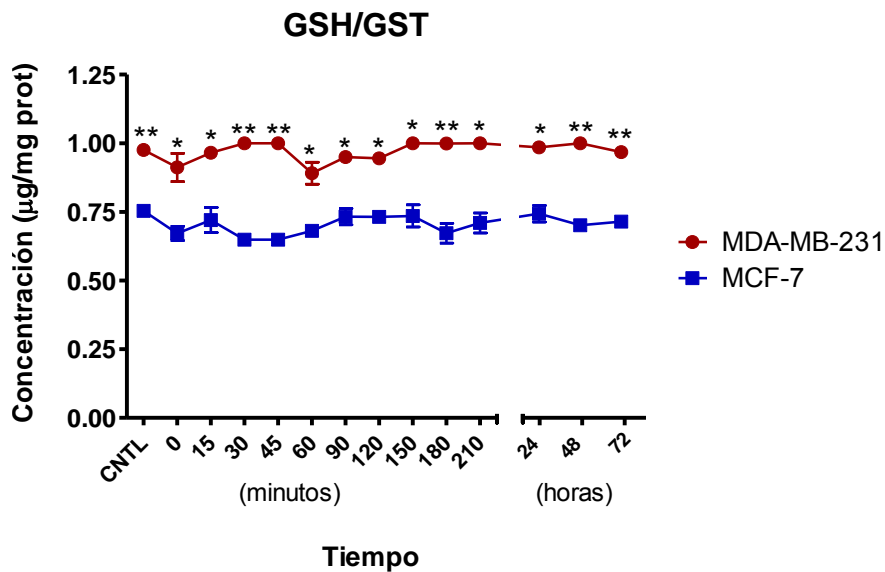


FIGURA 9. Media de los valores de GSH/GST observados a diferentes tiempos tras irradiación en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. En el eje de ordenadas se representan los niveles GSH sobre el total de GSH ($\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteínas). En el eje de abscisas se muestra el tiempo transcurrido después de la irradiación dividido en dos: 1) tiempos cortos donde se sitúa el control sin irradiar y de 0 a 210 minutos; 2) tiempos largos de 24 a 72 horas. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos por triplicado. * $P < 0,05$ vs MCF-7, ** $P < 0,0001$ vs MCF-7.

En valores absolutos, la tendencia hasta las 72 horas de la relación entre GSH/GST (GSH+GSSG), es significativamente superior en MDA-MB-231 que en MCF-7. MDA-MB-231 presenta mayor concentración de GSH disponible que MCF-7.

2.2.2. Medida de GPx y GRd

La figura 10 muestra los niveles de la actividad de glutatión peroxidasa (GPx). Este experimento se realizó en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 y a diferentes tiempos después de haber sido irradiadas con una dosis de radiación de 2Gy.

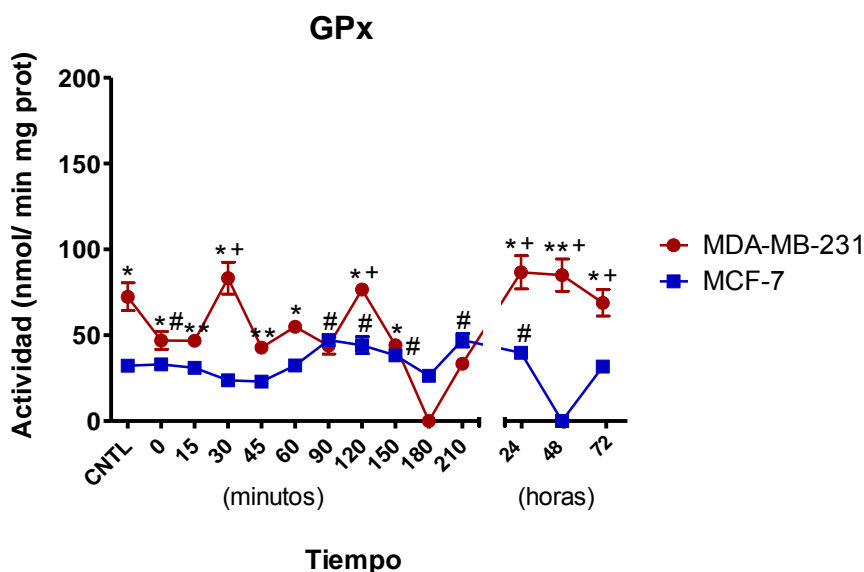


FIGURA 10. Media de la actividad de GPx observada a diferentes tiempos en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 tras irradiación. En el eje de ordenadas se muestran los valores de actividad enzimática de GPx (nmol/min mg proteína). En el eje de abscisas se muestra el tiempo transcurrido después de la irradiación dividido en dos: 1) tiempos cortos donde se sitúa el control sin irradiar y de 0 a 210 minutos; 2) tiempos largos de 24 a 72 horas. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos por triplicado. * $P < 0,05$ vs MCF-7, ** $P < 0,0001$ vs MCF-7, # $P < 0,05$ vs CONTROL, + $P < 0,05$ vs 0 minutos.

Como se puede observar en la figura 10, la línea celular MDA-MB-231 presenta valores significativos de mayor actividad del enzima GPx que la línea celular MCF-7. No obstante, a lo largo del tiempo, en MCF-7 se aprecian aumentos significativos de esta actividad que van desde los 90 minutos hasta las 24 horas después de haber sido irradiadas. La línea MDA-MB-231 va a sufrir oscilaciones a lo largo del tiempo comenzando con una bajada en el instante justo después de ser irradiadas (tiempo 0) y que conduce finalmente a un establecimiento de su actividad enzimática a partir de las 24 horas.

La figura 11 muestra los niveles de la actividad de glutatión reductasa (GRd). Este experimento se realizó en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 y a diferentes tiempos después de haber sido irradiadas con una dosis de radiación de 2Gy.

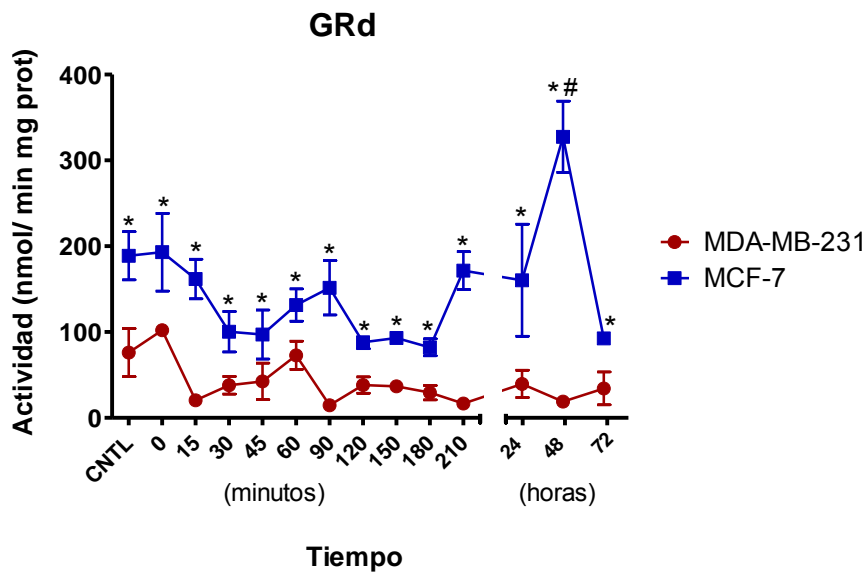


FIGURA 11. Media de la actividad de GRd observada a diferentes tiempos en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 tras irradiación. En el eje de ordenadas se muestran los valores de actividad enzimática de GRd (nmol/min mg proteína). En el eje de abscisas se muestra el tiempo transcurrido después de la irradiación dividido en dos: 1) tiempos cortos donde se sitúa el control sin irradiar y de 0 a 210 minutos; 2) tiempos largos de 24 a 72 horas. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos por triplicado. * $P < 0,05$ vs MCF-7, # $P < 0,05$ vs CONTROL.

En el caso de GRd, los niveles en MCF-7 son significativamente superiores a los encontrados en MDA-MB-231 obteniéndose un pico a las 48 horas. Esto parece indicar que la línea celular MCF-7 podría estar intentando restaurar el equilibrio redox aumentando la actividad de GRd para el aumento del reciclado de GSSG.

Tras observar que la línea celular que presenta mayor radiorresistencia frente a radiación ionizante, también presenta una menor alteración de su perfil redox mostrando mayores niveles de GSH y de actividad GPx, quisimos demostrar que esta diferencia en cuanto al estado redox podría estar determinada la respuesta a radiación, por lo tanto el siguiente paso fue utilizar elementos que nos permitieran constatar dicha hipótesis. Para ello, en primer lugar utilizamos la inhibición química con BSO y 3-DG. El uso de estos inhibidores nos permitiría conocer en qué medida

podrían estar afectando la alteración de los elementos antioxidantes analizados, GSH y GPx.

3. ESTUDIO DEL PERFIL REDOX EN LAS LÍNEAS CELULARES TRATADAS CON INHIBIDORES QUÍMICOS

3.1. Medida de GSH y GSSG en el tratamiento con BSO

La figura 12 muestra los niveles de glutatión reducido (GSH) en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 a diferentes tiempos después de haber sido irradiadas con una dosis de 2Gy y ser pretratadas con 100µM de BSO.

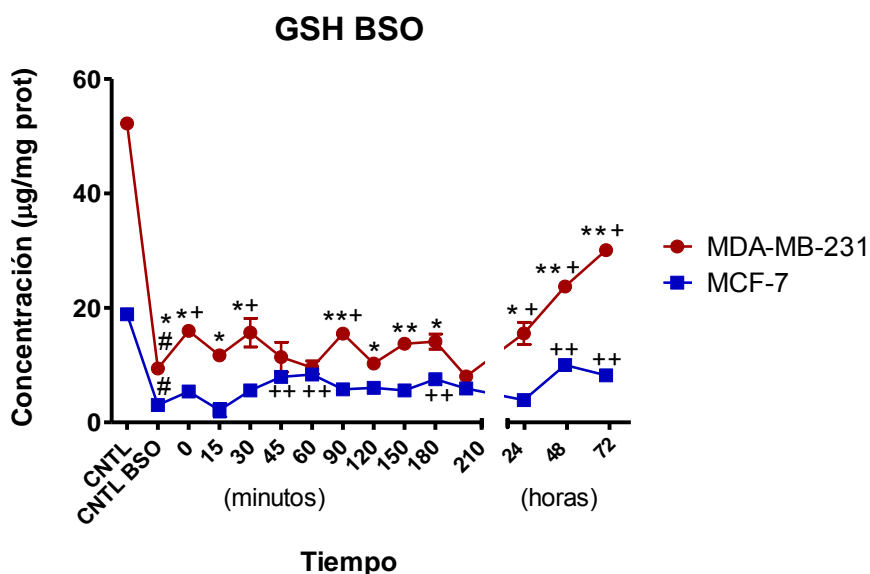


FIGURA 12. Media de los niveles de GSH a diferentes tiempos tras irradiación observados para las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 tratadas con 100µM BSO. En el eje de ordenadas se muestra la concentración de GSH (µg/mg de proteínas). En el eje de abscisas se representa el tiempo transcurrido después de la irradiación dividido en dos: 1) tiempos cortos donde se sitúa el control sin irradiar y de 0 a 210 minutos; 2) tiempos largos de 24 a 72 horas. Los valores representan la media ± EEM de tres experimentos por triplicado. * P<0,05 vs MCF-7, ** P<0,0001 vs MCF-7, # P<0,05 vs CONTROL, + P<0,05 vs CONTROL BSO, ++ P<0,0001 vs CONTROL BSO.

El uso del inhibidor químico BSO va a provocar una caída de los niveles de GSH en ambas líneas celulares. Si observamos los tiempos cortos (0 a 210 minutos) GSH muestra un patrón oscilatorio en ambas líneas celulares. Los niveles de GSH en la línea celular MDA-MB-231 son significativamente superiores a los obtenidos en la línea

celular MCF-7. Para los tiempos largos (24 a 72 horas), se observan valores máximos respecto del control tratado con BSO, de los niveles de GSH a las 48 horas en MCF-7 y a las 72 horas en MDA-MB-231.

La figura 13 muestra los niveles de glutatión reducido (GSSG) en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 a diferentes tiempos después de haber sido irradiadas con una dosis de 2Gy y ser pretratadas con 100 μ M de BSO.

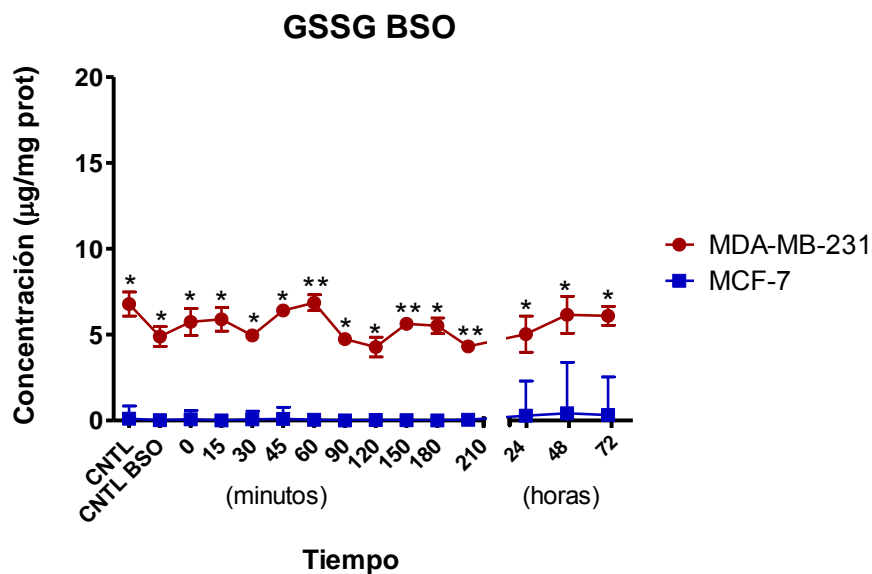


FIGURA 13. Media de los niveles de GSSG a diferentes tiempos tras irradiación observados para las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 tratadas con 100 μ M BSO. En el eje de ordenadas se muestra la concentración de GSSG (μ g/ml de proteínas). En el eje de abscisas se representa el tiempo transcurrido después de la irradiación dividido en dos: 1) tiempos cortos donde se sitúa el control sin irradiar y de 0 a 210 minutos; 2) tiempos largos de 24 a 72 horas. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos por triplicado. * $P < 0,05$ vs MCF-7, ** $P < 0,0001$ vs MCF-7

Tras el tratamiento con BSO, los niveles de GSSG no van a sufrir cambios a lo largo del tiempo en ambas líneas celulares. En el caso de la línea celular MCF-7 los valores de GSSG son cercanos a cero y significativamente inferiores a los obtenidos en MDA-MB-231.

En la figura 14 se representan los valores absolutos de los niveles de GSH con respecto al total GST (GSH+GSSG), medidos después de recibir una dosis de radiación de 2Gy y ser previamente tratadas con 100 μ M de BSO, en ambas líneas celulares, MCF-7 y MDA-MB-231.

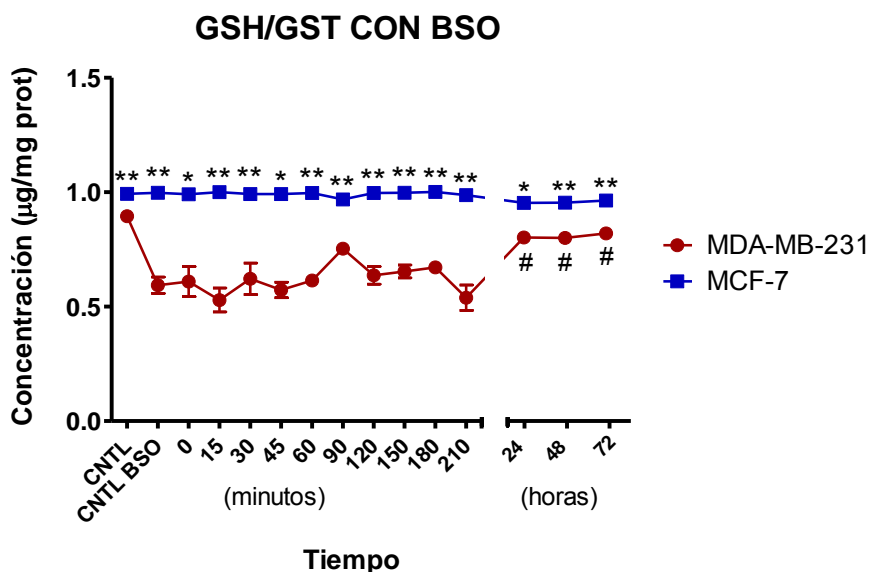


FIGURA 14. Media de los valores de GSH/GST observados a diferentes tiempos tras irradiación en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 tratadas con 100 μ M BSO. En el eje de ordenadas se representan los niveles GSH sobre el total de GSH (μ g/ml de proteínas). En el eje de abscisas se refleja el tiempo transcurrido después de la irradiación dividido en dos: 1) tiempos cortos donde se sitúa el control sin irradiar y de 0 a 210 minutos; 2) tiempos largos de 24 a 72 horas. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos por triplicado. * $P < 0,05$ vs MDA-MB-231, ** $P < 0,0001$ vs MDA-MB-231, # $P < 0,05$ vs CONTROL BSO.

La línea celular MDA-MB-231 muestra una disminución del ratio GSH/GST cuando es tratada con BSO. Con respecto a su control tratado, en MDA-MB-231 se muestra una tendencia al aumento en el ratio GSH/GST en los tiempos largos (24 a 72 horas), alcanzando el máximo valor a las 72 horas. Aunque este ratio no presenta diferencias en la línea MCF-7 a lo largo del tiempo, su valor es significativamente superior a los obtenidos en la línea celular MDA-MB-231.

3.2. Medida de GPx en el tratamiento con BSO

La figura 15 muestra los niveles de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) tras el empleo de inhibidores químicos e irradiación. Este experimento se realizó en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 y a diferentes tiempos después de haber sido irradiadas con una dosis de radiación de 2Gy y tras ser tratadas con 100 μ M de BSO.

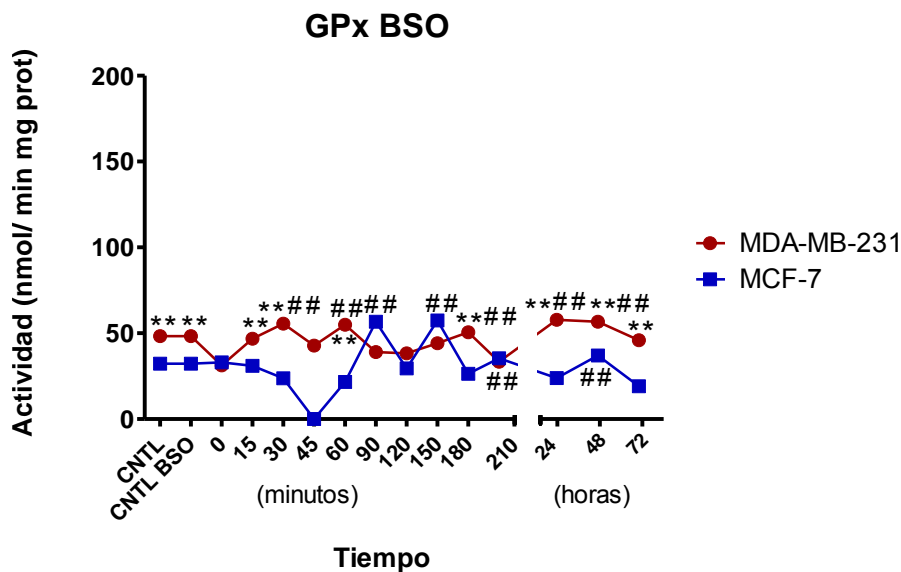


FIGURA 15. Media de la actividad de GPx observada a diferentes tiempos tras irradiación en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 tratadas con 100 μ M de BSO. En el eje de ordenadas se muestran los valores de actividad enzimática de GPx y (nmol/min mg proteína). En el eje de abscisas observamos el tiempo transcurrido después de la irradiación dividido en dos: 1) tiempos cortos donde se sitúa el control sin irradiar y de 0 a 210 minutos; 2) tiempos largos de 24 a 72 horas. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos por triplicado. ** P<0,0001 vs MCF-7, ## P<0,0001 vs CONTROL BSO.

En la medida de la actividad enzimática de GPx observamos valores máximos respecto de sus controles en los tiempos 30, 60, 180 minutos y a las 24 y 48 horas para el caso de la línea celular MDA-MB-231. En MCF-7 encontramos cuatro valores máximos (90, 150, 210 minutos y 48 horas). Se puede observar que de manera significativa, la actividad GPx sigue siendo superior en MDA-MB-231 que en MCF-7.

3.3. Supervivencia celular a radiación ionizante en líneas celulares tratadas con BSO

La figura 16 muestra los valores obtenidos de la fracción de supervivencia para diferentes dosis de radiación (1-6 Gy) en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 tras ser tratadas con 100 μ M de BSO.

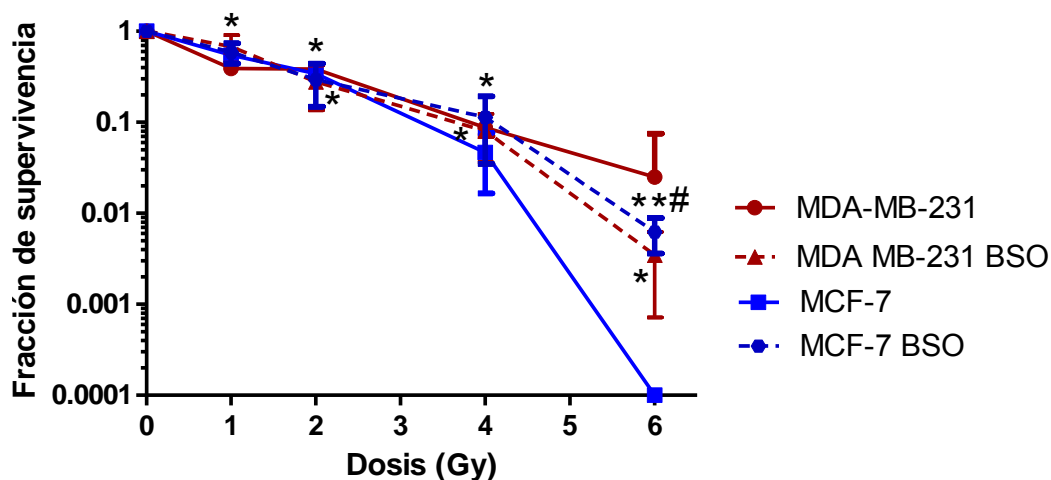


FIGURA 16. Fracción de supervivencia observada para diferentes dosis de radiación. En el eje de ordenadas se muestra la fracción de supervivencia en escala logarítmica y en el eje de abscisas se representan las diferentes dosis de radiación utilizada para cada línea celular, MCF-7 y MDA-MB-231, sin tratar y tras ser tratadas con 100 μ M de BSO. Los valores representan la media \pm DE de tres experimentos por triplicado. * P<0,05 vs CONTROL, ** P<0,0001 vs CONTROL, # P<0,05 vs MCF-7.

TABLA 2. Fracción de supervivencia observada para una dosis de 2 Gy de radiación ionizante en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 con y sin tratamiento con BSO. En la primera columna aparecen los valores de fracción de la supervivencia obtenidos a 2 Gy, en la segunda y tercera columna se representan los valores de los parámetros α y β .

	SF _{2Gy}	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)
MDA-MB-231 BSO	0,2788468 \pm 0,1430984	0,2143 \pm 0,2120	-0,1917 \pm 0,1352
MDA-MB-231	0,385000 \pm 0,06137317	0,7583 \pm 0,1136	0,04571 \pm 0,03606
	SF _{2Gy}	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)
MCF-7 BSO	0,2950622 \pm 0,146530	0,5390 \pm 0,1219	-0,01603 \pm 0,05314
MCF-7	0,3416667 \pm 0,009831921	0,5183 \pm 0,05438	-0,03765 \pm 0,02686

La línea celular MCF-7 muestra una mayor fracción de supervivencia tras ser irradiada a 6 Gy cuando es tratada con BSO ($0,0062579 \pm 0,002647$) respecto de su control sin tratar ($0,0001 \pm 0,000001$). En el caso de la línea celular MDA-MB-231 se observa la situación contraria, esta línea celular muestra menor fracción de supervivencia tras ser irradiada a 6 Gy cuando es tratada con BSO ($0,0034744 \pm 0,002760$) respecto de su control sin tratar ($0,025000 \pm 0,050000$) ($P=0,49$). No se aprecian diferencias significativas en las curvas de supervivencia celular, tras el tratamiento con BSO a los 6 Gy, entre ambas líneas celulares ($P= 0,064$).

3.4. Medida de GSH y GSSG en el tratamiento con 3-DG

La figura 17 muestra los niveles de glutatión reducido en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 a diferentes tiempos después de haber sido irradiadas con una dosis de 2Gy y ser previamente tratadas con 150mM de 3-DG.

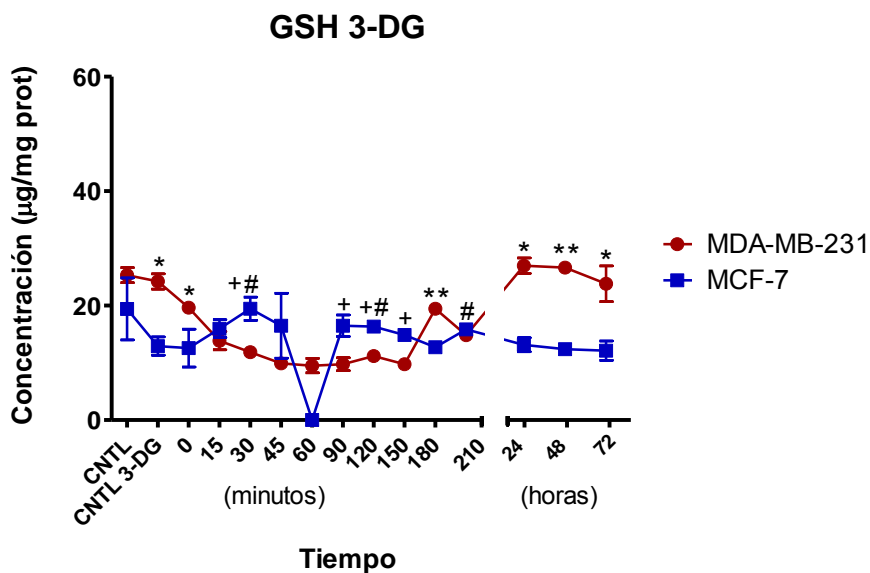


FIGURA 17. Media de los niveles de GSH observados a diferentes tiempos tras irradiación en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 tratadas con 150mM de 3-DG. En el eje de ordenadas se muestra la concentración de GSH ($\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteínas). En el eje de abscisas se representa el tiempo transcurrido después de la irradiación dividido en dos: 1) tiempos cortos donde se sitúa el control sin irradiar y de 0 a 210 minutos; 2) tiempos largos de 24 a 72 horas. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos por triplicado. * $P<0,05$ vs MCF-7, ** $P<0,0001$ vs MCF-7, # $P<0,05$ vs CONTROL 3-DG, + $P<0,05$ vs MDA-MB-231.

El tratamiento con 3-DG, previo a la irradiación, refleja nuevamente un patrón oscilatorio de los niveles de GSH en ambas líneas celulares sin apreciarse cambios significativos, para la línea celular MDA-MB-231, a lo largo del tiempo. Estos niveles parecen estar muy próximos en ambas líneas celulares obteniéndose incrementos significativos en MCF-7 sobre MDA-MB-231 para los tiempos de 30, 90, 120 y 150 minutos. Por el contrario, en el resto de puntos, MDA-MB-231 presenta niveles superiores a MCF-7, siendo más evidentes en los tiempos largos (24 a 72 horas). Los niveles de GSSG son despreciables para ambas líneas celulares, es por este motivo que los niveles del ratio GSH/GST serán iguales 1 y serán los mismos para el caso de las dos líneas celulares (resultados no mostrados).

3.5. Medida de GPx en el tratamiento con 3-DG

La figura 18 muestra los niveles de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx). Este experimento se realizó en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 y a diferentes tiempos después de haber sido irradiadas con una dosis de radiación de 2Gy y tras ser tratadas con 150mM de 3-DG.

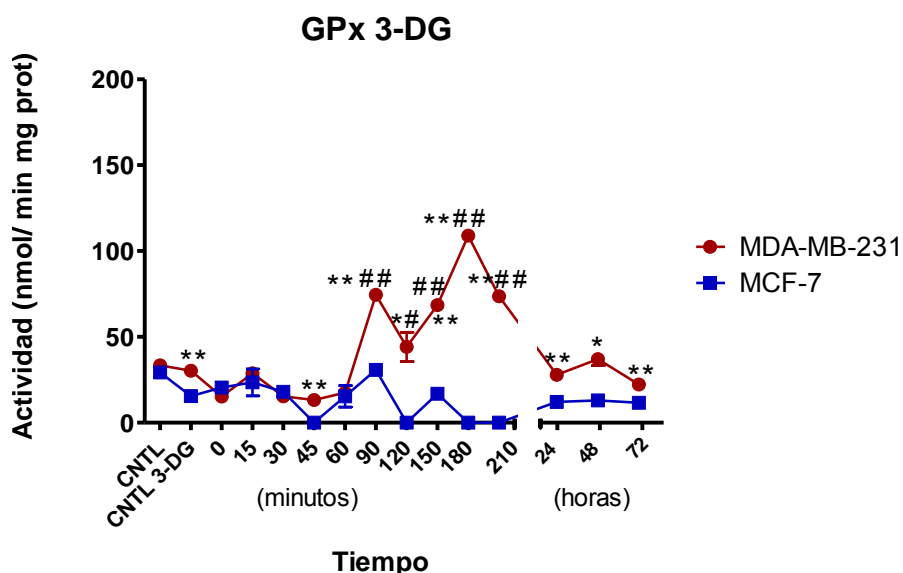


FIGURA 18. Media de la actividad de GPx a diferentes tiempos tras irradiación medidos en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 tratadas con 150mM de 3-DG. En el eje de ordenadas se muestran los valores de actividad enzimática de GPx (nmol/min mg proteína). En el eje de abscisas observamos el tiempo transcurrido después de la irradiación dividido en dos: 1) tiempos cortos donde se sitúa el control sin irradiar y de 0 a 210 minutos; 2) tiempos

largos de 24 a 72 horas. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos por triplicado. ** $P < 0,0001$ vs MCF-7, ## $P < 0,0001$ vs CONTROL 3-DG.

En la actividad enzimática de GPx, en MDA-MB-231 observamos mayor actividad entre los 90 y 210 minutos (tiempos cortos) mostrando dos incrementos a los 90 y 180 minutos. También se observan incrementos entre las 24 y 72 horas (tiempos largos). Aun mostrando estos incrementos, la primera hora después del tratamiento con 3-DG, la línea celular MDA-MB-231, sufre una caída de la actividad enzimática cuando es tratada con 3-DG. Tanto en los tiempos cortos como en los largos, la actividad de GPx, en la línea celular MDA-MB-231, es significativamente superior a la de MCF-7. En la línea celular MCF-7 no se aprecian cambios a lo largo del tiempo y no parece estar afectándole, en la actividad del enzima GPx, el tratamiento con 3-DG puesto que presenta valores parecidos a los que se obtienen sin el tratamiento.

3.6. Supervivencia celular a radiación ionizante en líneas celulares tratadas con 3-DG

La figura 19 muestra los valores obtenidos de la fracción de supervivencia a diferentes dosis de radiación (1-6 Gy) en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 tras ser tratadas con 150mM de 3-DG.

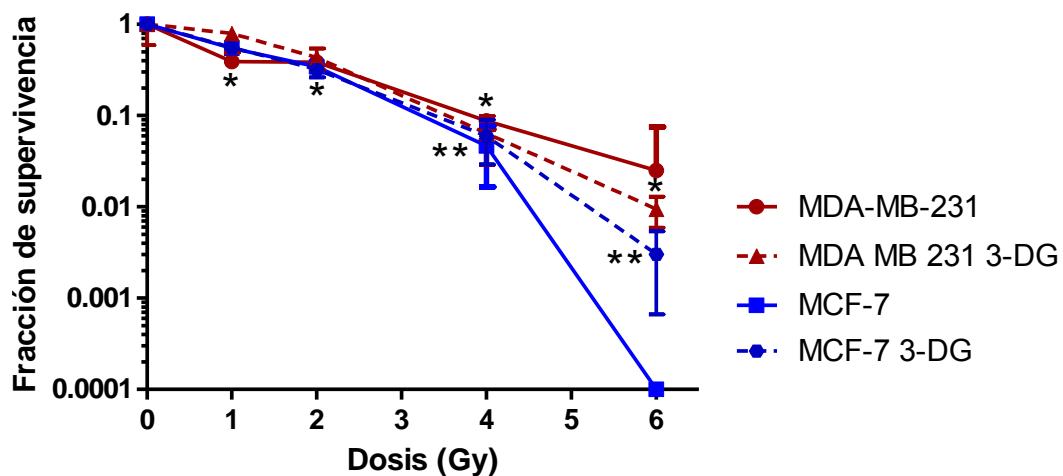


FIGURA 19. Fracción de supervivencia observada para diferentes dosis de radiación. En el eje de ordenadas se muestra la fracción de supervivencia en escala logarítmica y en el eje de abscisas se representan las diferentes dosis

de radiación utilizada para cada línea celular, MCF-7 y MDA-MB-231 sin tratar y tras ser tratadas con 150mM de 3-DG. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos por triplicado. * $P < 0,05$ vs CONTROL, ** $P < 0,0001$ vs CONTROL.

TABLA 3. Fracción de supervivencia observada para una dosis de 2 Gy de radiación ionizante en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 con y sin tratamiento con 3-DG. En la primera columna aparecen los valores de fracción de la supervivencia obtenidos a 2 Gy, en la segunda y tercera columna se representan los valores de los parámetros α y β .

	SF_{2Gy}	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-2})
MDA-MB-231 3-DG	0,4300843 \pm 0,1126024	0,06906 \pm 0,2723	-0,1707 \pm 0,1564
MDA-MB-231 SIN 3-DG	0,385000 \pm 0,06137317	0,7583 \pm 0,1136	0,04571 \pm 0,03606
	SF_{2Gy}	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-2})
MCF-7 3-DG	0,2950622 \pm 0,146530	0,5301 \pm 0,07947	-0,03455 \pm 0,03904
MCF-7 SIN 3-DG	0,3416667 \pm 0,009831921	0,5183 \pm 0,05438	-0,03765 \pm 0,02686

La línea celular MCF-7 parece mostrar mayor fracción de supervivencia para la dosis de 6 Gy cuando es tratada con 3-DG (0,0030245 \pm 0,002360) respecto de su control sin tratar (0,0001 \pm 0,000001) ($P = 0,09$). En el caso de la línea celular MDA-MB-231 encontramos la situación contraria, presentando menor fracción de supervivencia a 6 Gy al ser tratada con 3-DG (0,0094331 \pm 0,003527) y su control (0,025000 \pm 0,050000) ($P = 0,61$). Tras el tratamiento con 3-DG, para la dosis de 6 Gy, la línea celular MDA-MB-231 muestra mayor radiosensibilidad que la línea celular MCF-7 ($P = 0,028$). Estos resultados ponen de manifiesto que la utilización de ambos inhibidores químicos aumenta la radiorresistencia en la línea celular MCF-7 y, por el contrario, la disminuyen en la línea MDA-MB-231.

Después de estudiar las alteraciones del perfil redox mediante el uso de inhibidores químicos pudimos observar que tanto una alteración de GSH como de GPx podría estar modificando la radiosensibilidad en estas líneas celulares. Con el uso de ambos inhibidores químicos se aprecian alteraciones tanto en los niveles de GSH como en la actividad enzimática de GPx. Sin embargo, consideramos importante realizar inhibiciones más específicas, en concreto una inhibición que afectara de una forma más estable a uno de los elementos estudiados. Decidimos entonces utilizar una

inhibición génica y para ello realizamos un silenciamiento estable del gen GPx1 en ambas líneas celulares y posteriormente estudiamos su perfil redox.

4. ESTUDIO DEL PERFIL REDOX EN LAS LÍNEAS CELULARES TRATADAS MEDIANTE INHIBICIÓN GÉNICA

4.1. Silenciamiento de GPx1

La figura 20 y 21 muestran los valores de mRNA de GPx1 tras la realización del silenciamiento mediante el uso de shRNA. Los datos que se muestran son los obtenidos por PCR en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.

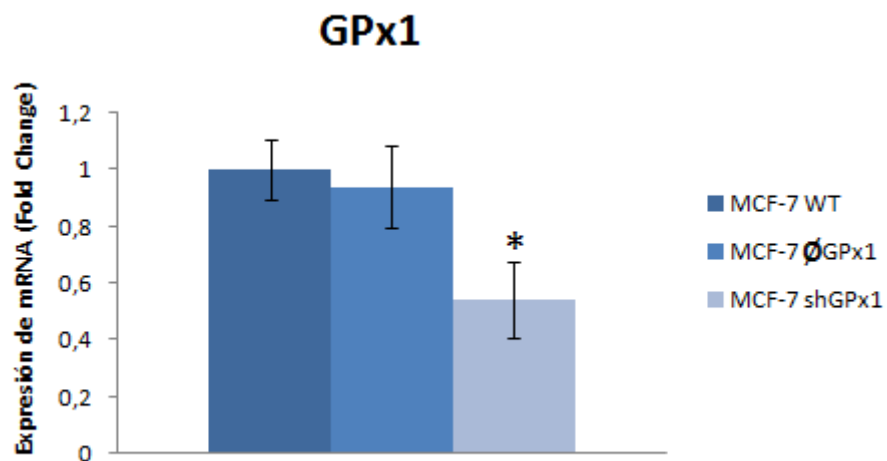


FIGURA 20. Media de los niveles de mRNA obtenidos por PCR en MCF-7 “wild type”, MCF-7 transfectada con el plásmido vacío (\emptyset GPx1) y en MCF-7 shGPx1. Los valores representan la media \pm DE de tres experimentos por triplicado * $P < 0,05$ vs CONTROL MCF-7 WT.

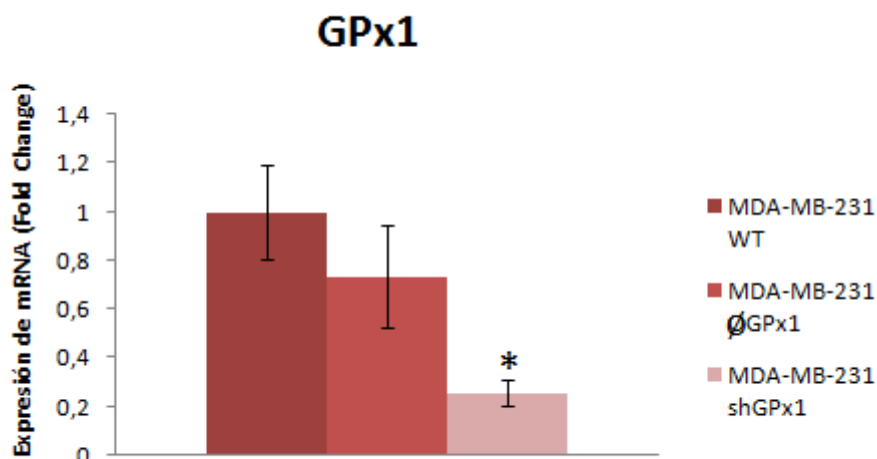


FIGURA 21. Media de los niveles de mRNA obtenidos por PCR en MDA-MB-231 “wild type”, MDA-MB-231 transfectada con el plásmido vacío (ØGPx1) y en MDA-MB-231 shGPx1. Los valores representan la media ± DE de tres experimentos por triplicado. * P<0,05 vs CONTROL MDA-MB-231 WT.

El grado de silenciamiento obtenido en ambas líneas celulares fue diferente siendo aproximadamente de un 73% en la línea celular MDA-MB-231 shGPx1 y de 46% en la línea celular MCF-7 shGPx1.

La figura 22 muestra, mediante western blot, los niveles de proteína de nuestro gen de estudio (GPx1) en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 control “wild type”, en MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con el plásmido shRNA-GPx1 y silenciadas para GPx1 (shGPx1) y en MCF-7 y MDA-MB-231 controles transfectadas con el plásmido vacío (ØRNA-GPx1).

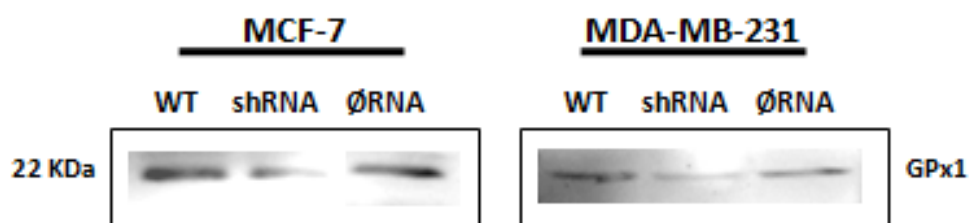


FIGURA 22. Media de los niveles de proteína GPx1 obtenidos, mediante western blot, en MCF-7 y MDA-MB-231 control “wild type” (WT), MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con el plásmido shRNA-GPx1 y MCF-7 y MDA-MB-231 control transfectadas con el plásmido vacío (ØRNA).

4.2. Medida de GSH y GSSG

La figura 23 muestra los niveles de glutatión reducido (GSH) en las líneas celulares en las que se ha silenciado el gen GPx1 (MCF-7 shGPx1y MDA-MB-231shGPx1), medidos a diferentes tiempos después de haber sido irradiadas con una dosis de 2Gy.

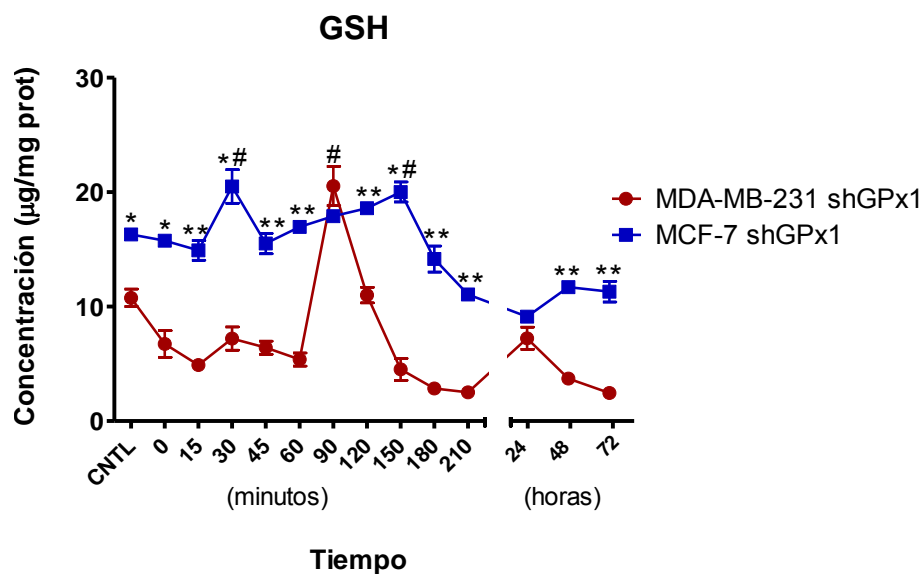


FIGURA 23. Media de los niveles de GSH observados a diferentes tiempos tras irradiación en las líneas celulares MDA-MB-231 shGPx1 y MCF-7 shGPx1. En el eje de ordenadas se muestra la concentración de GSH ($\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteínas). En el eje de abscisas se representa el tiempo transcurrido después de la irradiación dividido en dos: 1) tiempos cortos donde se sitúa el control sin irradiar y de 0 a 210 minutos; 2) tiempos largos de 24 a 72 horas. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos por triplicado. * $P < 0,05$ vs MDA-MB-231, ** $P < 0,0001$ vs MDA-MB-231, # $P < 0,05$ vs CONTROL.

En las líneas celulares con el gen GPx1 silenciado, MDA-MB-231 shGPx1y MCF-7shGPx1, se observan aumentos de los niveles de GSH en diferentes tiempos siendo para MCF-7shGPx1 a los 30 y a los 150 minutos y para MDA-MB-231 shGPx1 a los 90 minutos. La línea celular MDA-MB-231 shGPx1 presenta una disminución significativa de estos niveles con respecto a la línea celular MCF-7shGPx1. Además, los niveles de GSH medidos en MDA-MB-231 shGPx1son menores al utilizar el silenciamiento del gen GPx1 que los inhibidores BSO y 3-DG. Los valores obtenidos para GSSG fueron despreciables en ambas líneas celulares y como ocurre en el caso del uso de 3-DG, los

valores del ratio GSH/GST es de 1 y es igual para ambas líneas celulares utilizadas (resultados no mostrados).

4.3. Supervivencia celular a radiación ionizante en líneas celulares con el silenciamiento de GPx1

La figura 24 muestra los valores obtenidos de la fracción de supervivencia para diferentes dosis de radiación (1-6 Gy) en las líneas celulares MCF-7 shGPx1 y MDA-MB-231shGPx1.

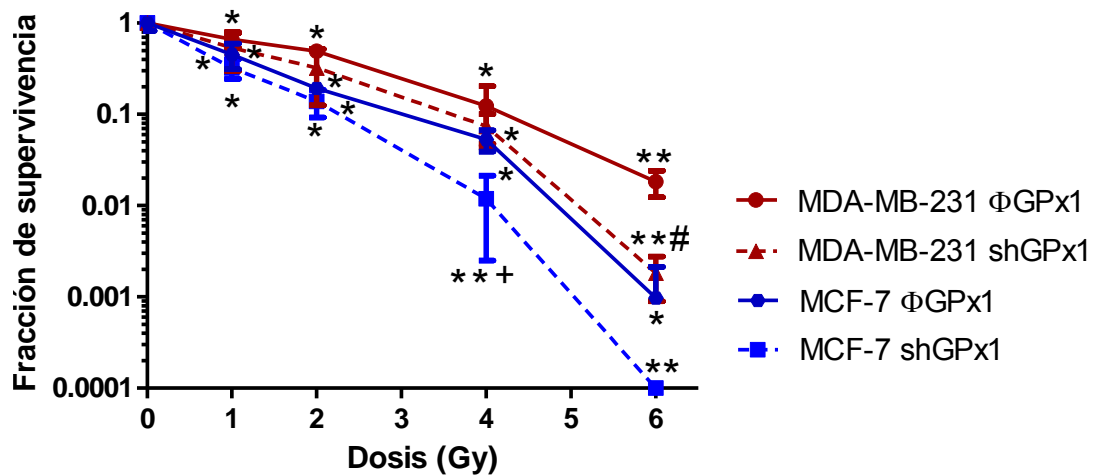


FIGURA 24. Fracción de supervivencia observada para diferentes dosis de radiación ionizante X. En el eje de ordenadas se muestra la fracción de supervivencia en escala logarítmica y en el eje de abscisas se representa las diferentes dosis de radiación ionizante X utilizada para cada línea celular, MDA-MB-231 y MCF-7 shGPx1 y ØGPx1. Los valores representan la media \pm DE de tres experimentos por triplicado. * $P < 0,005$ vs CONTROL, ** $P < 0,0001$ vs CONTROL, + $P < 0,05$ vs MCF-7 ØGPx1, # $P < 0,05$ vs MDA-MB-231 ØGPx1.

TABLA 4. Fracción de supervivencia observada para una dosis de 2 Gy de radiación ionizante en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 shGPX1 y ØGPX1. En la primera columna aparecen los valores de fracción de la supervivencia obtenidos a 2 Gy, en la segunda y tercera columna se representan los valores de los parámetros α y β .

	SF_{2Gy}	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-2})
MDA-MB-231 shGPX1	0,323307±0,1974855	0,5729±0,1726	-0,01521±0,07819
MDA-MB-231 ØGPX1	0,4929909±0,07416979	0,3055±0,07759	-0,04658±0,03168

	SF_{2Gy}	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-2})
MCF-7 shGPX1	0,1390592±0,04696981	1,154±0,1475	0,05155±0,08573
MCF-7 ØGPX1	0,1927125±0,0279972	0,8043±0,1755	0,002145±0,09346

Los resultados de supervivencia celular tras radiación ionizante obtenidos en las líneas celulares silenciadas muestran que tanto MDA-MB-231 shGPx1 como MCF-7 shGPx1 adquirieron radiosensibilidad mostrando máximos valores de fracción de supervivencia celular a 6 Gy de $(0,0018269 \pm 0,000932)$ para MDA-MB-231 shGPx1 respecto de su control $(0,0182255 \pm 0,005887)$ ($P= 0,008$) y a 4 Gy de $(0,0118716 \pm 0,009367)$ para MCF-7 shGPx1 respecto de su control $(0,0529233 \pm 0,013985)$ ($P= 0,01$). Estas líneas muestran una diferencia con respecto a su control transfectado con el plásmido vacío que se hace evidente a partir de la dosis de 2 Gy de radiación ionizante hasta la dosis de 6 Gy. Si comparamos la radiosensibilidad para las dosis de (4 Gy-6 Gy) en ambas líneas celulares GPx1 silenciadas, podemos observar que MCF-7 shGPx1 ha adquirido mayor radiosensibilidad que MDA-MB-231 shGPx1 ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis doctoral se ha estudiado el papel que juega el perfil redox y su implicación en la respuesta al tratamiento con radiación ionizante (rayos-X) en dos líneas celulares tumorales de cáncer de mama, MDA-MB-231 y MCF-7. Para ello, se han utilizado diferentes métodos descritos en diversas publicaciones tal y como se detalla en el apartado de material y métodos (Rotruck y cols, 1973; Sies y cols, 1984; Carlberg y cols, 1985; Verdon y cols, 1995).

Inicialmente, nuestros estudios se han centrado en conocer la respuesta frente radiación ionizante (rayos-X). Los datos reflejados en la figura 2 del apartado de resultados, muestran la respuesta de estas líneas celulares a la radiación. El análisis de los resultados pone de manifiesto las diferencias en radiosensibilidad de las células estudiadas, siendo la línea celular MDA-MB-231 más radiorresistente que la línea celular MCF-7 a la radiación. Los mismos resultados han sido encontrados por otros autores (Gee y cols, 2003). Para estimar la supervivencia celular se ha tomado de referencia el valor de supervivencia obtenido tras irradiación a 2 Gy. Esta dosis de radiación, 2 Gy/día es la utilizada comúnmente en la clínica en el tratamiento frente al cáncer con radioterapia (Askoxylakis y cols, 2011), hecho por el que este valor también, será considerado para extrapolar nuestros resultados.

Con respecto a las medidas de niveles de radicales libres, en líneas generales, la línea celular MCF-7 mostró mayores niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) y de especies reactivas del nitrógeno (RNS) con respecto a la línea celular MDA-MB-231.

Ambas líneas celulares reflejaron un patrón oscilatorio a lo largo del tiempo en los niveles de estos radicales (figura 3-6). Esto podría indicar que, continuamente, su sistema antioxidante podría estar enfrentándose a este estrés oxidativo aunque finalmente no consiga restaurarlo con éxito como se pudo observar, en el caso concreto de ROS, en la línea celular MCF-7, mostrando un valor máximo y significativo a las 72 horas tras irradiación (figura 4). Este resultado guarda coherencia con los valores de supervivencia celular obtenidos en ambas líneas celulares, ya que la línea celular MCF-7 mostró menor fracción de supervivencia que MDA-MB-231, significando que presenta mayor sensibilidad a radiación ionizante y pudiendo ser justificado por

un aumento del estrés oxidativo inducido por este agente físico en esta línea celular.

Por el contrario y de igual forma, podríamos justificar la radiorresistencia mostrada en la línea celular MDA-MB-231, en este caso, la radiación ionizante no pareció estar induciendo mayor muerte celular mediante estrés oxidativo, puesto que los niveles de radicales libres en esta línea celular eran menores que en el caso de la línea celular MCF-7. La inducción del daño por radiación ionizante en la línea MDA-MB-231 que posee p53 mutado, podría estar favoreciendo la expresión de genes antioxidantes y por el contrario, en situación de estrés, las líneas con p53 salvaje, como sucede en el caso de la línea celular MCF-7, se podrían expresar genes que van a conducir un aumento de ROS y a la activación de la apoptosis mediada por p53 (Meyer y cols, 2005; Sablina y cols, 2005; Dayem y cols, 2010). Este hecho es compartido, con una especie en concreto, como es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que también va a provocar senescencia tras irradiación mediante la parada de las células en la fase G1 del ciclo celular mediada por un aumento de la regulación de p53 y su diana transcripcional p21 (Behrend y cols, 2003; Baty y cols, 2005).

En el caso de RNS observamos que a tiempos cortos, en MCF-7, sin ser expuesta a radiación ionizante mostró menores niveles de RNS y, sin embargo, para el caso de MDA-MB-231, se observaron niveles parecidos a los que se obtenían sin ser irradiada (figura 3). A tiempos largos, en concreto a las 72 horas después de la irradiación, se observó una tendencia al aumento de los niveles de nitritos en ambas líneas celulares, siendo más evidente en la línea celular MDA-MB-231. A tiempos cortos, desde los 15 minutos hasta las tres horas, tanto para la línea celular MDA-MB-231 como MCF-7, se observó que estos niveles aumentaban y disminuían siguiendo un patrón oscilatorio que responde a la capacidad de respuesta frente a la situación de estrés oxidativo, inducida por los efectos de la dosis de 2 Gy de radiación X recibida (figura 3). La línea celular MDA-MB-231, nuevamente, parece indicar que su respuesta antioxidante podría estar marcando esa diferencia en el tiempo y respecto de MCF-7. Las RNS llevan a cabo la regulación de diferentes procesos celulares mediante modificaciones post-traslacionales de numerosas proteínas reguladoras como son la S-nitrosilación de la tirosina. La producción de RNS va a provocar daño en el ADN pero este daño inducido a altas concentraciones de RNS favorecerá la respuesta de reparación que activará la

apoptosis y bloqueará la proliferación celular (Stamler y cols, 1992; Hussain y cols, 2008; Thomas y cols, 2008; Souza y cols, 2008; Yakovlev y cols, 2012).

Por lo tanto, un incremento de los niveles de RNS tras radiación en la línea celular MCF-7, cuyo gen p53 se encuentra en estado salvaje, provocaría una menor supervivencia celular como consecuencia de una mayor inducción de muerte por apoptosis. Se sabe que $\text{NO}\bullet$ causa la estabilización y la acumulación de p53, el $\text{NO}\bullet$ conduce a un aumento de la actividad de p53, que a su vez promueve la apoptosis, la detención de ciclo celular y la senescencia en células dañadas (Galli y cols, 2003). En cambio, en la línea celular MDA-MB-231, estos niveles eran menores. Aún observándose una subida a partir de las 24 horas que alcanzó su máximo valor a las 72 horas, a esta línea celular, p53 mutado, no parecía estar afectándole esta subida, no siendo suficiente para activar su respuesta al daño y verse afectada su tasa de supervivencia tras irradiación. Estas diferencias en los niveles de RNS podrían explicar de nuevo, la diferencias en radiosensibilidad encontradas entre ambas líneas celulares estudiadas (Toyokuni y cols, 2006; Dayem y cols, 2010).

Por otro lado en cuanto a los niveles de compuestos antioxidantes, se pudo observar, de nuevo, una tendencia oscilatoria a lo largo del tiempo para ambas formas del compuesto antioxidante analizado, glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG), mostrando la línea celular MDA-MB-231 menores niveles de GSSG que la línea celular MCF-7 (figura 8). Para el caso del GSH, a lo largo del tiempo, ocurrió lo contrario, en la línea celular MDA-MB-231, esos niveles eran superiores a los que se obtenían en la línea celular MCF-7 mostrando mayores diferencias a partir de las 24 horas (figura 7).

Después de conocer, de forma independiente, los valores de GSH y GSSG, se analizaron los datos para obtener, en valor absoluto, los niveles de GSH en ambas líneas celulares. Para ello, se calculó el ratio entre el glutatión reducido y el glutatión total (reducido y oxidado), representado como GSH/GST . Este ratio hace referencia a la cantidad total de GSH efectivo para ser utilizado por el enzima glutatión peroxidasa (GPx) en cada línea celular utilizada en este estudio. Este ratio fue mayor en el caso de la línea celular MDA-MB-231 respecto de la línea celular MCF-7. La línea celular MCF-7

mostró mayores niveles de GSSG que la línea celular MDA-MB-231, por lo tanto el total de GSH disponible por la célula fue mayor en la línea que presentaba una respuesta más resistente frente a radiación ionizante, es decir, la línea celular MDA-MB-231.

Nuevamente, MDA-MB-231, parecía estar mostrando una coherencia con respecto a su perfil redox y su relación con el agente físico utilizado. Una mayor concentración de GSH podría estar confiriéndoles resistencia a apoptosis inducida por radiación ionizante (Toyokuni y cols, 2006; Franco y cols, 2009; Dayem y cols, 2010).

El estudio de la actividad enzimática de los enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRd) en ambas líneas celulares, reflejó un patrón oscilatorio para ambos enzimas que se repetía en las dos líneas celulares analizadas. En el caso de GRd, los niveles de actividad de este enzima, eran mayores en la línea celular MCF-7 que en la línea celular MDA-MB-231, observándose un incremento a las 48 horas que coincidió con un aumento de los niveles de GSSG en esta línea celular (figuras 8 y 11).

El reciclado de la forma reducida del glutatión va a depender de la actividad GRd, MCF-7 podría estar elevando la concentración de GRd para disponer de mayores niveles de GSH que pudieran defenderle del ataque de los radicales libres generados tras radiación. Con respecto a los niveles de actividad enzimática de GPx, observamos que en MDA-MB-231 eran mayores que en el caso de MCF-7 significando que su capacidad para bloquear radicales libres era superior. Por lo tanto, una mayor actividad de GRd en MCF-7 no parecía estar confiriéndole ventaja sobre MDA-MB-231 puesto que para la defensa del ataque de radicales libres, quien parece estar jugando el papel más importante es el enzima GPx (Brigelius-flohé y cols, 2012). Estas diferencias encontradas podrían, en parte, explicar la distinta radiosensibilidad de las células tumorales de mama ensayadas. Así, la línea celular MDA-MB-231 podría ser más resistente a radiación debido a su mayor actividad del enzima antioxidante GPx.

Tomando todos estos resultados preliminares que nos mostraron, como dos líneas celulares con diferente respuesta a radiación ionizante, podrían estar presentando diferente perfil redox y que éste, podría variar a lo largo del tiempo en función de la capacidad de respuesta de ambas líneas utilizadas, nos planteamos estudiar la posibilidad de que la radiación modifique este perfil redox y si esta

modificación podría cambiar la capacidad de respuesta a radiación ionizante en las líneas celulares analizadas en este trabajo. Por este motivo, decidimos trabajar con inhibidores químicos. Uno de ellos, butionina sulfoximina, es un inhibidor químico específico para la biosíntesis del GSH y de GPx, descrito en el apartado de introducción (Liebmann y cols, 1993; Gouazé y cols, 2001; Lewis y cols, 2008; Wang y cols, 2006).

Tras su aplicación observamos, con respecto al control sin BSO, mayor disminución de los niveles de GSH en la línea celular MDA-MB-231 que en MCF-7. Aunque se observara, un aumento a partir de las 24 horas en ambas líneas celulares, la menor reducción en los niveles de GSH en MCF-7, podría estar confiriéndoles resistencia frente al daño inducido por radiación ionizante. Este inhibidor por lo tanto, provocó una depleción de los niveles de GSH que afectó en mayor medida a MDA-MB-231 (figura 12). Estos resultados también han sido encontrados por otros autores (Takahashi y cols, 2010).

De forma contraria a los resultados obtenidos, a lo largo del tiempo, sin tratar con BSO, los niveles de GSSG, sólo eran apreciables en la línea celular MDA-MB-231, por lo tanto, cuando seguidamente analizamos el ratio GSH/GST para ambas líneas celulares tratadas con BSO y los comparamos con los datos obtenidos sin el tratamiento con este inhibidor, pudimos observar que este se invirtió para ambas líneas celulares. En el caso de la línea celular MDA-MB-231, el ratio GSH/GST era menor después de ser tratadas con BSO y de ser expuestas a una dosis de 2 Gy de radiación ionizante, con respecto a las no tratadas, en los diferentes tiempos. Para el caso de la línea celular MCF-7, este ratio GSH/GST, aumentó después de ser tratadas con BSO (figura 9 y 14).

Posteriormente al determinar, mediante ensayos de clonogenicidad, la supervivencia celular frente a radiación ionizante, se observó como la variación de los niveles de compuestos antioxidantes, por el tratamiento con BSO, podrían modificar la respuesta a radiación ionizante en ambas líneas celulares. El uso de BSO podría estar confiriendo radiosensibilidad a la línea celular MDA-MB-231 y, por el contrario,

haciendo más radiorresistente a la línea celular MCF-7. En este caso, si comparamos la respuesta entre ambas líneas celulares después del tratamiento con BSO, MDA-MB-231 mostró una mayor sensibilidad que MCF-7 a una dosis de 6 Gy (figura 16). La mayor depleción de GSH que sufre la línea celular MDA-MB-231 podría estar afectándole en mayor medida. Estos resultados parecen estar relacionados con los obtenidos por un grupo de investigación que muestran como la disminución de los niveles de GSH por BSO van a conferir resistencia a taxol en la línea celular MCF-7 (Liebmann y cols, 1993). Esto parece indicar que GSH podría estar interfiriendo en los cambios en el ciclo celular inducidos por radiación y que tanto la sensibilidad a radiación como la supervivencia celular van a ser dependientes de GSH tal y como ha sido documentado por otros autores (Biaglow y cols, 2006). Los mecanismos de protección de GSH aún no han sido totalmente examinados aunque hay algunos estudios que la relacionan con una proteína resistente a drogas, la proteína 1 (MRP1).

En este sentido, ha sido descrito que ambos van a actuar frente a estrés oxidativo inducido por acción de 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) en células bovinas endoteliales aórticas (Takahashi y cols, 2012).

Tras estos pasos, el siguiente fue utilizar un inhibidor específico del enzima glutatión peroxidasa (GPx), para ello utilizamos el inhibidor químico 3-Deoxiglucosona (3-DG) (Shinoda y cols, 1994; Niwa y cols, 2001). En cuanto a los resultados obtenidos con el tratamiento con 3-DG, con respecto a los niveles de GSH, en ambas líneas celulares, no fue tan acusada esta reducción si comparamos con sus controles sin tratar. Esta depleción será menor que la observada en el caso del tratamiento con BSO. No obstante los niveles de GSH para la línea celular MDA-MB-231 fueron menores cuando tratábamos con 3-DG y, por el contrario, en el caso de MCF-7 parecían aumentar (figura 17).

Al analizar los valores de la actividad del enzima GPx en las líneas celulares tratadas con 3-DG y BSO, observábamos un descenso importante en ambas líneas celulares respecto de las que no han sido tratadas, siendo esta disminución mucho más acusada, durante la primera hora, en el caso de MDA-MB-231 con el tratamiento con 3-DG (figuras 15 y 18). En MDA-MB-231, parece que el efecto del inhibidor 3-DG

tras irradiación, le podría afectar inicialmente bajando sus niveles de actividad hasta en un 50% en algunos de los puntos analizados, para posteriormente verse estimulada observándose un aumento entre los 90 y 210 minutos (figura 18). La línea celular MCF-7 mostró una caída mayor que la sufrida con el tratamiento con BSO (figura 15-18). Este hecho parece concordar con el que se explica en un estudio donde observan que la inhibición, por parte de 3-DG, de la actividad enzimática de GPx, parece ser más acusada en aquellas líneas celulares en las que sus niveles de GSH son menores (Shinoda y cols, 1994; Niwa y cols, 2001). No obstante, MDA-MB-231 reflejó un incremento de la actividad enzimática en el rango entre los 90 y 180 minutos que podría indicar, que en este caso concreto, la línea celular MDA-MB-231 intentara reconstituir, de algún modo, esta actividad sin lograrlo con éxito con un descenso final a lo largo del tiempo (figura 18). En esta línea celular, el tratamiento con radiación ionizante parecía estar estimulando la actividad del enzima GPx y por ello se mostraban, levemente atenuados, los efectos de sensibilidad frente a la radiación (figura 19).

Si observamos el ratio GSH/GST, cuando las líneas celulares son tratadas con 3-DG, estos niveles eran iguales y constantes para ambas a lo largo del tiempo. En la línea celular MCF-7 se observaron niveles parecidos a los encontrados en el caso del tratamiento con BSO, en cambio para MDA-MB-231, estos niveles parecían aumentar.

Para ambas líneas celulares, los niveles de GSSG eran inapreciables, es por este motivo que todo el glutatión que contenían las células, y que conformaba la forma reducida del glutatión, era en este caso, igual al total (resultados no mostrados).

Esto se corresponde con los datos obtenidos en la curva de supervivencia para ambas líneas celulares. Para la dosis de 6 Gy, si comparamos la respuesta a radiación ionizante entre ambas líneas celulares, la supervivencia era mayor en MDA-MB-231 que en MCF-7 (figura 2). En cambio, si comparábamos estas respuestas con sus controles, en este caso, 3-DG confirió radiosensibilidad a la línea celular MDA-MB-231 y radiorresistencia a la línea celular MCF-7, al igual que sucedía en el caso del tratamiento con BSO, aunque en este caso eran ligeramente menores los efectos (figura 19). En el caso de MDA-MB-231, este resultado podría explicarse por el

incremento de la actividad de GPx observado en diferentes tiempos, de manera que estas células intentan restaurar su actividad enzimática antioxidante tras el tratamiento con radiación ionizante. Parece ser que a MDA-MB-231 le afectará una depleción de los niveles de GSH junto con una disminución de la actividad del enzima GPx y por este motivo presentó menor sensibilidad adquirida frente a radiación con el tratamiento con 3-DG. En cambio, en la línea celular MCF-7 se observó un ligero incremento de los niveles de GSH tras inhibición con 3-DG con respecto al tratamiento con BSO, hecho que podría estar explicando la diferencia en la radiorresistencia mostrada a los 6 Gy, puesto que sus niveles de actividad enzimática no se mostraban tan alterados con los diferentes tratamientos. Distintos autores han puesto de manifiesto una relación entre la actividad de 3-DG y el estado de p53, describiendo el efecto anticanceroso que este inhibidor podría tener en líneas celulares de cáncer de hígado con p53 salvaje (Loarca y cols, 2013), por lo tanto, podría estar manteniendo los niveles de GSH, a lo largo del tiempo, en MCF-7 para conferirles protección frente a radiación.

Para determinar la importancia de los niveles de GSH frente a la respuesta celular a la radiación, decidimos bloquear de forma estable la función del enzima glutatión peroxidasa. Para ello inicialmente realizamos un estudio de las diferentes isoformas que podrían estar implicadas en la respuesta a radiación ionizante, en concreto realizamos el mismo estudio en ambas líneas celulares y analizamos por PCR los niveles de mRNA para las isoformas 1, 2, 3 y 4 (Tham y cols, 2002; Keaney y cols, 2003; Chu y cols, 2004; Baliga y cols, 2007; Yu y cols, 2007; Baliga y cols, 2008; Norberg y cols, 2010; Woolston y cols, 2011; Brigelius-flohé y cols, 2012). Los datos que obtuvimos fueron más significativos en el caso de la isoforma 1, mostrando ambas líneas celulares grandes diferencias con respecto a su expresión. La línea celular MCF-7 presentó menores niveles basales en condiciones normales que la línea celular MDA-MB-231 (resultados no mostrados). Este resultado es coherente con los resultados previos obtenidos mediante ensayos clonogénicos (figura 2). El enzima GPx1 podría estar determinando la respuesta a radiación ionizante confiriéndole protección a MDA-MB-231 frente a estrés oxidativo inducido por radiación (Huang y cols, 2012).

Los datos obtenidos después de obtener líneas celulares con un silenciamiento estables del gen GPx1, mostraron que, para MCF-7, los niveles de GSH en los tiempos cortos, eran parecidos a los obtenidos con el inhibidor 3-DG, sufriendo una mayor bajada en los tiempos largos. En cambio, para la línea celular MDA-MB-231, estos niveles disminuyeron a lo largo del tiempo y con respecto al patrón obtenido con 3-DG, no obstante, donde se observó mayor caída de los niveles de GSH, para esta línea celular, fue en el caso del tratamiento con BSO (figuras 12, 17 y 23).

Si analizamos el ratio GSH/GST para ambas líneas celulares obtuvimos los mismos resultados que en el caso del uso del inhibidor 3-DG (resultados no mostrados). Estos datos corresponden con una ausencia de la forma oxidada del glutatión (GSSG) que confirma una pérdida de la actividad enzimática del glutatión peroxidasa. Si este enzima no realiza su función y no utiliza la forma reducida del glutatión no bloqueará los radicales libres y no se generará como consecuencia, la forma oxidada del glutatión.

Finalmente, cuando analizamos la respuesta a radiación ionizante, en ambas líneas celulares donde la función de GPx fue bloqueada de manera estable, observamos, que respecto a sus controles transfectados con el plásmido vacío y sus controles sin transfectar, la respuesta en ambas líneas celulares fue la radiosensibilización (figura 24). En este caso, parece afectar de manera más significativa a la línea celular MCF-7 que a MDA-MB-231. Si observamos los niveles de GSH en MCF-7, aun presentando mayores niveles que los obtenidos en los casos donde tratábamos con el inhibidor químico BSO, la supresión de GPx1 radiosensibilizaría a MCF-7 de forma más evidente, que en caso de MDA-MB-231. Una menor caída de la actividad enzimática de GPx y de GSH podría estar confiriéndoles radiorresistencia (Liebmann y cols, 1993). Mientras que una depleción de GSH, en el caso del silenciamiento génico estaría confiriéndole radiosensibilidad. Existen trabajos que ponen de manifiesto, como la respuesta citotóxica de MCF-7 frente a diferentes agentes quimioterápicos podría ser totalmente contraria, pudiendo presentar mayor resistencia o mayor sensibilidad frente a estos, dependiendo de su estado redox (Zhang y cols, 2013).

Por lo tanto, para la línea celular MDA-MB-231, el papel del enzima antioxidante GPx, es determinante en la respuesta a radiación ionizante en combinación con una disminución de los niveles de GSH, obteniéndose mayor sensibilidad a radiación cuando tratamos con el inhibidor químico BSO. Como ya mencionamos anteriormente, para el caso de MCF-7, GPx1 será la responsable de su aumento de sensibilidad frente a radiación ionizante aun observando que una inhibición química de este enzima podría estar estimulando la biosíntesis de GSH y que de algún modo le estuviera confiriendo resistencia (Liebmann y cols, 1993). Podría ser, en el caso de MCF-7, el uso de inhibidores químicos favoreciera la intervención de otros enzimas, que podrían estar ayudándola a paliar, de algún modo, los efectos de la radiación ionizante mediados por radicales libres. Floyd y cols, describen el papel de otros compuestos que podrían estar regulando los niveles de ROS en la célula, uno de ellos es la proteína PNC1. Se trata de una proteína mitocondrial (transportadora de nucleótidos de pirimidina) que cuando se encuentra sobre-expresada va a provocar una reducción de los niveles de ROS y por el contrario cuando esta reprimida hace que estos niveles sufran un incremento (Floyd y cols, 2007). De esta manera, MCF-7 podría estar activando otras rutas alternativas para hacer frente a las alteraciones de GPx cuando es sometida a la acción de inhibidores químicos.

Por un lado hemos podido poner de manifiesto la importancia que tiene el papel del compuesto antioxidante GSH y como podría estar influyendo en la respuesta antioxidante de ambas líneas celulares. La alteración de este compuesto antioxidante podría estar confiriendo resistencia frente a radiación ionizante en líneas celulares radiosensibles, generando de algún modo una estimulación de su respuesta antioxidante. Por otro lado, se le otorga la mayor importancia a la inhibición génica del enzima antioxidante GPx1. El papel de GPx será crucial, no sólo a la hora de mantener el equilibrio redox sino también en la determinación de la respuesta al tratamiento con radiación ionizante. La línea celular MDA-MB-231, es una línea que responde presentando mayor resistencia al tratamiento con radiación, además de ser un fenotipo más agresivo, conseguir una mayor radiosensibilidad, en esta línea celular, con la supresión de GPx1 y depleción de los niveles de GSH, sería de gran importancia

a la hora de desarrollar nuevas terapias dirigidas a una mejora de la efectividad del tratamiento radioterápico.

Nuestros resultados parecen evidenciar que la radiosensibilidad de las células de cáncer de mama parece estar relacionada con la capacidad que estas células tienen para responder y eliminar el estrés oxidativo inducido por radiación ionizante X.

En resumen, la relación existente, entre la presencia de radicales libres y los procesos de carcinogénesis, convierte a los radicales libres y a las enzimas implicadas en su metabolismo en futuras dianas terapéuticas en una enfermedad como es el cáncer. Todavía son necesarios más estudios para conocer de forma concisa la influencia que ejercen sobre diferentes líneas celulares tumorales y como va a determinar en éstas su capacidad de respuesta frente al daño inducido por radiación ionizante. Por lo tanto, se plantea la necesidad de desarrollar nuevos modelos experimentales que nos permitan vencer las estrategias de resistencia del cáncer al tratamiento con radioterapia (Plotogea y cols, 2013). Es por este hecho que, cualquier mejora de la eficacia de radioterapia, va en beneficio del tratamiento y como consecuencia un mayor porcentaje de pacientes podrían verse favorecidos con el mismo (Begg y cols, 2011).

PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabajo pretende tener una continuidad en el tiempo, pretendemos seguir investigando en el estado redox de estas líneas celulares y analizar mediante diferentes técnicas, el daño en el ADN a lo largo del tiempo, estimado mediante la formación de foci H2AX γ , provocado por radiación en estas líneas celulares. Todo ello nos permitiría conocer los mecanismos que relacionan el daño inducido por radiación con los niveles de radicales libres y de compuestos antioxidantes que presentan las líneas celulares utilizadas en el desarrollo de este trabajo de tesis. Hay trabajos recientes que relacionan una proteína histona como es la H2AX con GPx1. Esta proteína va a jugar un papel muy importante en la reparación del daño en el ADN tras radiación, su función es reclutar proteínas reparadoras en el lugar donde se localiza el daño en el ADN. Parece ser que el selenio, componente del centro catalítico de GPx1

puede estar induciendo la fosforilación de H2AX tras la exposición de radiación ionizante favoreciendo la reparación del daño en el ADN inducido por dicho agente físico (Jerome-Morais y cols, 2013). Por lo tanto, conocer el estado de H2AX en nuestras líneas silenciadas nos dará información de cómo puede estar influenciando la ausencia de GPx1 en respuesta a radiación y esto nos permitirá afianzar los resultados previamente obtenidos.

También, nos gustaría acercarnos a la clínica realizando estudios retrospectivos en biopsias de tumores de pacientes con cáncer de mama con diferentes características genéticas. En estas muestras se pretende analizar la expresión de diferentes proteínas que van a participar en el metabolismo redox. Estas proteínas son, entre otras, la GSTi, GPx1, SOD2, iNOS, todas ellas van a formar parte del proceso de carcinogénesis. La sobre-expresión de SOD2 está relacionada con el desarrollo del cáncer de pulmón, gástrico, colorectal y de mama. Hoy en día ya se está utilizando como biomarcador en cáncer cervical (Termini y cols, 2011). La isoenzima GSTi, la glutatión s-transferasa es un potente metabolizador de sustancias tanto endógenas como exógenas pudiendo influenciar el desarrollo y crecimiento del cáncer de mama (Oguztuzun y cols, 2011). La iNOS, óxido nítrico sintetasa inducible, como ya explicamos en la introducción, también es importante en el desarrollo tumoral modulando procesos tales como son la apoptosis, la angiogénesis, el ciclo celular, la invasión y la metástasis (Dudzinski y cols, 2007). Su expresión ha sido observada en diferentes cánceres (mama, pulmón, próstata, vejiga, colorectal y melanoma), un incremento de su expresión y su actividad ha sido encontrada en el estroma de tumores de mama y de cabeza y cuello (Singh y cols, 2012). Estudiar y conocer su expresión, en tumores de mama, de pacientes que han sido tratadas con radioterapia nos permitirá relacionar y entender mejor la influencia del perfil redox en respuesta a este tratamiento.

Finalmente, nos gustaría trabajar en las rutas de señalización implicadas en el metabolismo redox. Nuestro gen de estudio, GPx1, podría estar regulando otras proteínas que intervienen en el equilibrio redox. Existen estudios preliminares que sugieren una relación entre el gen PNC1 y GPx1. PNC1 (proteína transportadora de

nucleótidos de pirimidina) cuando está sobre-expresada disminuye los niveles de ROS y cuando se encuentra inhibida incrementa los niveles de los mismos (Suzanne Floyd and cols, 2007). Parece ser que en MCF-7, un bloqueo de PNC1 podría afectar a la expresión de GPx1 disminuyendo sus niveles de expresión mientras que con el silenciamiento de GPx1, los niveles de PNC1 se verán aumentados. En el caso de MDA-MB-231, ocurrirá lo contrario, un bloqueo de GPx1 podría disminuir la expresión de PNC1. Serían necesarios más experimentos para poder concluir que existe una conexión entre ambas proteínas implicadas en el metabolismo redox y por este motivo consideramos de interés continuar con este estudio iniciado en instituto de BioSciences de la facultad de bioquímica y biología celular de la universidad de Cork (Irlanda). Esto nos permitiría conocer las diferentes relaciones existentes entre ambas proteínas, sus rutas de señalización así como la influencia de otros factores que pudieran estar participando en esta regulación.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

1. MDA-MB-231 breast cancer cell line shows higher capacity to eliminate free radicals generated after ionizing radiation exposure than MCF-7 cell line. This could account for the radioresistance found in MDA-MB-231.
2. The concentration of nitrites, RSN, observed after cell irradiation, reflects an oscillatory pattern with the time, reaching higher values for MCF-7 cell line, except when these measurements were performed 48 hours after irradiation.
3. Reactive oxygen species, ROS, show an oscillatory pattern after irradiation for both cell lines assayed. MCF-7 cell lines presented a significant increase of ROS expression for 0, 120, 180, 210 minutes as well as for 72 hours, the latter being the maximum value found.
4. Superoxide levels were higher for MCF-7 cell line when short times (up to 210 minutes) were considered. These levels reached their maximum value 90 minutes after irradiation. Taking into account long post-irradiation times, no differences were found for this radical in not one cell line.
5. Antioxidant reduced glutathione concentration, GSH, was increased in MDA-MB-231 compared to MCF-7 cell line, reaching maximum values for long times after radiation of the cells. Contrary to this, oxidized glutathione (glutathione disulphide, GSSH) levels were significantly higher in MCF-7 than in MDA-MB-231, reaching their maximum value 48 hours after irradiation. The ratio of GSH to GST, used to express the redox status, was substantially increased in MDA-MB-231 with the post-irradiation time. This may result in a better protection from oxidative stress in these cells.
6. Glutathione peroxidase, GPx, enzymatic activity was increased in MDA-MB-231 compared to MCF-7 cell line. This activity reached its maximum value in the range of 90 minutes to 24 hours after irradiation. GRd enzymatic activity was higher in MCF-7 than in MDA-MB-231 cell line, reaching the maximum value 48

hours after irradiation. This could be indicative of the redox homeostasis establishment in MCF-7 due to glutathione reductase, GRd, reducing oxidized GSSG into the reduce form, GSH.

- 7.** Treatment of cells with buthionine sulphoximine, BSO, a specific GSH synthesis and GPx activity inhibitor, before irradiation led to a lower GSH level in both cell lines. No differences were found for GSSH levels in these cell lines after BSO treatment. The ratio GSH to GST, was higher for MCF-7 cells treated with BSO. This inhibitor also slows down GPx activity in MDA-MB-231 cells, but nevertheless, those values were higher than those found in MCF-7 cells with the same treatment. BSO also plays an important role in regulating cell survival after irradiation, increasing cellular radiosensitivity in MDA-MB-231 cells and radioresistance in MCF-7 cells, respectively.
- 8.** Treatment of cells with 3-deoxyglucosone, 3-DG, an inhibitor of GPx activity, led to a lower GSH level in both cell lines. No differences were found either for GSSH levels or for GSH to GST ratio in these cell lines after 3-DG treatment. This inhibitor affects GPx activity only in MDA-MB-231 cells. 3-DG also plays an important role in regulating cell survival after irradiation, increasing cellular radiosensitivity in MDA-MB-231 cells and radioresistance in MCF-7 cells, respectively.
- 9.** GPx1 gene silencing was found in 73% for MDA-MB-231 cells and in 46% for MCF-7 cells, respectively. GPx silencing results in an increased depletion of GSH compared to that found after BSO and 3-DG treatment. No differences were found either for GSSH levels or for GSH to GST ratio in these cell lines after GPx1 silencing.
- 10.** Finally, our results show that radiosensitivity of the breast cancer cell lines used in this Doctoral Thesis work is related to the ability of cells to maintain the balance between free radical production after irradiation and their clearance. Thus, redox status within tumour cells is an important parameter that may determine their response to radiation. As such, targeting redox compounds

may be a useful strategy to increase the therapeutic efficacy of conventional radiotherapy.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS:

ROS: Especies reactivas del oxígeno

O₂^{-•}: Superóxido

NADPH: B-nicotinamida ademina dinucleótido fosfato

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

SOD: Superóxido dismutasa

•OH: Radical libre hidroxilo

CAT: Catalasa

GPx: Glutati3n peroxidasa

HO₂^{-•}: Radical hidroperóxido

RNS: Especies reactivas de Nitr3geno

RONS: Especies reactivas del oxígeno y del nitr3geno

NO•: Oxido N3trico

ONOO⁻: Peroxinitrito

NO₂•: Di3xido de nitr3geno

NO₂⁻: Nitrito

NOS: Oxido n3trico sintetasa

nNOS o NOSI: Oxido n3trico sintetasa neuronal

iNOS o NOSII: Oxido n3trico sintetasa inducible

eNOS o NOSIII: Oxido n3trico sintetasa endotelial

mtNOS: Oxido n3trico sintetasa mitocondrial

cGMP: Guanosina monofosfato ciclica

HO-1: Hemo oxigenasa

GSH: Glutati3n reducido

GSSG: Glutati3n oxidado

GRd: Glutati3n reductasa

TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta

PNC1: Prote3na transportadora de nucle3tidos de pirimidina

MAPKs: Mitogen activated protein kinases

RTKs: Receptor tyrosine kinases

ERK1: kinase 1-regulated extracellular signal

AP-1: Activating protein 1

Bcl-2: B cells of lymphoma 2

PI3K/AKT: Phosphatidyl inositol 3-kinase/protein kinase

COX: Cytochrome c oxidase

PI3-K: Phosphoinositide-e-kinase

VEGF: Vascular endothelial growth factor

MDA: Malondialdehyde

TAS: Total antioxidant status

8-OHdG: 8-hydroxy-2-deoxyguanosine

MCL-1: Myeloid leukemia cell 1

HIF-1 α : Hypoxia-inducible factor 1 α

ATM: Ataxia telangiectasia

SIRT: Sirtuins

MMPs: Metalloproteases

MnSOD: Manganese superoxide dismutase

PMN: Polymorphonuclear cells

EMT: Epithelium-mesenchymal transition

ECM: Extracellular matrix

ESR: Estrogen receptor

NMuMG: Mouse mammary epithelial cells

MMR: Family mismatch repair

RF-EMW: Radiofrequency electromagnetic waves

3-DG: Deoxiglucosona

BSO: Butionina sulfoximina

iRNA: RNA de interferencia

siRNA: small interfering RNA

shRNA: short hairpin RNA

-
- FBS:** Suero bovino fetal
- PMFS:** Phenylmethanesulfonyl Fluoride
- NEDA:** N-1 naptiletileno-diaminodihidroclorido
- OPT:** O-ftalaldehído
- NEM:** N-etil-maleinimida
- TCA:** Tricloroacético
- CU:** Cumeno hidroperóxido
- BSA:** Albúmina sérica bovina
- GST:** Glutación total
- FS:** Fracción de supervivencia celular
- EEM:** Error estándar de la media
- DE:** Desviación estándar
- GSTi:** Glutación s-tranferasa

BIBLIOGRAFÍA

- Ambs S, Ogunfusika MO, Merriam WG, Bennett WP, Billiar TR, Harris CC (1998) Up-regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cancer-prone p53 knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (15):8823-8828
- Anastassopoulou J, Theophanides T (2002) Magnesium-DNA interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. *Irradiation and free radicals. Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42 (1):79-91
- Artacho-Cordón F, Ríos-Arrabal S, Lara PC, Artacho-Cordón A, Calvente I, Núñez MI (2012) Matrix metalloproteinases: Potential therapy to prevent the development of second malignancies after breast radiotherapy. *Surgical Oncology* 21 (3):e143-e151
- Artacho-Cordón A, Artacho-Cordón F, Ríos-Arrabal S, Calvente I, Núñez MI (2012) Tumor microenvironment and breast cancer progression: A complex scenario. *Cancer Biology & Therapy* 13 (1):14-24
- Askoxylakis V, Jensen AD, Häfner MF, Fetzner L, Sterzing F, Heil J, Sohn C, Hüsing J, Tiefenbacher U, Wenz F, Debus J, Hof H (2011) Simultaneous integrated boost for adjuvant treatment of breast cancer- intensity modulated vs. conventional radiotherapy: The IMRT-MC2 trial. *BMC Cancer* 11: 249
- Badjatia N, Satyam A, Singh P, Seth A, Sharma A (2010) Altered antioxidant status and lipid peroxidation in Indian patients with urothelial bladder carcinoma. *Urologic Oncology* 28 (4):360-367
- Baliga MS, Wang H, Zhu o P, Schwartz JL, Diamond AM (2007) Selenium and GPx-1 overexpression protect mammalian cells against UV-induced DNA damage. *Biological Trace Element Research* 115:227 -242
- Baliga MS, Diwadkar-Navsariwala V, Koh T, Fayad R, Fantuzzi G, Diamond AM (2008) Selenoprotein deficiency enhances radiation-induced micronuclei formation. *Molecular Nutrition & Food Research* 52:1300 -1304
- Batandier C, Fontaine E, Kériel C, Leverve XM (2002) Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 6(2):175-87
- Baty JW, Hampton MB, Winterbourn CC (2005) Proteomic detection of hydrogen peroxide-sensitive thiol proteins in Jurkat cells. *Biochemical Journal* 389 (Pt 3):785
- Behrend L, Henderson G, Zwacka R (2003) Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochemical Society Transactions* 31:1441-1444
- Begg AC, Stewart FA, Vens C (2011) Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs...*Nature Reviews Cancer* 11(4):239-53
- Bhattarai G, Lee Y-H, Lee N-H, Yun J-S, Hwang P-H, Yi H-K (2011) c-myb mediates inflammatory reaction against oxidative stress in human breast cancer cell line, MCF-7. *Cell Biochemistry and Function* 29 (8):686-693
- Biaglow JE, Ayene IS, Tuttle SW, Koch CJ, Donahue J, Mieyal JJ (2006) Role of vicinal protein thiols in radiation and cytotoxic responses. *Radiation Research* 165(3):307-17
- Bozinovski S, Seow HJ, Crack PJ, Anderson GP, Vlahos R (2012) Glutathione peroxidase-1 primes pro-inflammatory cytokine production after LPS challenge in vivo. *PLoS One* 7:e33172
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry* 72: 248-254.
- Brennan PA, Umar T, Smith GI, McCauley P, Peters WJ, Langdon JD (2002) Expression of type 2 nitric oxide synthase and p53 in Warthin's tumour of the parotid. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 31(8):458-462
- Brigelius-Flohé R, Kipp A (2009) Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790 (11):1555-1568
- Brigelius-Flohe R, Kipp AP (2012) Physiological functions of GPx2 and its role in inflammation-triggered carcinogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1259:19 -25

- Bulotta S, Barsacchi R, Rotiroti D, Borgese N, Clementi E (2001) Activation of the endothelial nitric-oxide synthase by tumor necrosis factor- α a novel feedback mechanism regulating cell death. *Journal of Biological Chemistry* 276 (9):6529-6536
- Burnett JC, Rossi JJ (2012) RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chemistry Biology* 19(1):60-71
- Cadenas E, Sies H (1998) The lag phase. *Free radical research* 28 (6):601-609
- Cao X-h, Wang A-h, Wang C-l, Mao D-z, Lu M-f, Cui Y-q, Jiao R-z (2010) Surfactin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS/JNK-mediated mitochondrial/caspase pathway. *Chemico-Biological Interactions* 183 (3):357-362
- Carlberg I, Mannervik B (1985) Glutathione reductase. *Methods Enzymology* 113:484-90
- Chen QM, Bartholomew JC, Campisi J, Acosta M, Reagan JD, and Ames B (1998) Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochemical Journal* 332 (Pt 1):43
- Chodosh LA (2002) The reciprocal dance between cancer and development. *The New England Journal of Medicine* 347(2):134
- Chu FF, Esworthy RS, Chu PG, Longmate JA, Huycke MM, Wilczynski S, Doroshow JH, (2004) Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes. *Cancer Res* 64:962-968
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30 (7):1073-1081
- Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, Ursini F, Kolle S, Roveri A, Brielmeier M, Wurst W, Maiorino M, Bornkamm GW (2005) The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Molecular and Cellular Biology* 25:7637-7644
- Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420 (6917):860-867
- Crujeiras AB, Díaz-Lagares A, Carreira MC, Amil M, Casanueva FF (2013) Oxidative stress associated to dysfunctional adipose tissue: a potential link between obesity, type 2 diabetes mellitus and breast cancer. *Free Radical Research* 47 (4):243-256
- Cullen JJ, Mitros FA and Oberley LW (2003) Expression of antioxidant enzymes in diseases of the human pancreas: another link between chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreas* 26: 23-27
- Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D (2001) Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological Reviews* 53 (1):135-159
- Davies K, Delsignore M (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *Journal of Biological Chemistry* 262 (20):9908-9913
- Dayem AA, Choi HY, Kim JH, Cho SG (2010) Role of oxidative stress in stem, cancer, and cancer stem cells. *Cancers (Basel)* 2(2):859-84
- de la Cruz-Morcillo MA, García-Cano J, Arias-González L, García-Gil E, Artacho-Cordón F, Ríos-Arrabal S, Valero ML, Cimas FJ, Serrano-Oviedo L, Villas MV (2013) Abrogation of the p38 MAPK α signaling pathway does not promote radioresistance but its activity is required for 5-Fluorouracil-associated radiosensitivity. *Cancer Letters* 335(1):66-74
- Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M (2005). The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer* 104: 1129-37
- Delwar ZM, Vita MF, Siden Åk, Cruz M, Yakisich JS (2011) In vitro inhibition of topoisomerase II α by reduced glutathione. *Acta Biochimica Polonica* 58 (2):265-267
- de Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, Bronson RT, Silvestro MJ, Wild S, Zheng SS, Beart PM, Hertzog PJ, Kola I (1998) Mice with a homo-zygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the

- oxidative stress- inducing agents paraquat and hy-drogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry* 273:22528-22536
- De Ridder M, Verellen D, Verovski V, Storme G (2008) Hypoxic tumor cell radiosensitization through nitric oxide. *Nitric Oxide* 19 (2):164-169
- Desai NR, Kesari KK, Agarwal A (2009) Pathophysiology of cell phone radiation: oxidative stress and carcinogenesis with focus on male reproductive system. *Reproductive Biology and Endocrinology* 7 (114):1-9
- Dickins RA , Hemann MT, Zilfou JT, Simpson DR, Ibarra I, Hannon GJ, Lowe SW (2005) Probing tumor phenotypes using stable and regulated synthetic microRNA precursors. *Nature Genetics* 37:1289 -1295
- Donovan M, Carmody RJJ, Cotter TG (2001) Light-induced photoreceptor apoptosis in vivo requires neuronal nitric-oxide synthase and guanylate cyclase activity and is caspase-3-independent. *Journal of Biological Chemistry* 276 (25):23000-23008
- Dudzinski DM, Michel T (2007) Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovascular Research* 75 (2):247-260
- Fay M, Poole CM, Pratt G (2013) Recent advances in radiotherapy for thoracic tumours. *The Journal of Thoracic Disease (Suppl 5):S551-S555*
- Favre C, Zhdanov A, Leahy M, Papkovsky D, O'Connor R (2010) Mitochondrial pyrimidine nucleotide carrier (PNC1) regulates mitochondrial biogenesis and the invasive phenotype of cancer cells. *Oncogene* 29: 3964–3976
- Ferrari CKB, Franca EL, Honorio-Franca AC (2009) Nitric oxide, health and disease. *Journal of Applied Biomedicine* 7:163-173
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE and Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double -stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811
- Flohé L (1989) *The Selenoprotein Glutathione Peroxidase*. John Wiley & Sons Inc
- Floyd S, Favre C, Lasorsa FM, Leahy M, Trigiante G, Stroebel P, Marx A, Loughran G, O'Callaghan K, Marobbio CM, Slotboom DJ, Kunji ER, Palmieri F, O'Connor R (2007) The insulin-like growth factor-I-mTOR signaling pathway induces the mitochondrial pyrimidine nucleotide carrier to promote cell growth. *Molecular Biology of the Cell* 18(9):3545-55
- Folkes LK, O'Neill P (2013) Modification of DNA damage mechanisms by nitric oxide during ionizing radiation. *Free Radical Biology and Medicine* 58 (0):14-25
- Forrester K, Ambs S, Lupold SE, Kapust RB, Spillare EA, Weinberg WC, Felley-Bosco E, Wang XW, Geller DA, Tzeng E (1996) Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(6):2442–2447
- Franco R, Cidlowski JA (2009) Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 10:1303-14
- Fraass BA, Moran JM (2012) Quality, technology and outcomes: evolution and evaluation of new treatments and/or new technology. *Seminars in Radiation Oncology* 22(1):3-10
- Friedman J, Kraus S, Hauptman Y, Schiff Y, Seger R (2007) Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies. *The Biochemical Journal* 405 (Pt 3):559
- Fuchs-Tarlovsky V (2013) Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* 29 (1):15-21
- Galli S, Labato MIs, de Kier Joffé EB, Carreras MaC, Poderoso JJ (2003) Decreased mitochondrial nitric oxide synthase activity and hydrogen peroxide relate persistent tumoral proliferation to embryonic behavior. *Cancer Research* 63 (19):6370-6377
- Gee JM and Nicholson RI (2003) Expanding the therapeutic repertoire of epidermal growth factor receptor blockade: radio-sensitization. *Breast Cancer Research* 5:126-129
- Goh J, Enns L, Fatemie S, Hopkins H, Morton J, Pettan-Brewer C, Ladiges W (2011) Mitochondrial targeted catalase suppresses invasive breast cancer in mice. *BMC cancer* 11 (1):191

- Gomes A, Fernandes E, Lima JL (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 65(2-3):45-80
- Gouazé V, Mirault ME, Carpentier S, Salvayre R, Levade T, Andrieu-Abadie N (2001) *Molecular Pharmacology* 60(3):488-96
- Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:5547-5551
- Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M (2000) Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20 (10):2175-2183
- Griffith OW (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine* 27 (9-10):922-935
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140 (6):883-899
- Gupta S, Schoer RA, Egan JE, Hannon GJ, Mittal V (2004) Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:1927-1932
- Gurjar MV, Deleon J, Sharma RV, Bhalla RC (2001) Role of reactive oxygen species in IL-1 β -stimulated sustained ERK activation and MMP-9 induction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 281 (6):H2568-H2574
- Halliwell B (1999) Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 443 (1):37-52
- Halliwell B, Gutteridge J (2007) *Free radicals in biology and medicine*, 4th edn. Oxford University, New York
- Hasan HR, Mathkor TH, Al-Habal MH (2012) Superoxide Dismutase Isoenzyme Activities in Plasma and Tissues of Iraqi Patients with Breast Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13:2571-2576
- He Y, Chen J, Ren J, Wang G, Cai G (2002) Type I collagen inhibits hydroxyl radical-induced apoptosis. *Journal of Biochemistry* 132 (3):373-379
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL and Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241-251
- Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT, Cao J, Gargano M, Ugawara M S, Funk CD (1997) Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increase in sensitivity to hyperoxia. *The Journal of Biological Chemistry* 272:16644-16651
- Huang Y, Fang W, Wang Y, Yang W, Xiong B (2012) Transforming growth factor- β 1 induces glutathione peroxidase-1 and protects from H₂O₂-induced cell death in colon cancer cells via the Smad2/ERK1/2/HIF-1 α pathway. *International Journal of Molecular Medicine* 29(5):906-12
- Hussain SP, He P, Subleski J, Hofseth LJ, Trivers GE, Mechanic L (2008) Nitric oxide is a key component in inflammation-accelerated tumorigenesis. *Cancer Res* 68:7130
- Iglesias-de la Cruz MC, Ruiz-Torres P, Alcamí J, Díez-Marques L, Ortega-Velázquez R, Chen S, Rodríguez-Puyol M, Ziyadeh FN, Rodríguez-Puyol D (2001) Hydrogen peroxide increases extracellular matrix mRNA through TGF- β in human mesangial cells. *Kidney International* 59 (1):87-95
- Iolascon A, De Falco L, Beaumont C (2009) Molecular basis of inherited microcytic anemia due to defects in iron acquisition or heme synthesis. *Hematologica* 94 (3):395-408
- Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, Nakada K, Honma Y, Hayashi J-I (2008) ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science Signaling* 320 (5876):661-664
- Jeggo P, Lavin MF (2009) Cellular radiosensitivity: how much better do we understand it? *International Journal of Radiation Biology* 85 (12):1061-1081

- Jerome-Morais A, Bera S, Rachidi W, Gann PH, Diamond AM (2013) The effects of selenium and the GPx-1 selenoprotein on the phosphorylation of H2AX. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830(6):3399-406
- Jian Liu K, Rosenberg GA (2005) Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radical Biology & Medicine* 39(1):71-80
- Joiner M and van der Kogel A (2009) *Basic Clinical Radiobiology* Edited by. Fourth edition published in Great Britain by Hodder Arnold
- Jomova K, Valko M (2011) Importance of iron chelation in free radical-induced oxidative stress and human disease. *Current Pharmaceutical Design* 17 (31):3460-3473
- Jones DP, Carlson JL, Mody Jr VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg Jr P (2000) Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radical Biology and Medicine* 28 (4):625-635
- Kempner ES (2011) Direct effects of ionizing radiation on macromolecules. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 49 (12):827-831
- Keaney Jr JF, Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, Massaro JM, Sutherland P, Vita JA, Benjamin EJ (2003) Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler. Thrombosis and Vascular Biology* 23: 434-439
- Kheradmand F, Werner E, Tremble P, Symons M, Werb Z (1998) Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* 280 (5365):898-902
- Kim H-S, Patel K, Muldoon-Jacobs K, Bisht KS, Aykin-Burns N, Pennington JD, van der Meer R, Nguyen P, Savage J, Owens KM (2010) SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell* 17 (1):41-52
- Kim J, Gherasim C, Banerjee R (2008) Decyanation of vitamin B12 by a trafficking chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (38):14551-14554
- Kirkali GI, Keles D, Canda AE, Terzi C, Reddy PT, Jaruga P, Dizdaroglu M, Oktay Gln (2011) Evidence for upregulated repair of oxidatively induced DNA damage in human colorectal cancer. *DNA Repair* 10 (11):1114-1120
- Klaunig JE, Kamendulis LM (2004) The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:239-267
- Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA (2010) Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic Pathology* 38 (1):96-109
- Kumar A, Pant M, Singh H, Khandelwal S (2012) Assessment of the redox profile and oxidative DNA damage (8-OHdG) in squamous cell carcinoma of head and neck. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 8 (2):254-259
- Kumar B, Koul S, Khandrika L, Meacham RB, Koul HK (2008) Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer research* 68 (6):1777-1785
- Lee JJ, Lee JH, Ko YG, Hong SI, Lee JS (2009) Prevention of premature senescence requires JNK regulation of Bcl-2 and reactive oxygen species. *Oncogene* 29 (4):561-575
- Lei XG, Cheng WH and McClung JP (2007) Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Annual Review of Nutrition* 27: 41-61
- Leonardo CC, Pennypacker KR (2009) Neuroinflammation and MMPs: potential therapeutic targets in neonatal hypoxic-ischemic injury. *Journal of Neuroinflammation* 6:13
- Leszczynski D, Joenväärä S, Reivinen J, Kuokka R (2002) Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects. *Differentiation* 70 (2-3):120-129
- Lewis-Wambi JS, Kim HR, Wambi C, Patel R, Pyle JR, Klein-Szanto AJ, Jordan VC (2008) *Breast Cancer Research* 10(6):R104
- Liebmann JE, Hahn SM, Cook JA, Lipschultz C, Mitchell JB, Kaufman DC (1993) *Cancer Research* 53(9):2066-70

- Li H, Sekine M, Seng S, Avraham S, Avraham HK (2009) BRCA1 Interacts with Smad3 and Regulates Smad3-Mediated TGF- β Signaling during Oxidative Stress Responses. *PLoS one* 4 (9):e7091
- Li L, Ishdorj G, Gibson SB (2012) Reactive oxygen species regulation of autophagy in cancer: Implications for cancer treatment. *Free Radical Biology and Medicine* 53 (7):1399-1410
- Liu J, Hinkhouse MM, Sun W (2004) Redox regulation of pancreatic cancer cell growth: role of glutathione peroxidase in the suppression of the malignant phenotype. *Human Gene Therapy* 15: 239-250
- Li Z-y, Yang Y, Ming M, Liu B (2011) Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 414 (1):5-8
- Loarca L, Sassi-Gaha S, Artlett CM (2013) Two α -dicarbonyls downregulate migration, invasion, and adhesion of liver cancer cells in a p53-dependent manner. *Digestive and Liver Disease* 45(11):938-46
- López E, Guerrero R, Núñez MI, del Moral R, Villalobos M, Martínez-Galán J, Valenzuela MT, Muñoz-Gómez JA, Oliver FJ, Martín-Oliva D, Ruiz de Almodóvar JM (2005) Early and late skin reactions to radiotherapy for breast cancer and their correlation with radiation-induced DNA damage in lymphocytes. *Breast Cancer Research* 7(5):R690-8
- Luo J, Solimini NL, Elledge SJ (2009) Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136 (5):823-837
- Mahelkova G, Korynta J, Moravova A, Novotna J, Vytasek R, Wilhelm J (2008) Changes of extracellular matrix of rat cornea after exposure to hypoxia. *Physiological research* 57 (1):73
- Marnett LJ (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21 (3):361-370
- Martínez Sarrasague M, Barrado DA, Zubillaga M, Hager A, De Paoli T, Boccio J (2006) Conceptos actuales del metabolismo del glutatión Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 40 (1):45-54
- Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen H-Y, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C (2009) Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 137 (6):1062-1075
- Meley D, Bauvy C, Houben-Weerts JH, Dubbelhuis PF, Helmond MT, Codogno P, Meijer AJ (2006) AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* 281 (46):34870-34879
- Mena S, Ortega A, Estrela JM (2009) Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 674 (1):36-44
- Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA (2005) H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary anti-oxidant responsive factor. *EMBO J* 12: 2005–2015
- Mori K, Shibamura M, Nose K (2004) Invasive potential induced under long-term oxidative stress in mammary epithelial cells. *Cancer Research* 64 (20):7464-7472
- Muriel P (2009) Role of free radicals in liver diseases. *Hepatology International* 3 (4):526-536
- Murley JS, Kataoka Y, Miller RC, Li JJ, Woloschak G, Grdina DJ (2011) SOD2-mediated effects induced by WR1065 and low-dose ionizing radiation on micronucleus formation in RKO human colon carcinoma cells. *Radiation Research* 175 (1):57-65
- Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *The FASEB Journal* 6 (12):3051-3064
- Nelson KK, Ranganathan AC, Mansouri J, Rodriguez AM, Providence KM, Rutter JL, Pumiglia K, Bennett JA, Melendez JA (2003) Elevated Sod2 Activity Augments Matrix Metalloproteinase Expression Evidence for the Involvement of Endogenous Hydrogen Peroxide in Regulating Metastasis. *Clinical Cancer Research* 9 (1):424-432
- Nguyen VD, Saaranen MJ, Karala AR, Lappi AK, Wang L, Raykhel IB, Alanen HI, Salo KE, Wang CC, Ruddock LW (2010) Two endoplasmic reticulum PDI per-oxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation. *Journal of Molecular Biology* 406:503-515

- Niwa T, Tsukushi S (2001) 3-deoxyglucosone and AGEs in uremic complications: inactivation of glutathione peroxidase by 3-deoxyglucosone. *Kidney International Supplements* 78:S37-41
- Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B (2010) Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396:95-100
- Oguztuzun S, Abu-Hijleh A, Coban T, Bulbul D, Kilic M, Iscan M, Iscan M (2011) GST isoenzymes in matched normal and neoplastic breast tissue. *Neoplasma* 58(4):304-10
- Okezie I, Harparkash K, Haliwell B (1991) Oxygen free radicals and human diseases. *Journal of the Royal Society of Health* 34:171-177
- Okubo T, Saito T, Mitomi H, Takagi T, Torigoe T, Suehara Y, Kaneko K, Yao T (2013) p53 mutations may be involved in malignant transformation of giant cell tumor of bone through interaction with GPX1. *Virchows Archiv* 463(1):67-77
- Oronsky BT, Knox SJ, Scicinski JJ (2012) Is nitric oxide (NO) the last word in radiosensitization? A review. *Translational Oncology* 5 (2):66-71
- Pande D, Negi R, Khanna S, Khanna R, Khanna HD (2011) Vascular endothelial growth factor levels in relation to oxidative damage and antioxidant status in patients with breast cancer. *Journal of Breast Cancer* 14 (3):181-184
- Pande D, Negi R, Karki K, Khanna S, Khanna RS, Khanna HD (2012) Oxidative damage markers as possible discriminatory biomarkers in breast carcinoma. *Translational research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 160 (6):411-418
- Pani G, Galeotti T, Chiarugi P (2010) Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer and Metastasis Reviews* 29 (2):351-378
- Panis C, Herrera ACSA, Victorino VJ, Campos FC, Freitas LF, Rossi T, Colado Simão AN, Cecchini AL, Cecchini R (2012) Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Research and Treatment* 133 (1):89-97
- Papanikolaou V, Iliopoulos D, Dimou I, Dubos S, Tsougos I, Theodorou K, Kitsiou-Tzeli S, Tsezou A (2009) The involvement of HER2 and p53 status in the regulation of telomerase in irradiated breast cancer cells. *International Journal of Oncology* 35(5):1141-9
- Paquette B, Baptiste C, Therriault H, Arguin G, Plouffe B, Lemay R (2007) In vitro irradiation of basement membrane enhances the invasiveness of breast cancer cells. *British journal of cancer* 97 (11):1505-1512
- Parker R, Sheth U (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Molecular Cell* 25:635-646
- Pervin S, Tran L, Urman R, Braga M, Parveen M, Li S, Chaudhuri G, Singh R (2013) Oxidative stress specifically downregulates survivin to promote breast tumour formation. *British journal of cancer* 108 (4):848-858
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W (2005) Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 309:1573-1576
- Plotogea Amalia, Chiarelli Anna M, Mirea Lucia, Prummel Maegan V, Chong Nelson, Shumak Rene S, O'Malley Frances P, Holloway Claire MB (2013) Factors associated with wait times across the breast cancer treatment pathway in Ontario. *Springerplus* 2: 388
- Polidori MC, Stahl W, Eichler O, Niestroj I, Sies H (2001) Profiles of antioxidants in human plasma. *Free Radical Biology and Medicine* 30 (5):456-462
- Polyak K, Weinberg RA (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews Cancer* 9 (4):265-273
- Pourahmad J, O'Brien PJ, Jokar F, Daraei B (2003) Carcinogenic metal induced sites of reactive oxygen species formation in hepatocytes. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* 17 (5-6):803

- Prousek J (2007) Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure and Applied Chemistry* 79 (12):2325-2338
- Purdum S, Chen QM (2005) Epidermal growth factor receptor-dependent and-independent pathways in hydrogen peroxide-induced mitogen-activated protein kinase activation in cardiomyocytes and heart fibroblasts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 312 (3):1179-1186
- Quiévryn G, Messer J, Zhitkovich A (2002) Carcinogenic chromium (VI) induces cross-linking of vitamin C to DNA in vitro and in human lung A549 cells. *Biochemistry* 41 (9):3156-3167
- Rahman MA, Senga T, Ito S, Hyodo T, Hasegawa H, Hamaguchi M (2010) S-nitrosylation at cysteine 498 of c-Src tyrosine kinase regulates nitric oxide-mediated cell invasion. *Journal of Biological Chemistry* 285 (6):3806-3814
- Raj L, Ide T, Gurkar AU, Foley M, Schenone M, Li X, Tolliday NJ, Golub TR, Carr SA, Shamji AF (2012) Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature* 481 (7382):531-534
- Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J (2009) siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61(9):746-59
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S (2010) Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* 90 (4):1383-1435
- Reliene R, Schiestl RH (2006) Glutathione depletion by buthionine sulfoximine induces DNA deletions in mice. *Carcinogenesis* 27(2):240-4
- Reynolds M, Stoddard L, Bepalov I, Zhitkovich A (2007) Ascorbate acts as a highly potent inducer of chromate mutagenesis and clastogenesis: linkage to DNA breaks in G2 phase by mismatch repair. *Nucleic acids research* 35 (2):465-476
- Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, Espey MG, Miranda KM, Paolocci N, Feelisch M, Fukuto J, Wink DA (2004) The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biological chemistry* 385 (1):1-10
- Roberts RA, Laskin DL, Smith CV, Robertson FM, Allen EM, Doorn JA, Slikker W (2009) Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicological sciences* 112 (1):4-16
- Rosenberg GA (2002) Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 39 (3):279-291
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179 (73):588-90
- Rhyu DY, Yang Y, Ha H, Lee GT, Song JS, Uh ST, Lee HB (2005) Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology* 16:667-675
- Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM (2005) The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nature medicine* 11 (12):1306-1313
- Schafer FQ, Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine* 30 (11):1191-1212
- Schafer ZT, Grassian AR, Song L, Jiang Z, Gerhart-Hines Z, Irie HY, Gao S, Puigserver P, Brugge JS (2009) Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature* 461 (7260):109-113
- Scherz-Shouval R, Elazar Z (2007) ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends in Cell Biology* 17 (9):422-427
- Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC (2010) Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* 31 (1):37-49
- Schramek D, Kotsinas A, Meixner A, Wada T, Elling U, Pospisilik JA, Neely GG, Zwick R-H, Sigl V, Forni G (2011) The stress kinase MKK7 couples oncogenic stress to p53 stability and tumor suppression. *Nature genetics* 43 (3):212-219

- Seligman J, Newton GL, Fahey RC, Shalgi R, Kosower NS (2005) Nonproteinthiols and disulfides in rat epididymal spermatozoa and epididymal fluid: role of gamma-glutamyl-transpeptidase in sperm maturation. *Journal of Andrology* 26:629-637
- Sethy-Coraci I, Crock LW, Silverstein SC (2005) PAF-receptor antagonists, lovastatin, and the PTK inhibitor genistein inhibit H₂O₂ secretion by macrophages cultured on oxidized-LDL matrices. *Journal of Leukocyte Biology* 78 (5):1166-1174
- Shen K, Ji L, Chen Y, Yu Q, Wang Z (2011) Influence of glutathione levels and activity of glutathione-related enzymes in the brains of tumor-bearing mice. *Bioscience Trends* 5 (1):30-37
- Shinoda T, Hayase F, Kato H (1994) Suppression of cell cycle progression during the S phase of rat fibroblast by 3-deoxyglucosone, a Millard reaction intermediate. *Biosci Biotech Biochem*, 58:2215-2219
- Sies H, Akerboom TP (1984) Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues. *Methods Enzymology* 105:445-51
- Singh S, Gupta AK (2011) Nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 67 (6):1211-1224
- Singh SP, Konwar BK (2012) Molecular docking studies of quercetin and its analogues against human inducible nitric oxide synthase. *Springerplus* 1(1):69
- Singh S, Sreenath K, Pavithra L, Roy S, Chattopadhyay S (2010) SMAR1 regulates free radical stress through modulation of AKR1a4 enzyme activity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (7):1105-1114
- Skrzydłowska E, Sulkowski S, Koda M, Zalewski B, Kanczuga-Koda L, Sulkowska M (2005) Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* 11 (3):403-406
- Souza JM, Peluffo G, Radi R (2008) Protein tyrosine nitration—functional alteration or just a biomarker? *Free Radical Biology & Medicine* 45:357–66
- Speisky H, Gómez M, Burgos-Bravo F, López-Alarcón C, Jullian C, Olea-Azar C, Aliaga ME (2009) Generation of superoxide radicals by copper-glutathione complexes: Redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17 (5):1803-1810
- Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T (1992) S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:444–8
- Sung HJ, Ma W, Wang P-y, Hynes J, O'Riordan TC, Combs CA, McCoy JP, Bunz F, Kang J-G, Hwang PM (2010) Mitochondrial respiration protects against oxygen-associated DNA damage. *Nature Communications* 1:5
- Takahashi K, Tatsunami R, Oba T, Tampo Y (2010) Buthioninesulfoximine promotes methylglyoxal-induced apoptotic cell death and oxidative stress in endothelial cells. *The journal Biological and Pharmaceutical Bulletin* 33(4):556-60
- Takahashi K, Tatsunami R, Sato K, Tampo Y (2012) Multidrug resistance associated protein 1 together with glutathione plays a protective role against 4-hydroxy-2-nonenal-induced oxidative stress in bovine aortic endothelial cells. *The journal Biological and Pharmaceutical Bulletin* 35(8):1269-74
- Tao R, Coleman MC, Pennington JD, Ozden O, Park S-H, Jiang H, Kim H-S, Flynn CR, Hill S, Hayes McDonald W (2010) Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Molecular cell* 40 (6):893-904
- Tarpey MM, Fridovich I (2001) Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circulation Research* 89(3):224-36
- Teixeira V, Valente H, Casal S, Marques F, Moreira P (2013) Blood antioxidant and oxidative stress biomarkers acute responses to a 1000-m kayak sprint in elite male kayakers. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* 53 (1):71-79

- Ten Kate M, van der Wal J, Sluiter W, Hofland L, Jeekel J, Sonneveld P, van Eijck C (2006) The role of superoxide anions in the development of distant tumour recurrence. *British Journal of Cancer* 95 (11):1497-1503
- Termini L, Filho AL, Maciag PC, Etlinger D, Alves VA, Nonogaki S, Soares FA, Villa LL (2011) Deregulated expression of superoxide dismutase-2 correlates with different stages of cervical neoplasia. *Disease Markers* 30(6):275-81
- Tham DM, Whitin JC, Cohen HJ (2002) Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis. *Pediatric Research* 51:641-646
- Thermann R, Hentze MW (2007) *Drosophila* miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* 447:875-878
- Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer* 2 (6):442-454
- Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S (2008) The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radical Biology & Medicine* 45:18-31
- Toyokuni S (2006) Novel aspects of oxidative stress-associated carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal* 8(7-8):1373-7
- Tsukushi ST (2001) *Kidney Int Suppl.* 78: S37-41
- Turi JL, Jaspers I, Dailey LA, Madden MC, Brighton LE, Carter JD, Nozik-Grayck E, Piantadosi CA, Ghio AJ (2002) Oxidative stress activates anion exchange protein 2 and AP-1 in airway epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 283 (4):L791-L798
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39 (1):44-84
- Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160 (1):1-40
- Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & Development* 20:515-524
- Vera-Ramirez L, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC, Ramirez-Tortosa CL, Granados-Principal S, Lorente JA, Quiles JL (2011) Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. *Biological bases to develop oxidative-based therapies. Critical Reviews in Oncology/Hematology* 80 (3):347-368
- Verdon CP, Burton BA, Prior RL (1995) Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP+ when the Griess reaction is used to assay for nitrite. *Anal Biochemistry* 224 (2):502-508
- Vesper BJ, Elseth KM, Tarjan G, Haines III GK, Radosevich JA (2010) Long-term adaptation of breast tumor cell lines to high concentrations of nitric oxide. *Tumor Biology* 31 (4):267-275
- Vogelzang NJ, Benowitz SI, Adams S, Aghajanian C, Chang SM, Dreyer ZE, Janne PA, Ko AH, Masters GA, Odenike O, Patel JD, Roth BJ, Samlowski WE, Seidman AD, Tap WD, Temel JS, Von Roenn JH, Kris MG (2011) Clinical cancer advances 2011: Annual Report on Progress Against Cancer from the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology* 30(1):88-109.
- Wang XD, Vatamaniuk MZ, Wang SK, Roneker CA, Simmons RA, Lei XG (2008) Molecular mechanisms for hyperinsulinaemia induced by overproduction of selenium-dependent glutathione peroxidase-1 in mice. *Diabetologia* 51:1515-1524
- Wang XJ, Hayes JD, Wolf CR (2006) *Cancer Research* 66(22):10983-94
- Wang Y, Shang Y (2013) Epigenetic control of epithelial-to-mesenchymal transition and cancer metastasis. *Experimental Cell Research* 319 (2):160-169

- Wardman P (2007) Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radical Biology & Medicine* 43(7):995-1022
- Weinberg F, Chandel NS (2009) Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. *Cellular and molecular life sciences* 66 (23):3663-3673
- Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, Flomenberg N, Birbe RC, Witkiewicz AK, Howell A, Pavlides S, Tsigos A, Ertel A, Pestell RG (2011) Hyperactivation of oxidative mitochondrial metabolism in epithelial cancer cells in situ: visualizing the therapeutic effects of metformin in tumor tissue. *Cell Cycle* 10 (23):4047-4064
- Wolf FI, Torsello A, Tedesco B, Fasanella S, Boninsegna A, D'Ascenzo M, Grassi C, Azzena GB, Cittadini A (2005) 50-Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: possible involvement of a redox mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1743 (1):120-129
- Wong K-K, Engelman JA, Cantley LC (2010) Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* 20 (1):87-90
- Wood LD, Parsons DW, Jones Sn, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J (2007) The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science Signaling* 318 (5853):1108
- Woolston CM, Al-Attar A, Storr SJ, Ellis IO, Morgan DA, Martin SG (2011) Redox protein expression predicts radiotherapeutic response in early-stage invasive breast cancer patients. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 79 (5):1532-1540
- Wright DT, Cohn LA, Li H, Fischer B, Li CM, Adler KB (1994) Interactions of oxygen radicals with airway epithelium. *Environmental Health Perspectives* 102 (Suppl 10):85
- Xiao C, Sharp JA, Kawahara M, Davalos AR, Difilippantonio MJ, Hu Y, Li W, Cao L, Buetow K, Ried T (2007) The XIST Noncoding RNA Functions Independently of BRCA1 in X Inactivation. *Cell* 128 (5):977-989
- Yakovlev VA (2013) Nitric oxide-dependent downregulation of BRCA1 expression promotes genetic instability. *Cancer Research* 73(2):706-15
- Yu YP, Yu G, Tseng G, Cieply K, Nelson J, Defrances M, Zarnegar R, Michalopoulos G, Luo JH (2007) Glutathione peroxidase 3, deleted or methylated in prostate cancer, suppresses prostate cancer growth and metastasis. *Cancer Research* 67:8043-8050
- Zanón-Moreno V, Pons S, Gallego-Pinazo R, García-Medina J, Vinuesa I, Vila Bou V, Pinazo-Durán MD (2008) Involvement of nitric oxide and other molecules with redox potential in primary open angle glaucoma. *Arch Sociedad Española de Oftalmología* 83:365-372
- Zaremba T, Olinski R (2010) Oxidative DNA damage--analysis and clinical significance. *Postepy biochemstry* 56 (2):124-138
- Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of Biomolecular Screening* 4(2):67-73.
- Zhang HJ, Zhao W, Venkataraman S, Robbins ME, Buettner GR, Kregel KC, Oberley LW (2002) Activation of matrix metalloproteinase-2 by overexpression of manganese superoxide dismutase in human breast cancer MCF-7 cells involves reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry* 277 (23):20919-20926
- Zhang J-w, Rubio V, Zheng S, Shi Z-z (2009) Knockdown of OLA1, a regulator of oxidative stress response, inhibits motility and invasion of breast cancer cells. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 10 (11):796-804
- Zhang Z, Teruya K, Yoshida T, Eto H, Shirahata S (2013) Fucoidan extract enhances the anti-cancer activity of chemotherapeutic agents in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. *Marine Drugs* 11(1):81-98

- Zhou L, Wang Y, Tian D, Yang J, Yang Y (2012) Decreased levels of nitric oxide production and nitric oxide synthase-2 expression are associated with the development and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Molecular medicine reports* 6 (6):1261-1266
- Ziech D, Franco R, Georgakilas AG, Georgakila S, Malamou-Mitsi V, Schoneveld O, Pappa A, Panayiotidis MI (2010) The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chemico-Biological Interactions* 188 (2):334-339
- Zurita M, Lara PC, del Moral R, Torres B, Linares-Fernández JL, Arrabal SR, Martínez-Galán J, Oliver FJ, Ruiz de Almodóvar JM (2010) Hypermethylated 14-3-3-sigma and ESR1 gene promoters in serum as candidate biomarkers for the diagnosis and treatment efficacy of breast cancer metastasis. *BioMedCentral Cancer* 10:217

