

# L'estrès oxidatiu: implicacions en la biologia cel·lular del tumor i en la resposta a la quimioteràpia

Francisca Maria Santandreu Jaume



Universitat de les Illes Balears  
2010





**Universitat de les Illes Balears**

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

Grup d'Investigació en Metabolisme Energètic i Nutrició

**L'ESTRÈS OXIDATIU: IMPLICACIONS EN LA BIOLOGIA CEL·LULAR DEL  
TUMOR I EN LA RESPOSTA A LA QUIMIOTERÀPIA**

Tesi doctoral per optar al grau de

**Doctora per la Universitat de les Illes Balears**

Programa de Doctorat Interuniversitari de Nutrició Humana

Presentada per:

**Francisca Maria Santandreu Jaume**

Palma de Mallorca, Juny de 2010



Amb el vist-i-plau dels Directors

**Dra. Maria Pilar Roca Salom**

Catedràtica d'Universitat  
de l'àrea de Bioquímica i  
Biologia Molecular

**Dr. Jordi Oliver Oliver**

Professor Titular d'Universitat  
de l'àrea de Bioquímica i  
Biologia Molecular

La interessada

**Francisca Maria Santandreu Jaume**



**A la meva família**





*La clau de fèxit és el coneixement del valor de les coses*

**John Boyle O'Reilly**



## AGRAÏMENTS

En primer lloc, vull expressar la meva gratitud a la Dra. Pilar Roca per haver dipositat en mi la confiança per a dur a terme aquest projecte de tesi, sabent que en aquell moment inicial tan sols disposava de molta il·lusió i ganes d'esforçar-me per començar a treballar en el camp de la bioquímica i biologia molecular, una disciplina diferent a la meva formació i exercici professional. A la Dra. Pilar Roca i Dr. Jordi Oliver: vull agrair-vos la direcció d'aquest treball, la vostra paciència, ajuda, consells i empatia. Amb vosaltres he entès que un treball no és millor quan no queda res que afegir sinó quan no queda res que eliminar; la importància del recurs "temps" i el tenir com a millor "company de viatge" la curiositat, l'esperit crític i l'esforç constant.

A la resta de professors del Grup de Metabolisme Energètic i Nutrició els vull agrair els moments compartits al llarg dels tres anys que he passat dins el laboratori, les seves recomanacions, el bon tracte rebut, i també les experiències viscudes amb ells fora del laboratori.

A tots els que han sigut companys meus, els vull agrair la seva ajuda en el laboratori, les converses, el temps compartit i també la col·laboració en els treballs científics elaborats conjuntament. Vull agrair especialment l'oportunitat d'haver conegut l'equip humà que integrava el comitè de neurooncologia de l'Hospital Universitari Son Dureta, i a tots els metges i tècnics que van fer possible el poder disposar de mostres humanes en la primera etapa d'aquesta tesi doctoral. Igualment, voldria expressar la meva gratitud per l'ajuda tècnica rebuda de la Dra. Catalina Crespo en el maneig del citòmetre de flux, de Jordi Sastre en la microscòpia confocal i les orientacions del Dr. Pere Tauler en el maneig de l'HPLC.

Samuel: estic en deute amb tu per tota l'ajuda en les revisions dels treballs que he escrit, la teva meticulositat en corregir-los, i sobretot, pel fet d'haver estat sempre present quan t'he necessitat.

A les meves amigues Núria Cerrillo, Núria Garrit, Sandra, Eli, Marga, Maria... els vull agrair que sempre hagin estat allà per escoltar-me i recolzar-me en els meus petits fracassos i triomfs de laboratori. Pel vostre suport, les rialles, els viatges i les il·lusions compartides...sou responsables de molts somriures, que especialment he necessitat en els moments difícils.

A les meves companyes de treball del Col·legi Oficial de Farmacèutics de les Illes Balears, us agraeixo la vostra comprensió, en especial, en la recta final d'aquesta tesi. Aconseguí que en les hores que passo amb vosaltres se m'oblidin les preocupacions. Gràcies per l'ajuda diària, pels consells, per la vostra simpatia, i per fer-me sentir a gust i satisfeta d'exercir la meva professió i de seguir aprenent cada dia coses noves.

Vull agrair també tota aquella ajuda rebuda de persones que no he mencionat i que he tingut el plaer de conèixer al llarg d'aquests anys, perquè directa o indirectament, han fet possible que avui pugui estar escrivint aquestes línies. Especialment, vull donar les gràcies pel suport econòmic i humà rebut per part de la Conselleria d'Economia, Hisenda i Innovació.

Finalment, vull agrair el suport incondicional de la meva família, i molt especialment dels meus pares i germana, per ajudar-me i cuidar-me. No puc expressar en aquestes línies el que suposa tenir-vos al meu costat. Mil gràcies pels ànims, la vostra companyia, la vostra estimació i la vostra continua ajuda.

Francisca Maria Santandreu

## INDEX

ABREVIATURES

RESUM

LLISTAT DE PUBLICACIONS

### 1. INTRODUCCIÓ

#### 1.1. Estres oxidatiu

##### 1.1.1. Mecanismes de defensa enfront de l'estres oxidatiu

###### 1.1.1.1. Antioxidants enzimatics

###### 1.1.1.2. Antioxidants no enzimatics

##### 1.1.2. Estres oxidatiu i situacions fisiopatològiques

#### 1.2. Els mitocondris: un nexa d'unió entre el metabolisme, l'estat d'oxido-reducció i la mort cel·lular programada

##### 1.2.1. Funció i biogènesi mitocondrial

##### 1.2.2. El mitocondri: la principal font de ROS

##### 1.2.3. Control mitocondrial de l'apoptosi i espècies reactives d'oxigen

##### 1.2.4. Proteïnes desacoblants

###### 1.2.4.1. UCPs: possible paper en el control de la producció de ROS

###### 1.2.4.2. UCPs com a moduladors de la mort cel·lular programada

#### 1.3. Importància del metabolisme energètic en la biologia de la cel·lula tumoral

#### 1.4. Càncer i estres oxidatiu

##### 1.4.1. L'estres oxidatiu i la disfunció mitocondrial en la cel·lula cancerosa

##### 1.4.2. El complex paper de les ROS en la proliferació de la cel·lula tumoral

##### 1.4.3. Estres oxidatiu i resposta de la cel·lula cancerosa a la teràpia antitumoral

#### 1.5. Teràpia antitumoral

##### 1.5.1. La quimioteràpia

###### 1.5.1.1. Cisplatí

###### 1.5.1.2. Fluorouracil

##### 1.5.2. Resistència del tumor al tractament

##### 1.5.3. El concepte de la sensibilització

##### 1.5.4. Compostos d'origen natural amb propietats antitumorals

##### 1.5.5. El mitocondri: potencial diana de nous agents antitumorals

#### 1.6. Càncer colorectal

1.6.1. Epidemiologia i caracterfstiques moleculars en el cancer colorectal

1.6.2. Tractament del cancer colorectal

1.6.3. Pronostic dels pacients amb cancer colorectal

1.7. Tumors cerebrals

1.7.1. Epidemiologia, patologia i classificacio dels tumors cerebrals

1.7.2. Els gliomes

1.7.3. Els gliomes i la heterogeneTtat intratumoral

2. OBJECTIUS I PLANTEJAMENT EXPERIMENTAL

3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.1. Manuscrit I. Differences in mitochondrial function and antioxidant systems between regions of human glioma

3.2. Manuscrit II. Hydrogen peroxide regulates the mitochondrial content of uncoupling protein 5 in colon cancer cells

3.3. Manuscrit III. Improvement of mitochondrial energy and oxidative balance during intestinal differentiation

3.4. Manuscrit IV. Uncoupling protein-2 knockdown mediates the cytotoxic effects of cisplatin

3.5. Manuscrit V. Overcoming 5-fluorouracil resistance through downregulation of redox-sensitive survival signals

4. RECAPITULACIÓ

5. CONCLUSIONS

6. BIBLIOGRAFIA

7. ANNEX

7.1. Manuscrit VI. Metabolic differences in different regions of glioma samples

7.2. Manuscrit VII. Implications of oxidative stress and mitochondrial damage in the response of colon cancer cells to cisplatin

7.3. Manuscrit VIII. Resveratrol enhances 5-fluorouracil and cisplatin cytotoxicity in colon cancer cells.

7.4. Manuscrit IX. Sex-dependent differences in old rat brain mitochondrial function and oxidative stress.

7.5. Manuscrit X. The serum levels of 17 $\beta$ -estradiol, progesterone and triiodothyronine correlate with brown adipose tissue thermogenic parameters during aging.

## ABREVIATURES

Aijj <sub>m</sub>	potencial de membrana mitocondrial
ADN	àcid desoxiribonucleic
ADNmt	àcid desoxiribonucleic mitocondrial
ADP	adenosina difosfat
AKT	homòleg de l'oncogen viral de timoma murf v-akt
AP	fosfatasa alcalina
AP-1	proteïna activadora 1
ARN	àcid ribonucleic
ARNm	àcid ribonucleic missatger
ATP	adenosina trifosfat
ATPasa	adenosina trifosfat sintasa
Bax	proteïna X associada amb Bcl-2
Bcl-2	limfoma de cèl·lules B 2
BSO	L-butionin-(R,S)-sulfoximina
Ca <sup>2+</sup>	calci
CCR	càncer colorectal
COX	citocrom c oxidasa
CS	citrat sintasa
5-FU	5-fluorouracil
GDP	guanosina difosfat
GPx	glutatió peroxidasa
GRd	glutatió reductasa
GSH	glutatió reduït
GSSG	glutatió oxidat
Her-2	receptor del factor de creixement epidèrmic humà 2
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peròxid d'hidrogen
IL	interleucina
JNK	quinasa N-terminal de c-Jun
LDH	lactat deshidrogenasa
MPTP	porus de transició de la permeabilitat mitocondrial
MTT	bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli
NADPH	nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat
NF-κB	factor nuclear "potenciador de cadena lleugera kappa" de les cèl·lules B activades
P53	proteïna tumoral 53

PA	fosfatasa alcalina
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PI3K	fosfoinositol 3-quinasa
PKC	proteïna quinasa C
Prx	peroxiredoxina
ROS	espècies reactives d'oxigen
SAPK	proteïnes quinases activades per estrès
SOD	superòxid dismutasa
STAT3	transductor de senyal i activador de la transcripció 3
TBARS	substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric
TFAM	factor de transcripció mitocondrial A
UCP	proteïna desacoblant



# L'ESTRÈS OXIDATIU: IMPLICACIONS EN LA BIOLOGIA CEL·LULAR DEL TUMOR I EN LA RESPOSTA A LA QUIMIOTERÀPIA



Tesi doctoral. Francisca Maria Santandreu Jaume, Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears.

## Resum

L'objectiu general del present treball és aprofundir en la influència de l'equilibri redox en aspectes de la biologia tumoral com són el metabolisme oxidatiu i el creixement celular; a més a més, d'avaluar la importància de les espècies reactives d'oxigen (ROS) en l'eficàcia de la quimioteràpia i establir la rellevància de la intensitat de l'estrès oxidatiu en la superació de la quimioresistència a fàrmacs convencionals.

L'anàlisi de tumors sòlids humans va revelar que existeixen diferències intratumorals en la funció mitocondrial i estrès oxidatiu que mostren un patró de distribució regional. La disfunció en el metabolisme oxidatiu propi de les cèl·lules tumorals epitelials està acompanyada d'elevades concentracions endògenes de ROS i d'una elevada taxa de proliferació celular. Els nostres resultats mostren que la cèl·lula tumoral reacciona davant un estímul oxidant no citotòxic activant la resposta antioxidant de forma coordinada amb l'expressió de proteïnes desacoblants mitocondrials (UCPs). L'expressió i activitat de les proteïnes desacoblants es troba incrementada en les cèl·lules tumorals i les confereix protecció enfront de l'elevada generació de ROS endògena d'origen mitocondrial. L'acció citotòxica d'agents antitumorals com el cisplatí i 5-fluorouracil depèn de la capacitat per induir, de forma ràpida i intensa, estrès oxidatiu mitjançant mecanismes que inclouen la interacció amb els mitocondris de les cèl·lules tumorals i impliquen la reducció dels nivells de les proteïnes desacoblants.

En conclusió, l'estat redox celular, així com la resposta immediata al desequilibri oxidatiu generat, són factors determinants tant del creixement de la cèl·lula cancerosa com de l'eficàcia d'alguns agents antitumorals. Els moduladors redox que són capaços de potenciar l'acció pro-oxidant dels fàrmacs anticancerosos poden tenir un potencial benefici no només per controlar el creixement de les cèl·lules canceroses sinó per sensibilitzar-les novament a l'acció d'agents antitumorals clàssics.



## LLISTAT DE PUBLICACIONS

Aquesta tesi es fonamenta en les següents publicacions:

*Manuscrit I.*

**Santandreu, F.M.; Brell, M.; Gene, A.H.; Guevara, R.; Oliver, J.; Couce, M.E.; Roca, P.** Differences in mitochondrial function and antioxidant systems between regions of human glioma. *Cell Physiol Biochem* 2008; 22(5-6): 757-768.

DOI: 10.1159/000185559

*Manuscrit II.*

**Santandreu, F.M.; Valle, A.; Fernández de Mattos, S.; Roca, P.; Oliver, J.** Hydrogen peroxide regulates the mitochondrial content of uncoupling protein 5 in colon cancer cells. *Cell Physiol Biochem* 2009; 24(5-6): 379-390.

DOI: 10.1159/000257430

*Manuscrit III.*

**Santandreu, F.M.; Oliver, J.; Roca, P.** Improvement of mitochondrial energy and oxidative balance during intestinal differentiation. Manuscrit enviat a *Mitochondrion*.

*Manuscrit IV.*

**Santandreu, F.M.; Roca, P.; Oliver, J.** Uncoupling protein-2 knockdown mediates the cytotoxic effects of cisplatin. *Free Radic Biol Med* (acceptat 28 maig 2010).

*Manuscrit V.*

**Santandreu, F.M.; Oliver, J.; Roca, P.** Overcoming 5-fluorouracil resistance through downregulation of redox-sensitive survival signals. Manuscrit.

Durant la realització de la tesi, la doctoranda ha elaborat tres capítols de llibre relacionats amb el càncer i l'estrès oxidatiu, i ha col·laborat en la realització d'altres treballs relacionats amb el metabolisme energètic i l'estrès oxidatiu, que han donat lloc a les publicacions que es presenten en l'Annex:

*Manuscrit VI.*

**Santandreu, F.M.; Oliver, J.; Roca, P.** Metabolic differences in different regions of glioma samples. Manuscrit.

*Manuscrit VII.*

**Santandreu, F.M.; Oliver, J.; Roca, P.** Implications of oxidative stress and mitochondrial damage in the response of colon cancer cells to cisplatin. *Free Radicals*,

*Health and Lifestyle*. Monduzzi Editore International Proceedings Division. 115-120. 2009. ISBN 978 88 7587 515 2.

*Manuscrit VIII.*

**Santandreu, F.M.; Oliver, J.; Roca, P.** Resveratrol enhances 5-fluorouracil and cisplatin cytotoxicity in colon cancer cells. *Free Radicals, Health and Lifestyle*. Monduzzi Editore International Proceedings Division. 121-126. 2009. ISBN 978 88 7587 515 2.

*Manuscrit IX.*

**Guevara, R.; Santandreu, F.M.; Valle, A.; Gianotti, M.; Oliver, J.; Roca, P.** Sex-dependent differences in old rat brain mitochondrial function and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2009; 46(2): 169-175.

[DOI:10.1016/J.FREERADBIOMED.2008.09.035](https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2008.09.035)

*Manuscrit X.*

**Valle, A.; Santandreu F.M.; Garcia-Palmer, F.J.; Roca, P.; Oliver, J.** The serum levels of 17 $\beta$ -estradiol, progesterone and triiodothyronine correlate with brown adipose tissue thermogenic parameters during aging. *Cell Physiol Biochem* 2008; 22(1-4): 337-346.

DOI: 10.1159/000149812

## **1. Introducció**



# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. ESTRÈS OXIDATIU

En les cèl·lules l'ús d'oxigen en les reaccions metabòliques té el cost afegit de la generació col·lateral de radicals lliures. La producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) està ocasionada per una reducció incompleta de l'oxigen molecular, principalment, durant les reaccions redox de la cadena de transport electrònic mitocondrial (Harper et al., 2004). El terme genèric "ROS" comprèn totes les molècules parcialment reduïdes derivades de l'oxigen. Aquelles que a més contenen un o més electrons desaparellats en els seus orbitals es designen com a radicals lliures (Bergamini et al., 2004).

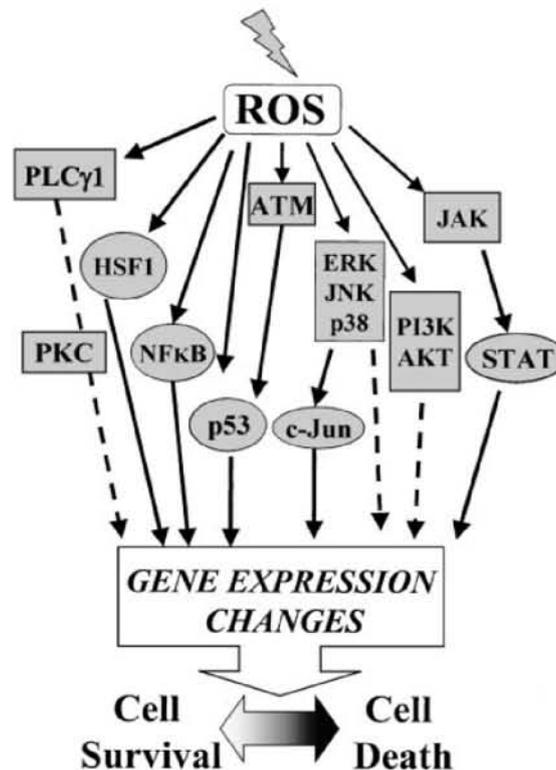
L'estrès oxidatiu té lloc en un teixit quan la concentració de ROS generada excedeix la capacitat antioxidant del mencionat teixit (Halliwell and Gutteridge, 1999). El desequilibri en l'homeòstasi redox cel·lular es manifesta en l'oxidació de biomolècules tals com els àcids nucleics, proteïnes i lípids (Demple and Harrison, 1994). La modificació oxidativa en l'estructura de les biomolècules pot provocar tant alteracions parcials com totals en la seva funció biològica.

Existeix evidència suficient per assegurar que les ROS no només actuen dins la cèl·lula ocasionant dany aleatori, com es pensava prèviament, sinó que els nivells de ROS fluctuen en resposta a senyals intracel·lulars i extracel·lulars (Poli et al., 2004), i a la vegada, estimulen de forma específica cascades de senyalització que regulen el creixement i la mort cel·lular (Scandalios, 2002). Així, el destí final de la cèl·lula dependrà de la interpretació de les senyals promotores de mort en contraposició a les de supervivència cel·lular (Tews, 1999) (**Figura 1**).

S'ha suggerit també que les ROS són necessàries per mantenir l'estat de quiescència pròpia de les cèl·lules que formen part de teixits completament diferenciats (Aw, 1999) i s'han descrit canvis en l'estat redox durant la diferenciació de certs tipus cel·lulars com les cèl·lules intestinals (Aw, 1999; Nkabyo et al., 2002) i els osteoblasts (Chen et al., 2008).

Per altra banda, s'ha descrit també una relació entre el metabolisme energètic i la producció de ROS. Elevats nivells de substrats metabòlics com els àcids grassos i la

glucosa poden induir un augment en el flux de metabòlits cap al mitocondri i l'alliberació de ROS al citoplasma (Nemoto et al., 2000; Nishikawa et al., 2000). Es creu que en aquest cas, les ROS podrien actuar com a sensors metabòlics per mitjà de processos de senyalització que facilitessin la comunicació entre mitocondri i citosol.



**Figura 1.** L'estrès oxidatiu activa les principals vies de senyalització cel·lular (Martindale and Holbrook, 2002).

### 1.1.1. Mecanismes de defensa enfront de l'estrès oxidatiu

Els éssers vius posseeixen un conjunt de sistemes fisiològics que s'encarreguen d'eliminar les ROS ocupant-se de mantenir l'estat d'equilibri que existeix entre oxidants i antioxidants (Heffner and Repine, 1989; Evans and Halliwell, 2001).

La gran diversitat en la semivida dels distints pro-oxidants, des de nanosegons en el cas del radical hidroxil fins a varis segons pels radicals peroxil o l'òxid nítric i peroxinitrit posa de manifest la gran varietat de sistemes de defensa necessaris per a contrarestar-los (Sies and Stahl, 1995). Per aquesta raó, s'han desenvolupat distintes línies de defensa biològica, que es podrien classificar en: prevenció, interceptació i reparació (Sies, 1993). Els sistemes de defensa enzimàtica són extremadament



efectius i selectius, però només són adequats per a espècies reactives de l'oxigen amb una semivida elevada. Dins de la interceptació trobem els antioxidants que actuen per un mecanisme de ruptura de cadena, on es pot situar la vitamina E, que reacciona principalment amb els radicals peroxil. L'oxigen singlet, de semivida curta, pot ser neutralitzat mitjançant extinció física (*quenching*), procés que porten a terme tant els carotenoides com els tocoferols (Sies and Stahl, 1995). Els sistemes de defensa antioxidant també es poden classificar en funció de la seva naturalesa catalítica en enzimàtics i no enzimàtics.

#### 1.1.1.1. Antioxidants enzimàtics

La funció dels antioxidants enzimàtics és prevenir la iniciació de les oxidacions en cadena, eliminant les espècies de l'oxigen parcialment reduïdes com són l'anió superòxid i el peròxid d'hidrogen (Winston, 1990). En aquest grup trobem 3 enzims fonamentals:

**Catalasa.** La catalasa és una hemoproteïna tetramèrica la funció de la qual és reduir el peròxid d'hidrogen per a formar oxigen molecular i aigua. Aquest enzim també té activitat peroxidasa (Nohl and Hegner, 1978).

**Superòxid dismutasa.** Són un grup d'enzims que catalitzen la dismutació del radical superòxid per a formar peròxid d'hidrogen (Weiss, 1986).

**Glutatid peroxidasa.** Complementa l'activitat de la catalasa com a sistema reductor del peròxid d'hidrogen. Aquest enzim clau del cicle del glutatió, actua també sobre grans molècules de peròxids lipídics i sobre productes derivats de les reaccions catalitzades per la lipooxigenasa.

#### 1.1.1.2. Antioxidants no enzimàtics

Els sistemes antioxidants no enzimàtics més importants estan constituïts principalment per vitamines i micronutrients (Sies and Stahl, 1995). Aquests mecanismes no enzimàtics han d'estar presents en tots els compartiments cel·lulars i per això, alguns antioxidants són hidrosolubles, tals com la vitamina C o el glutatió, i altres són liposolubles, tals com els betacarotens o la vitamina E.

**Vitamina C.** La vitamina C o àcid L-ascòrbic és hidrosoluble, i sota la majoria de condicions fisiològiques es troba en la seva forma desprotonada. Se'l considera un antioxidant molt important en fluids extracel·lulars (Stocker et al., 1991). Actua eficientment atrapant els radicals peroxil en fase aquosa, abans de que aquests puguin

iniciar la peroxidació lipídica; d'aquesta manera, l'àcid ascòrbic pot protegir les membranes del dany peroxidatiu. A més, la vitamina C pot portar a terme aquesta protecció enfront de la peroxidació augmentant l'activitat de l'alfa-tocoferol (Sies and Stahl, 1995).

**Glutatió.** El glutatió és un tripèptid: gamma-glutamil-cisteïna-glicina. Es tracta del tiol no proteic més abundant en la cèl·lula i juga un paper central en la defensa antioxidant. La molècula de glutatió pot trobar-se en dos estats d'oxidació diferents: en forma reduïda, com a tiol (GSH) i en forma oxidada, composta per dues molècules unides per un pont disulfur (GSSG). Les cèl·lules posseeixen tres reservoris principals pel glutatió. Quasi el 90% del GSH cel·lular està en el citosol, el 10% en el mitocondri i un petit percentatge en el reticle endoplasmàtic (Meredith and Reed, 1982; Hwang et al., 1992).

El GSH té diverses funcions vitals incloses la detoxificació d'electròfils, el manteniment dels nivells essencials de tiols de les proteïnes, la participació en els processos de captura de radicals lliures i és un modulador de processos cel·lulars crítics com són la síntesi d'ADN, els processos relacionats amb els microtúbuls, i la funció immune (Ketterer et al., 1983; Lu, 1999). En relació a la seva funció antioxidant, el GSH, en presència d'un glutatió peroxidasa seleni-dependent, redueix els peròxids produïts de manera endògena. Com a resultat, el GSH s'oxida a GSSG, que es novament reduït a GSH per la glutatió reductasa, a expenses del NADPH, formant així un cicle redox.

### **1.1.2. Estrès oxidatiu i situacions fisiopatològiques**

Les ROS han sigut implicades com a importants mediadors fisiopatològics en un gran nombre de trastorns clínics (Cross et al., 1987; van Haaften et al., 2003). Un dels processos fisiopatològics més importants en el que s'han implicat les ROS, és l'envelliment. Aquest és un procés multifactorial per al qual s'han proposat nombroses teories, i entre elles, la teoria dels radicals lliures és una de les més consolidades. S'ha postulat també la teoria mitocondrial de l'envelliment cel·lular (Miquel et al., 1980), la qual destaca la rellevància dels mitocondris i especialment de l'ADN mitocondrial (ADNmt) com a principal diana del dany oxidatiu associat a l'envelliment (de la Asuncion et al., 1996).

Entre les malalties humanes associades a l'estrès oxidatiu i disfunció mitocondrial es troben: a) malaltia cardiovascular: aterosclerosi i fallida cardíaca; b)

malaltia hepàtica: hemocromatosi, esteatohepatitis no alcohòlica i hepatitis alcohòlica; c) diabetis mellitus; d) dany per isquèmia-reperfusió; e) malalties neurodegeneratives: malaltia d'Alzheimer; esclerosi lateral amiotròfica; malaltia de Parkinson; malaltia de Huntington i atàxia de Friedreich; f) càncer: colorectal; gàstric; de mama; paragangliomes hereditaris; feocromocitomes; leiomiomes de la pell i uterins (Fariss et al., 2005; Van Houten et al., 2006).

En molts casos, el dany oxidatiu és més una conseqüència del dany tissular que produeix la malaltia que una causa de la mateixa, i a la vegada, aquest dany oxidatiu pot contribuir a empitjorar el dany tissular generat (Halliwell and Gutteridge, 1984). En moltes patologies, és evident la implicació de les ROS d'origen mitocondrial, mentre que en altres la implicació mitocondrial no és tan clara.

## **1.2. ELS MITOCONDRIIS: UN NEXE D'UNIÓ ENTRE EL METABOLISME, L'ESTAT D'OXIDO-REDUCCIÓ I LA MORT CEL·LULAR PROGRAMADA**

### **1.2.1. Funció i biogènesi mitocondrial**

Els mitocondris participen en una àmplia varietat de funcions essencials per la cèl·lula (Nisoli et al., 2004), incloses la generació d'ATP a través de la fosforilació oxidativa; la biosíntesi del grup hemo, de pirimidines i d'esteroides; l'homeòstasi del ferro i del calci; i la regulació de la supervivència cel·lular, mitjançant els processos d'apoptosi o necrosi.

Encara que l'organització de l'estructura interna dels mitocondris està àmpliament conservada, la seva forma externa és molt variable, de manera que exhibeixen una sorprenent plasticitat de forma i distribució (Clementi and Nisoli, 2005). Existeixen diferències morfològiques en funció de l'espècie, del tipus de teixit i cèl·lula, del grau d'activitat metabòlica i de l'estat fisiològic i patològic (Duchen, 2004). La població mitocondrial és dinàmica i mostra variacions en tamany i nombre durant les diverses etapes del desenvolupament, la diferenciació cel·lular i en resposta a diverses situacions fisiològiques i patològiques (Goffart and Wiesner, 2003). A més, s'han descrit fenòmens de fusió entre els mitocondris (Yaffe, 1999), posant de manifest la naturalesa dinàmica de la xarxa mitocondrial, la qual podria participar en la transducció de senyals (Soubannier and McBride, 2009) i fins i tot estar involucrada en restaurar o mantenir localment la funció mitocondrial (Karbowski and Youle, 2003). La quantitat de mitocondris amb freqüència és característica dels tipus cel·lulars específics i a més,

l'abundància mitocondrial podria estar regulada per senyals d'estrès oxidatiu (Lee and Wei, 2005).

La biogènesi mitocondrial engloba dos fenòmens distints però íntimament lligats: la proliferació, que consisteix en l'augment del nombre de mitocondris per cèl·lula, i la diferenciació, mitjançant la qual l'òrganul adquireix les característiques estructurals i funcionals adequades per a les funcions específiques de cada tipus cel·lular de l'organisme (Nisoli et al., 2004).

En el control de la biogènesi mitocondrial participen nombrosos factors, com la regulació de l'expressió i la replicació del genoma mitocondrial, l'expressió i el transport al mitocondri de diverses proteïnes codificades per gens nuclears, i la coordinació de tots aquests processos. La transcripció del genoma mitocondrial està sotmesa a una fina regulació i la seva expressió està coordinada amb la de proteïnes mitocondrials codificades en el nucli (Attardi and Schatz, 1988; Neupert, 1997). La iniciació de la transcripció requereix de l'activitat d'almenys una ARN polimerasa específica de l'òrganul (Tiranti et al., 1997), el factor de transcripció mitocondrial A (TFAM) (Fisher and Clayton, 1988) i els factors de transcripció mitocondrials B1 i B2 (Fernandez-Silva et al., 2003). El TFAM forma part de la família de proteïnes d'alta mobilitat i té capacitat d'unir-se a l'ADNmt, pot discriminar entre seqüències específiques i no específiques, de manera que es modifica la seva estructura tridimensional, facilitant així la unió de l'ARN polimerasa al punt d'iniciació de la transcripció (Parisi and Clayton, 1991; Fisher et al., 1992; Shadel and Clayton, 1997). A més de la seva potencial participació en la regulació de la transcripció, també s'ha relacionat el TFAM amb el manteniment de l'estructura, el grau d'empaquetament i el control del nombre de còpies d'ADNmt en el mitocondri (Larsson et al., 1998; Takamatsu et al., 2002; Kanki et al., 2004), a més d'una possible connexió amb els processos d'apoptosi (Yoshida et al., 2003). Diversos estudis han demostrat que el PGC-1 $\alpha$  (coactivador 1 alfa del receptor activat per proliferadors peroxisomals gamma) podria tenir un paper central en la regulació de la biogènesi mitocondrial en nombroses situacions fisiològiques, per la seva capacitat de coactivar l'activitat transcripcional d'altres proteïnes, entre elles el TFAM (Wu et al., 1999).

### **1.2.2. El mitocondri: la principal font de ROS**

Les ROS poden generar-se en la cèl·lula, a través de processos enzimàtics i no enzimàtics. Qualsevol proteïna o sistema enzimàtic amb la capacitat de transferir

electrons pot generar ROS com a subproductes de la reacció de transferència electrònica. Aquest és el cas del citocrom p450 (en el reticle endoplasmàtic), els peroxisomes, la xantina oxidasa o la NADPH oxidasa. No obstant, la principal font de ROS en cèl·lules no fagocítiques és el mitocondri.

Dades quantitatives, obtingudes de mitocondris aïllats, suggereixen que entorn al 2% del consum d'oxigen es degut a la producció de l'anió superòxid ( $O_2^{\cdot-}$ ), i el 80% del mateix es genera en el mitocondri a nivell de la cadena respiratòria. L'oxigen molecular actua com a acceptor final dels electrons en la citocrom oxidasa (complex IV), que catalitza l'oxidació de l'oxigen a aigua. Tot i això, en condicions fisiològiques, la reducció incompleta de l'oxigen pot donar-se en els diferents complexos, en el moment que catalitzen transferències d'un o dos electrons, amb la consegüent generació de ROS. De tots els complexos respiratoris, el complex I i III són els màxims productors de ROS (Chance et al., 1979). La generació de ROS per part del mitocondri depèn exponencialment del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ). Així, aquells factors que disminueixen el  $\Delta\psi_m$ , com els desacoblants químics (Okuda et al., 1992) o les UCPs pareixen tenir la capacitat de disminuir la producció mitocondrial de ROS (Negre-Salvayre et al., 1997; Arsenijevic et al., 2000; Vidal-Puig et al., 2000).

### **1.2.3. Control mitocondrial de l'apoptosi i espècies reactives d'oxigen**

La mort cel·lular és un procés més dels que tenen lloc a l'organisme, i pot donar-se tant per necrosi com per apoptosi. Mentre que els dos tipus de mort cel·lular suposen nombrosos efectes destructius sobre la cèl·lula i poden estar associats a situacions patològiques, l'apoptosi és també necessària per a garantir el correcte desenvolupament i homeòstasi tissular. L'apoptosi consisteix en un procés actiu d'autodestrucció que depèn de la disponibilitat d'ATP i pot desencadenar-se en resposta a estímuls de diferent naturalesa i procedents de l'exterior o del propi interior cel·lular.

La susceptibilitat de les cèl·lules a morir per apoptosi o necrosi està fortament influenciada pel grau d'estrès oxidatiu. Augments en la producció de ROS estan associats tant a fases inicials com tardanes del procés apoptòtic, produint-se freqüentment com a conseqüència indirecta d'altres canvis que tenen lloc durant el procés. Així, s'ha observat com els antioxidants són capaços de frenar el programa de mort cel·lular en diferents sistemes cel·lulars (Fiordaliso et al., 2004; McCarthy et al.,



A més de la seva coneguda activitat bioenergètica, el mitocondri és rellevant en l'homeòstasi del calci ( $\text{Ca}^{2+}$ ). El  $\text{Ca}^{2+}$  a la vegada, juga un important paper en la relació de les ROS amb l'apoptosi depenent de senyalització mitocondrial. El  $\text{Ca}^{2+}$  intramitocondrial promou la producció de ROS (Kanno et al., 2004), que a la vegada podrien estar implicades en l'obertura del porus de transició de la permeabilitat mitocondrial (MPTP) induïda per  $\text{Ca}^{2+}$  (Zhao et al., 2004). Un mecanisme proposat per explicar l'obertura del MPTP està relacionat amb l'oxidació de la cardiolipina. La cardiolipina és un fosfolípid localitzat en la membrana mitocondrial interna que manté el citocrom c associat a la cara externa d'aquesta membrana durant la respiració. Una producció elevada de ROS podria causar un dany oxidatiu sobre la cardiolipina, amb les conseqüents alteracions en la solubilitat de la membrana, l'obertura del MPTP i la posterior alliberació del citocrom c (Petrosillo et al., 2004). Per altra banda, caldria destacar que el manteniment de la integritat de la membrana mitocondrial és un procés dinàmic i un estrès oxidatiu intens pot comportar l'obertura del MPTP. Agents pro-oxidants que actuen directament sobre components del MPTP, sobre membres de la família Bcl-2, o mitjançant la peroxidació de proteïnes o lípids, poden induir la permeabilització de la membrana mitocondrial externa. La permeabilització condueix a l'inflament o *swelling* mitocondrial i a l'alliberació de factors pro-apoptòtics (Le Bras et al., 2005). A més, les ROS derivades de la pròpia transició en la permeabilitat mitocondrial poden influir en esdeveniments apoptòtics posteriors (Sato et al., 2004).

Les espècies reactives d'oxigen estan també involucrades en la modulació de l'apoptosi que exerceixen els membres de la família Bcl-2. De fet, les ROS regulen la fosforilació i ubiquitinització de proteïnes de la família Bcl-2, resultant en nivells augmentats de proteïnes pro-apoptòtiques (Li et al., 2004). A més, Bcl-2 pot actuar com a agent antioxidant bloquejant esdeveniments dependents de ROS en la cascada de senyalització apoptòtica ja sigui afectant a la producció de ROS (Kane et al., 1993; Gottlieb et al., 2000) o prevenint el dany oxidatiu dels constituents cel·lulars mitjançant la inducció d'antioxidants cel·lulars endògens (Hockenbery et al., 1993; Kowaltowski and Fiskum, 2005).

Finalment, les ROS poden promoure l'apoptosi de forma independent mitjançant la seva interacció amb macromolècules biològiques (lípids, proteïnes, àcids nucleics i carbohidrats). Les interaccions de les ROS amb aquestes molècules genera radicals secundaris nous, iniciant una cadena continua de reaccions que pot conduir a

la peroxidació lipídica, al dany de l'ADN, a la inhibició del creixement o a la mort cel·lular (Robertson et al., 2003).

#### 1.2.4. Proteïnes desacoblants

Les proteïnes desacoblants mitocondrials (UCPs) pertanyen a la superfamília de transportadors aniònics localitzats a la membrana mitocondrial interna. La proteïna desacoblant UCP1 o termogenina fou la primera en ser identificada. Aquesta proteïna s'expressa abundantment en el teixit adipós marró on juga un important paper en la termogènesi adaptativa. En la resposta fisiològica al fred, el sistema nerviós simpàtic activa la via adrenèrgica que promou la lipòlisi en el teixit adipós marró; els àcids grassos alliberats durant la lipòlisi són responsables de l'activació del transport de protons a través de la UCP1 (Nicholls and Locke, 1984). D'aquesta manera, la proteïna UCP1 desacobla la respiració de la fosforilació oxidativa dissipant el gradient de protons amb la consegüent generació de calor (Nicholls and Locke, 1984).

Les anàlisis d'homologia de seqüència van permetre identificar noves proteïnes de la família. Entre elles es troben UCP2, UCP3, UCP4 i UCP5 que comparteixen amb UCP1 un 59%, un 57%, un 29% i un 34% d'identitat en la seqüència d'aminoàcids, respectivament. Aquestes noves UCPs tenen un patró d'expressió diferencial. Mentre que UCP2 s'expressa de forma ubíqua, UCP3 ho fa preferencialment en el múscul esquelètic i les isoformes UCP4 i UCP5 primordialment en cervell i teixit neuronal (Sanchis et al., 1998; Yu et al., 2000; Rousset et al., 2004). Pareix ésser que la resta d'isoformes comparteix certes propietats bioquímiques amb la UCP1, és a dir, intervindrien en el transport de H<sup>+</sup> produint un desacoblament entre la respiració i fosforilació oxidativa, i serien regulades potencialment per àcids grassos i nucleòtids de purina.

Així com la funció *in vivo* de la UCP1 està clarament lligada a la termogènesi adaptativa, el paper fisiològic de la resta d'UCPs es fruit de controvèrsia. S'han proposat nombroses possibilitats però en la literatura recent existeixen dades contradictòries en relació al significat biològic que tindria el desacoblament efectuat per aquestes noves UCPs. Encara que la seva capacitat de transport de protons s'ha comprovat *in vitro*, les característiques concretes de la seva activitat bioquímica estan essent encara debatudes. Entre les hipòtesis per explicar quin seria el seu paper en el

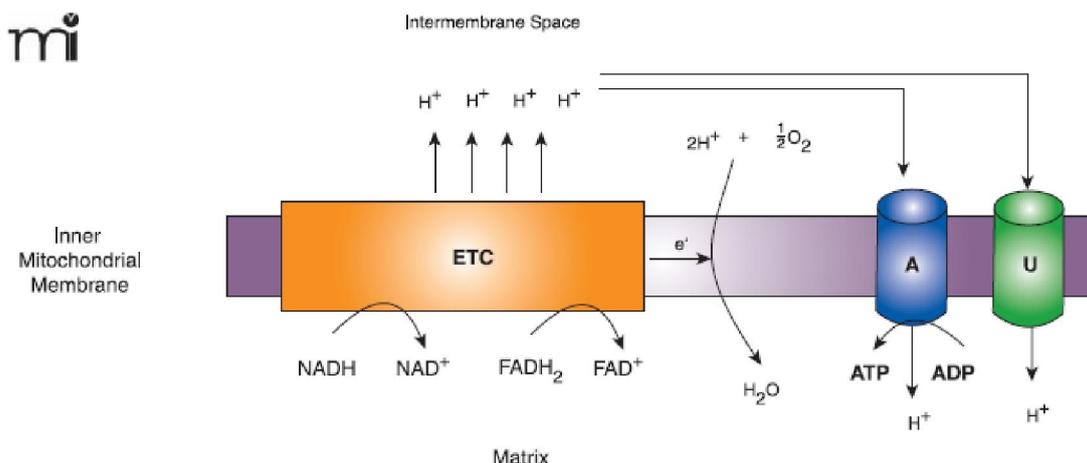


mitochondri, s'han descrit la regulació del metabolisme de la glucosa (Huppertz et al., 2001), el control de les ROS i la regulació de la mort cel·lular programada.

#### 1.2.4.1. UCPs: possible paper en el control de la producció de ROS

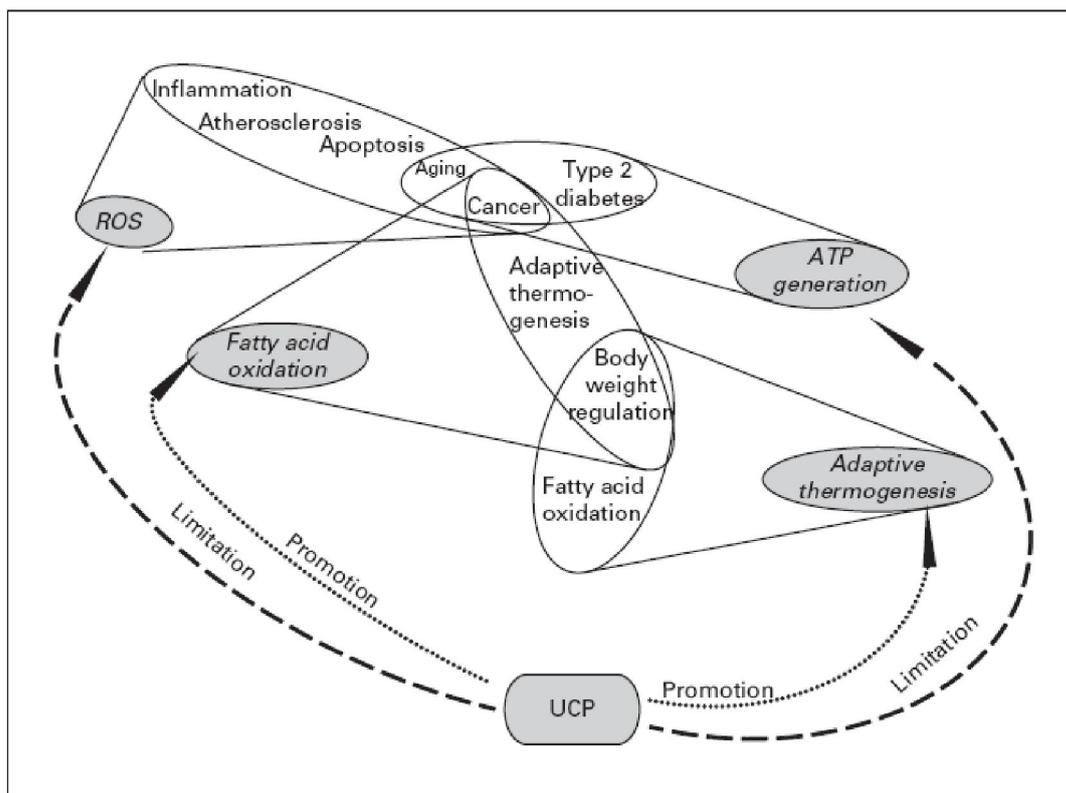
El potencial de membrana mitocondrial, pot condicionar la taxa de producció de ROS a nivell de la cadena respiratòria (Papa and Skulachev, 1997). Elevats potencials de membrana, contribueixen a l'alentiment de la cadena respiratòria (condicions corresponents a un estat 4), i amb això a l'alentiment en la recirculació de quinones reduïdes, que afavoreix la formació de superòxid. La formació de ROS disminueix quan l'activitat de la cadena respiratòria s'accelera, per exemple en condicions d'un augment de la demanda d'ATP (estat 3) (Votyakova and Reynolds, 2001). Per això, es va proposar que les cèl·lules aeròbiques haurien desenvolupat un sistema contra la toxicitat que pot suposar una acumulació de ROS, basat en un augment de la conductància dels protons ( $H^+$ ) a través de la membrana mitocondrial interna, que provocaria un desacoblament suau (*mild uncoupling*) entre respiració i fosforilació oxidativa (Papa and Skulachev, 1997; Skulachev, 1998; Kim-Han et al., 2001).

Així, una de les funcions proposades per a les UCPs és la d'induir un desacoblament suau entre respiració i fosforilació oxidativa, impedit que el potencial de membrana mitocondrial s'elevi per sobre d'un llindar crític per a la formació de ROS (Figura 3).



**Figura 3.** Representació esquemàtica de la cadena de transport electrònic i el desacoblament de la fosforilació oxidativa (Fariss et al., 2005). ETC, cadena de transport electrònic; A, ATP sintetasa; U, proteïna desacoblant.

Nègre-Salvayre i col. demostraren que la inhibició de l'UCP2 per GDP estimulava la producció de  $H_2O_2$  (Negre-Salvayre et al., 1997) en mitocondris aïllats. Els treballs amb ratolins deficientes per a l'expressió d'UCP2 mostren una major producció de ROS en macròfags, el que confereix a les cèl·lules resistència a infeccions parasitàries (Arsenijevic et al., 2000). L'efecte de l'UCP2 sobre la producció de ROS s'ha pogut observar també en cèl·lules endotelials d'origen murf, on oligonucleòtids antisentit contra l'ARNm de l'UCP2, provoquen un augment en la producció de ROS (Duval et al., 2002). A més, s'han publicat diversos estudis en els que es demostra una inducció de l'expressió d'UCP2 amb l'estrès oxidatiu (Lee et al., 1999; Pecqueur et al., 2001). Així, existeixen nombroses dades que relacionen l'activitat d'UCP2 amb la producció de ROS, i aquesta relació pareix ser rellevant en diversos processos patològics (**Figura 4**) com la diabetis (Sasahara et al., 2004), obesitat (Amuthan et al., 2001), malalties neurodegeneratives (Yamada et al., 2003) i càncer (Samudio et al., 2009).



**Figura 4.** Funcions fisiològiques proposades per les UCPs i la seva possible intervenció en condicions patològiques (Nubel and Ricquier, 2006).

Recentment, el grup de Brand va descriure que l'anió superòxid era capaç d'estimular el desacoblament efectuat per UCPs (Echtay et al., 2002; Echtay et al., 2005), el que suggereix un mecanisme de *feed-back* o retroalimentació negativa en el que les pròpies ROS exercirien de sensors d'un excés de formació de ROS, activant una proteïna que ha de limitar la seva producció.

#### **1.2.4.2. UCPs com a moduladors de la mort cel·lular programada**

Donada la localització i propietats bioquímiques de les UCPs, existeixen diversos motius que suggereixen una implicació d'aquestes proteïnes en el control de l'apoptosi. L'apoptosi és un procés complex en el que participen múltiples factors com el potencial de membrana mitocondrial, les ROS i la relació ATP/ADP, que podrien tenir relació directa amb l'activitat de la proteïna. Les ROS poden afectar al procés d'apoptosi en diferents punts, i de fet, la seva relació amb aquest procés és molt complexa. Sovint, les investigacions que suggereixen la relació d'alguna UCP amb el control de la mort cel·lular passen per la limitació de la producció mitocondrial de ROS (Mattiasson et al., 2003; Teshima et al., 2003; de Bilbao et al., 2004; Mattiasson and Sullivan, 2006).

És important considerar també que l'expressió d'UCPs incrementa en presència de senyals d'estrès metabòlic com la caquèxia cancerosa (Bing et al., 2000) o la sèpsia (Sun et al., 2003). La proteïna UCP2 fou el primer membre de la família de les UCPs relacionat amb la regulació de l'apoptosi. Diverses investigacions suggereixen un paper protector de l'UCP2 enfront de la mort cel·lular induïda per diferents tipus d'estrès (Mattiasson et al., 2003; Teshima et al., 2003). Per altra banda, les observacions realitzades sobre el teixit o cèl·lules neuronals estan també a favor d'un paper protector de les UCPs enfront de la mort cel·lular (Diano et al., 2003; Mattiasson and Sullivan, 2006). Així, en el teixit neuronal, l'expressió d'UCP3 protegeix contra l'apoptosi induïda per un excés de glucosa en cèl·lules de neuroblastoma (Leininger et al., 2004) i neurones ganglionars (Vincent et al., 2004).

No està clar si la inducció d'UCPs intervé en l'origen de la patologia, o si forma part dels mecanismes que es desencadenen per a contrarestar els estímuls que inicien el procés. Donada la disparitat de resultats, és probable que la funció de les diferents isoformes respecte a la regulació de l'apoptosi, sigui dependent del tipus cel·lular i de l'estímul o estrès concret.

### 1.3. IMPORTANCIA DEL METABOLISME ENERGÈTIC EN LA BIOLOGIA DE LA CÈL·LULA TUMORAL

Els tumors segueixen les mateixes rutes metabòliques bàsiques que els teixits normals, però canvis en el microambient tumoral i en les pròpies cèl·lules tumorals poden tenir profunds efectes sobre el seu metabolisme. Dos factors interrelacionats influeixen de manera crucial en el metabolisme dels tumors: la disponibilitat d'oxigen i l'alteració en les rutes metabòliques (Gallego et al., 2008).

La hipòxia és una condició comú en els tumors que determina la forma en que es produeix l'energia. La hipòxia en el tumor fa que el substrat preferit sigui la glucosa ja que el metabolisme de la resta de substrats energètics (els àcids grassos, els cossos cetònics, els aminoàcids com la glutamina, els carbohidrats i el lactat (Bouzier et al., 1998)) és dependent d'oxigen. Contràriament al que passa en el teixit normal, en la majoria de tumors sòlids la presència d'oxigen no inhibeix la glicòlisi (efecte Warburg). És més, en presència d'oxigen, les cèl·lules tumorals sovint prefereixen metabolitzar l'excés de glucosa per la via glicolítica, i això comporta la disminució de la respiració tumoral (efecte Crabtree). En les cèl·lules tumorals, les alteracions metabòliques com la potenciació de la glicòlisi, la inhibició del cicle dels àcids tricarboxílics (TCA) i la producció augmentada de lactat ocasionarien una pèrdua neta de carboni que podria utilitzar-se en les reaccions anabòliques, situació que és compensada per la cèl·lula cancerosa incrementant molt el consum de glucosa respecte a la cèl·lula normal.

Les alteracions metabòliques en el tumor estan promogudes també per l'activació d'oncogens i la pèrdua de supressors tumorals. Varis oncogens s'han implicat en l'efecte Warburg o glicòlisi aeròbia tumoral (Flier et al., 1987; Osthus et al., 2000), entre ells l'oncogen *AKT*, que augmenta la captació i utilització de glucosa (Elstrom et al., 2004) i *PI3K*, que inhibeix la beta-oxidació (Gallego et al., 2008). Els majors esdeveniments oncogènics - com són l'activació constitutiva de vies sensibles a factors de creixement, l'activació constitutiva del factor induïble per hipòxia-1, i la inactivació de p53 - podrien constituir la causa comuna de la reprogramació metabòlica i dels trets determinants del càncer tals com el creixement autònom, la resistència a l'apoptosi, replicació illimitada, i angiogènesi (Gallego et al., 2008).

Ja sigui pel microambient tumoral o per l'activació d'oncogens, la reprogramació metabòlica en la cèl·lula cancerosa li confereix avantatges proliferatius i adaptatius per la seva supervivència. Així, les alteracions metabòliques aporten substrats per les vies biosintètiques, influeixen en la regulació de l'apoptosi i retroalimenten vies de senyalització implicades en el procés pro-oncogènic (Gallego et al., 2008; Hsu and Sabatini, 2008).

#### **1.4. CANCER I ESTRÈS OXIDATIU**

##### **1.4.1. L'estrès oxidatiu i la disfunció mitocondrial en la cèl·lula cancerosa**

Les cèl·lules canceroses a més de caracteritzar-se per la seva habilitat de suportar tant alteracions metabòliques com un estat crònic d'hipòxia, també ho fan per la seva resistència a l'estrès oxidatiu (Dang and Semenza, 1999). Les ROS no només participen en l'etiologia del càncer, sinó que constitueixen un mecanisme de transducció de senyals intracel·lulars en resposta a determinats estímuls (Benhar et al., 2002). És més, les senyals de supervivència i proliferació associades amb la promoció tumoral pareixen necessitar de les ROS per la seva transmissió eficient al nucli (Hadziahmetovic et al., 2008). Per altra banda, les ROS que difonen des de les cèl·lules canceroses també poden promoure la progressió tumoral i la disseminació del càncer i es troben involucrades en el procés inflamatori que acompanya a la neoplàsia (Arias et al., 2007).

Moltes proteïnes i rutes de senyalització estan afectades per canvis redox (Chiba et al., 1996; Chau et al., 1998; Hampton et al., 1998; Pineda-Molina et al., 2001; D'Alessio et al., 2004). Entre elles es troben cascades de senyalització que juguen un paper crucial en la regulació gènica i prevenció de l'apoptosi com les vies Ras/Raf/MEK/ERK i PTEN/PI3K/AKT/mTOR/NF-kappaB, components de les quals es troben mutats o aberrantment expressats en els tumors humans.

Els mitocondris estan involucrats directa i indirectament en molts aspectes de les alteracions metabòliques observades en les cèl·lules tumorals. En els mitocondris de cèl·lules tumorals s'han descrit alteracions funcionals i ultraestructurals importants (Oudard et al., 1997; Cuezva et al., 2002) que podrien estar relacionades amb la dependència que mostren les cèl·lules canceroses per la glucosa, i podrien contribuir també a l'adquisició d'un major grau de malignitat (Amuthan et al., 2001). En les

cèl·lules tumorals s'han descrit canvis en la mida, forma i nombre de mitocondris respecte a les cèl·lules normals. L'anàlisi de la composició lipídica de la membrana interna també ha revelat diferències entre les cèl·lules tumorals i les cèl·lules normals (Feo et al., 1975). S'ha observat que els tumors altament proliferatius tenen una menor taxa respiratòria, que estaria d'acord amb un menor nombre i tamany dels seus mitocondris en comparació amb els teixits normals (Pedersen, 1978).

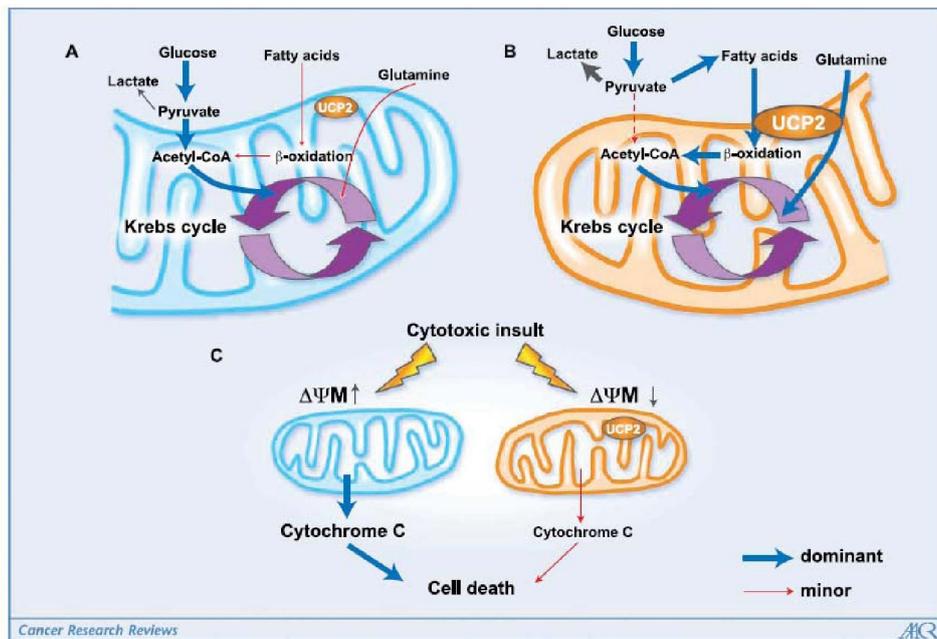
Els nivells i activitat dels enzims involucrats en la fosforilació oxidativa tals com la citocrom c oxidasa (COX) i l'ATP sintasa també s'han trobat disminuïts en diferents tipus de tumors humans en comparació al teixit sa (Sun et al., 1981; Capuano et al., 1996; Capuano et al., 1997; Cuezva et al., 2002; Isidoro et al., 2004; Isidoro et al., 2005). A més, s'ha descrit que el potencial de membrana mitocondrial és més elevat en les cèl·lules tumorals que en les cèl·lules epitelials no transformades (Modica-Napolitano and Aprille, 1987).

Per altra banda, s'ha descrit que la proteïna UCP2 es troba sobreexpressada en tumors colorectals humans (Horimoto et al., 2004). La sobreexpressió de la proteïna mitocondrial UCP2 podria conferir citoprotecció a les cèl·lules tumorals (Derdak et al., 2008) i s'ha suggerit que estaria implicada en la promoció d'un canvi des del metabolisme oxidatiu cap a un metabolisme glicolític (Harper et al., 2002; Samudio et al., 2009) (**Figura 5**). En el mateix sentit, s'ha descrit que la disminució dels nivells de proteïna UCP5 en cèl·lules tumorals humanes de neuroblastoma facilitaria la mort cel·lular associada a estrès oxidatiu (Ho et al., 2006).

En comparació a les cèl·lules normals, les cèl·lules tumorals tenen suprimits els mecanismes involucrats en la permeabilització de la membrana externa mitocondrial. Així, les cèl·lules tumorals tenen majors nivells de la proteïna antiapoptòtica Bcl-2, prevenint la permeabilització per factors pro-apoptòtics com la proteïna Bax. A més a més, els mitocondris de les cèl·lules tumorals també presenten més resistència a l'entrada de calci mitocondrial, necessària per a la permeabilització.

La majoria de tumors humans presenten mutacions a l'ADNmt. Tot i que aquestes mutacions poden sorgir com a resultat de la progressió del tumor, algunes podrien participar activament en la progressió tumoral per mitjà de l'estimulació cooperativa de la producció de ROS, la glicòlisi aeròbia i el creixement del tumor (Yu et al., 2008). Les disfuncions mitocondrials primàries tenen una repercussió directa sobre

el metabolisme i la proliferació tumoral, d'aquesta manera s'ha descrit que les alteracions genètiques en l'enzim fumarat hidratasa (proteïna present a la matriu mitocondrial) i en l'enzim succinat deshidrogenasa (proteïna de la membrana interna mitocondrial) podrien tenir una implicació causal en el desenvolupament tumoral (Rustin, 2002).



**Figura 5.** Possibles implicacions de la proteïna UCP2 en el control del metabolisme i la mort cel·lular de la cèl·lula cancerosa (Samudio et al., 2009).

#### 1.4.2. El complex paper de les ROS en la proliferació de la cèl·lula tumoral

Es sap que la producció de ROS es troba incrementada en les cèl·lules canceroses (Szatrowski and Nathan, 1991). Durant l'evolució del grau de malignitat del tumor, s'ha vist que canvia el patró de les ROS i dels mecanismes de transducció de senyals sensibles a estrès oxidatiu (Dolado et al., 2007; Galli et al., 2008). Una de les funcions de mantenir elevats els nivells de ROS durant la progressió tumoral pareix ésser l'activació persistent de factors de transcripció com NF- $\kappa$ B i AP-1 (Gupta et al., 1999). A més, la inestabilitat genòmica induïda per estrès oxidatiu podria contribuir a la progressió del càncer (Jackson and Loeb, 2001).

En contrast amb el paper de les ROS en la inducció del creixement cel·lular en absència d'estrès, les ROS pareixen activar i modular l'apoptosi quan les cèl·lules

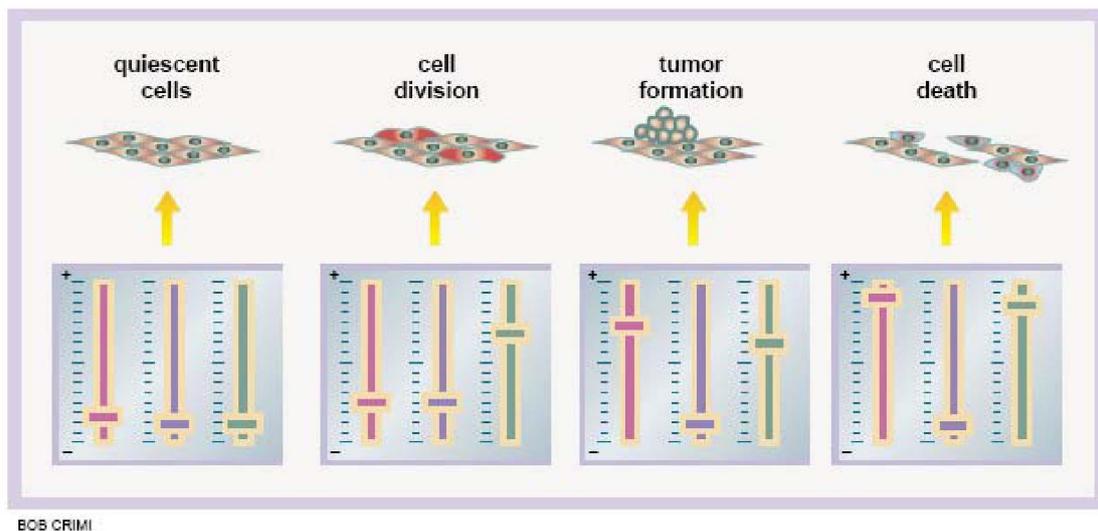
estan sotmeses a condicions d'estrès (Benhar et al., 2002). Així, els nivells de ROS es troben incrementats en cèl·lules que han estat exposades a situacions d'estrès - inclòs el provocat pels fàrmacs antitumorals (Jabs, 1999) - mitjançant el qual promouen apoptosi a través de l'activació de molècules de senyalització pro-apoptòtica tals com JNK i p38 (Davis et al., 2001; Tobiume et al., 2001). Les ROS també tenen un paper crucial en l'apoptosi induïda per p53 (Polyak et al., 1997).

Mentre que inicialment es pot observar en algunes cèl·lules tumorals un incrementat estrès oxidatiu, en altres casos, aquest està emmascarat per l'activació de senyals antiapoptòtiques (Jang and Surh, 2003), que a la vegada, també influeixen en les respostes del cicle cel·lular (Davis, 2000).

Els efectes diversos, i fins i tot oposats, de les ROS en relació al comportament cel·lular podrien ser explicats per la noció de que el creixement està promogut de forma màxima quan les cèl·lules estan protegides d'una toxicitat excessiva però mantenen una senyalització per oxidants suficient per la inducció de gens implicats en el creixement. Per tant, sota condicions de creixement òptim, els alts nivells de ROS conferirien un avantatge pel creixement de les cèl·lules tumorals. En canvi, l'exposició d'aquestes cèl·lules a agents nocius provocaria un increment prolongat dels nivells de ROS que resultaria en la potenciació de l'apoptosi. Col·lectivament, aquests fenòmens il·lustren el concepte fonamental que les respostes cel·lulars a l'estrès oxidatiu no són lineals (**Figura 6**).

Les proteïnes quinases activades per estrès (SAPKs) han sigut estudiades bàsicament en el context de respostes a l'estrès i apoptosi. No obstant això, l'evidència aportada per estudis bioquímics i genètics suggereix que la senyalització a través de la via de la JNK promou senyals oncogèniques (Behrens et al., 2000; Chen et al., 2001) i respostes proliferatives (Tournier et al., 2000) en absència d'estrès. Al igual que succeeix amb les ROS, s'ha demostrat que en les cèl·lules transformades, en comparació a aquelles no transformades, es troben altament activades les SAPKs (Benhar et al., 2002). A més a més, l'habilitat de les quinases activades per estrès per estimular el creixement o la mort cel·lular, al igual que les ROS, depèn en gran mesura de la intensitat i durada del senyal (Chen et al., 1996; Roovers and Assoian, 2000). Així, els nivells d'activitat baixos i transitoris de les SAPKs promourien la proliferació cel·lular mentre que nivells alts i persistents d'activitat resultarien en la mort cel·lular (Benhar et al., 2002).





**Figura 6.** Interrelació de la producció de ROS mitocondrial, la proliferació i la mort cel·lular. Les ROS representen un factor crucial en la regulació de l'expressió de múltiples gens nuclears. D'acord amb l'esquema, deficiències mitocondrials podrien conduir a una incrementada producció de ROS, resultant en la formació del tumor o la mort cel·lular *in vivo*. El cursor vermell representa la producció de ROS; el cursor blau representa l'estat redox; el cursor verd representa el potencial de membrana mitocondrial (Rustin, 2002).

#### 1.4.3. Estrès oxidatiu i resposta de la cèl·lula cancerosa a la teràpia antitumoral

Com a mecanisme d'acció secundari de la radioteràpia i de certs fàrmacs antitumorals (Masuda et al., 1994; Brown and Bicknell, 2001; Deponte et al., 2005), s'ha descrit un increment de la producció de ROS per part de les cèl·lules canceroses. A més, s'ha demostrat que les ROS actuen com intermediaris de l'activació de vies de transducció de senyals en resposta als fàrmacs antitumorals (Shiah et al., 1999).

La sensibilitat de les cèl·lules tumorals al tractament amb fàrmacs anticancerosos depèn de la funció i expressió tant de proteïnes antiapoptòtiques com antioxidants (Lee et al., 2004; Deponte et al., 2005). S'ha vist que alts nivells de ROS i proteïnes que participen en la senyalització d'apoptosi per estrès oxidatiu es troben presents en les cèl·lules tumorals que són sensibles als agents anticancerosos en comparació a les cèl·lules resistents (Benhar et al., 2001). En canvi, en els tumors

resistents al tractament antitumoral sovint es troben sobreexpressats els enzims antioxidants o el glutati6 (Shen et al., 1997), ajudant a la cèl·lula a eludir l'apoptosi.

Els enzims antioxidants tals com la catalasa, Cu/Zn-superòxid dismutasa i glutati6 peroxidasa, protegeixen les cèl·lules de les ROS i s'han vinculat a la resistència enfront de fàrmacs inhibidors de la topoisomerasa i derivats del taxol (Yoshida et al., 2003; Ramanathan et al., 2005). A banda d'aquests enzims, s'ha vist que proteïnes de la família de la peroxiredoxina (Prx) es troben freqüentment elevades en les cèl·lules de càncer de pulm6. Així, la sobreexpressió de PrxI potencia la supervivència i antagonitza l'apoptosi en cèl·lules sotmeses a radiació (Kim et al., 2006). En el mateix sentit, les cèl·lules de carcinoma de pulm6 que mostren una baixa expressió de la PrxV mitocondrial són més sensibles a l'acció dels antitumorals etopòsid i doxorubicina (Kropotov et al., 2006).

L'estimulació farmacològica de la producció de ROS i/o deplecció de metabòlits protectors (tals com el glutati6 i NADPH) podrien conduir a una situació d'estrès oxidatiu i a la inducció d'apoptosi en les cèl·lules tumorals (Engel and Evens, 2006). S'ha suggerit que diversos agents capaços de modular els sistemes redox cel·lulars com L-butionin-(fi,S)-sulfoximina (BSO), triòxid d'arsènic, imexon i motexafin gadolini poden ser usats en monoteràpia o teràpia combinada com antitumorals (Gogvadze and Zhivotovsky, 2007). La modulació de l'estat redox podria ajudar també a sensibilitzar els tumors als fàrmacs citotòxics (Troyano et al., 2001; Anderson and Reynolds, 2002; Hardman et al., 2002). El glutati6, a més d'actuar com antioxidant també participa en els mecanismes d'eliminació de fàrmacs per conjugació (Rappa et al., 2003). Així, s'ha descrit que els nous inhibidors de la  $\gamma$ -glutamyl-cisteïna sintasa, que depleccionen el contingut cel·lular de glutati6 (GSH), sensibilitzen les cèl·lules tumorals a agents alquilants (Hamilton et al., 2007). Per altra banda, és important assenyalar que la deplecció del glutati6 per mitjà de BSO combinat amb melfalan s'ha usat com a estratègia terapèutica produint respostes clíniques en un limitat nombre de pacients amb tumors refractaris (O'Dwyer et al., 1996).

## **1.5. TERÀPIA ANTITUMORAL**

Malgrat els avanços assolits en el tractament del càncer en les últimes dècades, tant la incidència com la mortalitat per aquest conjunt de malalties és molt elevada. La cirurgia segueix essent la millor opció en la majoria de les neoplàsies i es pot aplicar en combinació amb la radioteràpia, la quimioteràpia, l'hormonoteràpia o la

immunoteràpia com a tractaments adjuvants. Una de les principals limitacions dels agents antitumorals convencionals és la falta de selectivitat i l'aparició de mecanismes de resistència tumoral.

### **1.5.1. La quimioteràpia**

La quimioteràpia es basa en l'ús d'agents químics citotòxics. La majoria dels fàrmacs antitumorals actuen en fases específiques del cicle celular, i per tant, són actius en aquelles cèl·lules que es troben en procés de divisió activa. Actualment es disposa d'uns 50 fàrmacs amb aplicació clínica, que generalment es solen combinar amb altres teràpies per aconseguir una millor eficàcia. La teràpia combinada permet disminuir el desenvolupament de resistències i al mateix temps reduir la dosi de cadascun dels fàrmacs per evitar la seva toxicitat sobre els teixits sans. Els règims que incorporen dos o més fàrmacs, en relació a la monoteràpia, han demostrat una major activitat i impacte clínic en el tractament de la malaltia avançada (Kozuch et al., 2001).

Els agents quimioterapèutics es poden classificar de manera molt simplificada en dos grups: els que actuen a nivell de la síntesi d'ADN i els que ho fan sobre components citoplasmàtics essencials per a la divisió cel·lular.

#### **1.5.1.1. Cisplatí**

El cisplatí és un agent antitumoral derivat del platí amb un paper central en la quimioteràpia del càncer. El tractament amb cisplatí, ja sigui en monoteràpia o teràpia combinada, està indicat en el càncer de testicle, càncer d'ovari metastàtic, càncer de bufeta urinària avançat, càncer de cèl·lules escamoses de cap i coll, i carcinoma de pulmó microcític i no microcític. Els principals efectes adversos que limiten el tractament són l'ototoxicitat, la nefrotoxicitat i la neurotoxicitat.

Una vegada el cisplatí entra dins la cèl·lula tumoral, els dos àtoms de clor que conté es substitueixen per molècules d'aigua, fet que li atorga càrrega positiva i li confereix una gran reactivitat contra biomolècules com l'ADN, ARN i proteïnes. El cisplatí s'ha classificat, i clàssicament ha estat considerat, com un agent que té l'ADN nuclear com a principal diana, en el que forma ponts creuats entre les bases de purina, provocant adductes entre cadenes i dins de la mateixa cadena d'ADN (Wang and Lippard, 2005). No obstant això, s'ha descrit que menys d'un 1% del cisplatí acumulat

en la cèl·lula tumoral formaria adductes amb l'ADN (Eastman, 1991), i es sap també que l'apoptosi induïda per cisplatí es dona en absència de nucli (Mandic et al., 2003). Conjuntament aquests fets evidencien la importància d'altres dianes cel·lulars en l'acció antitumoral del cisplatí.

#### **1.5.1.2. Fluorouracil**

Les indicacions d'ús del 5-fluorouracil (5-FU) depenen de la via d'administració. Per via sistèmica, el 5-FU es troba indicat ja sigui en monoteràpia o teràpia combinada en el tractament pal·liatiu, adjuvant i coadjuvant del càncer de còlon, càncer de recte, càncer d'esòfag, càncer d'estómac, tumor primari de fetge i càncer de mama. També s'utilitza en el tractament pal·liatiu del càncer de cap i coll, càncer de bufeta urinària, càncer de ronyó, càncer de pròstata, càncer de cèrvix, càncer d'endometri, càncer d'ovari i càncer de pàncrees. Els principals efectes adversos que limiten el tractament són l'aparició de mielotoxicitat i hepatotoxicitat. Freqüentment provoca alteracions digestives i hematològiques que obliguen a la monitorització del quadre sanguini abans d'iniciar el tractament i durant el mateix.

El 5-fluorouracil és un citostàtic que actua com antimetabòlit de bases pirimidíiques. Aquest fàrmac bloqueja la reacció de metilació de l'àcid desoxiuridíic a àcid timidíic mitjançant la inhibició de l'enzim timidilat sintasa. Donat que inhibeix un enzim essencial en la síntesi dels nucleòtids de timina, el 5-FU interfereix en la replicació de l'ADN, amb la consegüent inhibició de la divisió cel·lular, i per tant, del creixement tumoral.

Els efectes antitumorals i efectes adversos del 5-FU poden ser modificats per canvis de dosi, via d'administració i per combinació amb modificadors bioquímics com el metotrexat, leucovorin o àcid folíic, uridina i composts dietètics (Bagrij et al., 1993). Una de les aproximacions per millorar les limitacions de la teràpia amb 5-fluorouracil és incrementar la seva acció antitumoral per combinació amb leucovorin (Weckbecker, 1991; Sohn et al., 2004) i metotrexat (Backus et al., 2000), que exerceixen una acció inhibidora sinèrgica sobre la timidilat sintasa.

#### **1.5.2. Resistència del tumor al tractament**

El principal problema clínic a l'administrar fàrmacs citotòxics és l'aparició de resistències creuades. Aquest fenomen consisteix en què les cèl·lules tumorals que han estat exposades a un agent citotòxic, desenvolupen resistència creuada a un conjunt de composts no relacionats estructuralment i amb diferent mecanisme d'acció. A més, hi ha tumors que mostren resistència a varis agents antitumorals sense haver estat exposats prèviament a cap tipus de quimioteràpia (Szakacs et al., 2006).

Els mecanismes pels quals les cèl·lules tumorals desenvolupen resistència es podrien classificar bàsicament de la següent manera:

- Disminució de l'acumulació del fàrmac:  
La disminució de l'acumulació pot venir donada per una reducció de l'entrada dels fàrmacs a la cèl·lula tumoral (Wang and Lippard, 2005) o bé per un augment en la seva sortida (Gottesman et al., 2002).
- Alteració del metabolisme del fàrmac:  
La modificació de l'activació o inactivació del fàrmac pot conferir resistència a certs agents antineoplàstics (Eastman, 1991).
- Alteracions de les dianes cel·lulars:  
Molts fàrmacs citotòxics indueixen mort cel·lular interaccionant amb un enzim intracel·lular clau. Canvis en enzims com la dihidrofolat reductasa, timidilat sintasa i les topoisomerases I i II poden comprometre l'eficàcia del fàrmac.
- Augment dels mecanismes de reparació dels danys cel·lulars causats pels antineoplàstics (Eastman, 1991).
- Canvis en la cèl·lula tumoral que afecten a la capacitat citotòxica del fàrmac com són les alteracions en les vies de senyalització promotores de la supervivència cel·lular i una reduïda apoptosi (Longley and Johnston, 2005; Ohmichi et al., 2005):

Es sap que les alteracions genètiques més freqüents en el càncer humà, com són les mutacions o pèrdues que inactiven el supressor tumoral p53, ocasionen resistència tant a la quimioteràpia com a la radioteràpia. La proteïna Bax es troba inactivada per mutació en el càncer colorectal i la deficient activació de caspases es pròpia del càncer d'ovari, melanoma i leucèmia. A molts tumors també es troba sobreexpressat Bcl-2, i per consegüent, l'apoptosi induïda per fàrmacs antitumorals es troba disminuïda.

La via de senyalització que permet l'activació del factor de transcripció STAT3 és una cascada relacionada amb la resistència de les cèl·lules tumorals al tractament (Real et al., 2002). Un altre factor que contribueix de forma

important a la resistència tumoral és la proteïna AKT, que inhibeix la fosforilació de caspasa 9 (Hersey et al., 2006; Meiler and Schuler, 2006). L'activació d'AKT s'ha associat també a la multiresistència de les cèl·lules tumorals (Han et al., 2007; Yu et al., 2008).

### **1.5.3. El concepte de la sensibilització**

La resistència que els tumors desenvolupen als tractaments antitumorals ha estimulat la recerca d'agents sensibilitzants. L'objectiu del tractament de sensibilització és incrementar l'eficàcia de la teràpia i ajudar a reduir la dosi per tal de facilitar el control dels efectes adversos (Bagrij et al., 1993).

Una de les estratègies de sensibilització més coneguda és la teràpia fotodinàmica, que consisteix en l'administració d'un fotosensibilitzant, seguida de la il·luminació local del tumor amb una llum de longitud d'ona apropiada per activar el fàrmac (Dahlman et al., 1983). Un cop activat, i en presència d'oxigen, el fàrmac pot reaccionar directament amb l'oxigen o amb un substrat donant lloc a la formació de ROS (Foote, 1984). La teràpia fotodinàmica ha aconseguit bons resultats en combinació amb fàrmacs antitumorals (Sinha et al., 2006), i entre els seus efectes s'inclouen l'apoptosi, necrosi i el dany de la vasculatura del tumor.

Múltiples dianes a nivell molecular s'han proposat com a possibles punts per incrementar la sensibilització de la cèl·lula cancerosa al tractament amb antitumorals. De fet, han sorgit estratègies terapèutiques basades en la combinació de quimioteràpia i modificadors de la resposta cel·lular. En són exemples, el bloqueig de Her-2 amb trastuzumab per sensibilitzar les cèl·lules resistents de càncer de mama als fàrmacs citotòxics (Pegram et al., 2000); el bloqueig de la senyalització a través del receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) per sensibilitzar les cèl·lules de gliomes d'alt grau al cisplatí (Nagane et al., 1998); i el bloqueig de la senyalització Her-2/neu per sensibilitzar les cèl·lules de carcinoma de pulmó a fàrmacs citotòxics com el cisplatí, etopòsid i doxorubicina (Tsai et al., 1996).

Com a mitjà per revertir la multiresistència s'han estudiat composts capaços d'inhibir la glicoproteïna-p (Thomas and Coley, 2003), una proteïna implicada en el transport actiu del fàrmac a l'exterior de la cèl·lula tumoral. Un altre mecanisme de sensibilització del tumor, que a més a més disminueix l'angiogènesi, és la inhibició de

ciclooxigenasa-2, un enzim clau per la conversió d'àcid araquidònic a prostaglandines que es troba sobreexpressat en molts tumors (Sminia et al., 2005). Per altra banda, donat que la majoria d'antitumorals indueixen la mort cel·lular danyant l'ADN, la inhibició dels mecanismes de reparació s'ha proposat també com una aproximació per augmentar la sensibilitat al tractament (Luo and Levenson, 2005).

Altres estratègies de sensibilització estan basades en potenciar la resposta apoptòtica de la cèl·lula tumoral durant el tractament (Viktorsson et al., 2005), ja sigui activant vies de senyalització apoptòtica addicional o inhibint vies antiapoptòtiques (Gallego et al., 2008). En aquest sentit, el lligand inductor de l'apoptosi relacionat amb el factor de necrosi tumoral (TRAIL) ha mostrat ser efectiu en combatre la resistència del càncer de còlon, glioma, leucèmies i càncer de mama al tractament antitumoral (Cretney et al., 2006). Un altre mètode proposat per a la sensibilització és l'ús d'oligonucleòtids antisentit dirigits contra productes gènics sobreexpressats en la cèl·lula tumoral (Bianco et al., 2005; Yamanaka et al., 2005).

La inhibició de proteïnes quinases implicades en la proliferació de les cèl·lules tumorals s'ha suggerit com un important factor per vèncer la resistència del tumor al tractament (Grant and Dent, 2004; Li et al., 2005; Brozovic and Osmak, 2007). L'atenuació de l'activitat AKT, que promou la supervivència cel·lular, s'ha observat que potencia l'activitat terapèutica de la carmustina en cèl·lules de glioma (Van Meter et al., 2006).

Altres mecanismes que s'han associat a la sensibilització de les cèl·lules tumorals inclouen la promoció de l'autofàgia (Gewirtz et al., 2009) i la promoció de l'estrès oxidatiu (Poh and Pervaiz, 2005).

#### **1.5.4. Composts d'origen natural amb propietats antitumorals**

Diverses substàncies procedents dels microorganismes (Salomon et al., 2000; Kodach et al., 2006), de les plantes - com composts derivats dels extractes del vesca (Bar-Sela and Haim, 2004), polifenols presents en el te verd (Hwang et al., 2007) i triterpens presents a la pell de l'oliva (Juan et al., 2006) - i dels organismes marins - com és el cas de l'alcaloid lamelarina D (Kluza et al., 2006) - han mostrat activitat inhibidora del creixement de les cèl·lules tumorals per mitjà de diferents mecanismes, principalment per inducció d'apoptosi.

Els composts derivats de plantes són els que tradicionalment han sigut més estudiats. Entre ells, els polifenols han sigut centre de gran interès per l'àmplia varietat de propietats farmacològiques que presenten. Se'ls reconeixen propietats antioxidants, i cada vegada hi ha més evidència de que podrien interferir en el procés de desenvolupament de tumors malignes. A més a més, s'ha descrit que polifenols com el resveratrol, curcumina, flavona (Wenzel et al., 2005) i galocatequines (Chen et al., 2003) induïxen apoptosi en diverses línies de cèl·lules tumorals. S'ha vist que alguns d'aquests flavonoids causen ruptura oxidativa en les cadenes d'ADN per si mateixos o en presència de metalls de transició com el coure. La majoria dels polifenols de les plantes han mostrat tant propietats antioxidants com pro-oxidants; de fet, s'ha proposat que l'acció pro-oxidant podria ser un mecanisme important en les seves propietats anticanceroses.

Les propietats antitumorals del resveratrol destaquen especialment i han sigut objecte de múltiples estudis (Tinhofer et al., 2001). A l'any 1940 fou aïllat per primera vegada com un constituent de les arrels de l'el·lebor blanc (*Veratrum grandiflorum* O. Loes), i des de llavors, aquest polifenol ha sigut identificat en diverses plantes. El resveratrol, trans-3,5,4'-trihidroxiestilbè, es troba present de forma natural en la pell del raïm, cacauets i en diversos fruits. A banda dels seus efectes cardioprotectors, el resveratrol ha demostrat la capacitat de suprimir la proliferació d'una gran varietat de cèl·lules tumorals, incloses les de càncer colorectal (Mahyar-Roemer et al., 2002) i les de gliomes (Jiang et al., 2005). Els efectes inhibidors del creixement tumoral produïts pel resveratrol s'han associat a l'aturada del cicle cel·lular; increment de l'expressió de p53 i Bax; disminució de survivina, ciclina D1, ciclina E i Bcl-2; i activació de caspases. A més, s'ha vist que el resveratrol suprimeix l'activació de diversos factors de transcripció, inclosos NF- $\kappa$ B i AP-1; també inhibeix quinases com JNK, AKT i PKC; i disminueix l'expressió de proteïnes com ciclooxigenasa-2, factor de creixement endotelial vascular (VEGF), 5-lipooxigenasa, l'antigen prostàtic específic (PSA), IL-1, IL-6 i IL-8. El resveratrol inhibeix diverses etapes del procés de carcinogènesi: bloqueja l'activació de carcinògens per inhibició de l'activitat i expressió de CYP1A1; i suprimeix la iniciació, promoció i progressió tumoral *in vivo*. Les limitades dades dels estudis en humans, mostren que el resveratrol és segur des del punt de vista farmacològic, i en l'actualitat, s'estan estudiant anàlegs que puguin millorar la seva biodisponibilitat per poder ser usats com a potencials agents terapèutics en pacients oncològics (Aggarwal et al., 2004; Athar et al., 2007).



S'ha proposat que certs composts de la dieta podrien contribuir a l'efectivitat d'alguns agents antitumorals, mitjançant l'increment de la tolerància de l'organisme al fàrmac (Singal et al., 1997; DeAtley et al., 1999). Així, els composts dietètics antioxidants podrien ajudar a protegir l'organisme de l'estrès oxidatiu que provoca el càncer i la quimioteràpia sobre els teixits sants (Conklin, 2000; Horie et al., 2001). Per altra banda, la potenciació de l'apoptosi per components d'origen natural com el triterpenoid àcid betulínic (Fulda and Debatin, 2005) i el polifenol resveratrol (Fulda and Debatin, 2004) s'han relacionat amb la sensibilització de la cèl·lula tumoral a fàrmacs citotòxics.

#### **1.5.5. El mitocondri: potencial diana de nous agents antitumorals**

Certes diferències entre els mitocondris de les cèl·lules tumorals i les normals, converteixen el mitocondri en una possible diana en la terapèutica del càncer. La resistència de les cèl·lules tumorals al tractament freqüentment es troba associada a deficiències en diverses parts de la maquinària apoptòtica; per tant, l'eliminació efectiva de les cèl·lules canceroses depèn en gran mesura de la capacitat dels antitumorals per estimular vies apoptòtiques silents. Múltiples estudis han demostrat que un gran nombre de fàrmacs antitumorals exerceixen la seva acció terapèutica per inducció d'apoptosi en les cèl·lules malignes (Debatin, 2000; Preston et al., 2001), majoritàriament degut a l'activació de la via del citocrom c/caspasa 9, però també s'han suggerit altres mecanismes com l'afectació a l'estructura de la membrana interna mitocondrial (Arap et al., 1998; Ellerby et al., 1999) i la inducció de la producció de ROS a través de la cadena respiratòria (Joshi et al., 1999).

S'ha descrit que certs composts antitumorals alteren la funció mitocondrial de manera prèvia a la inducció d'apoptosi, i que aquests canvis inclouen la disminució del consum d'oxigen mitocondrial i el descens de la concentració de calci intramitocondrial (Schmidt-Mende et al., 2006). Així, la inhibició de la cadena respiratòria podria estimular la producció de ROS mitocondrial (Cadenas and Boveris, 1980), facilitant l'oxidació de la cardiolipina i la consegüent alliberació del citocrom c durant el procés apoptòtic (Garcia Fernandez et al., 2002; Kagan et al., 2009).

Per altra banda, s'ha descrit que alguns fàrmacs antitumorals tindrien la capacitat d'interactuar amb els mitocondris com a dianes secundàries, fet que s'ha

relacionat amb els efectes adversos sobre els teixits sans (Kruidering et al., 1997; Szewczyk and Wojtczak, 2002; Martins et al., 2008; Custodio et al., 2009).

## **1.6. CANCER COLORECTAL**

### **1.6.1. Epidemiologia i característiques moleculars en el càncer colorectal**

El càncer colorectal (CCR) és una de les neoplàsies més freqüents en els països occidentals. La seva incidència se situa al voltant de 30 casos/100.000 habitants en homes i 20 casos/100.000 habitants en dones, el que la converteix en la segona neoplàsia més freqüent en ambdós sexes, darrera del càncer de pulmó i de mama, respectivament. Aquesta elevada incidència i els encara relativament poc satisfactoris resultats en el seu tractament, fan que el CCR esdevingui la segona causa més freqüent de mort per càncer en el nostre medi (Castells et al., 2000).

La major part dels casos corresponen a formes esporàdiques de la malaltia, tot i que en un percentatge elevat dels mateixos (15-25%) és possible recollir l'antecedent familiar de CCR i altres neoplàsies (Winawer et al., 1993; Burt, 2000). A banda d'aquestes formes familiars, les quals poden correspondre a formes hereditàries amb baixa penetrància o trastorns poligènics amb participació de polimorfismes que modulen la influència de factors ambientals, existeixen dues síndromes hereditàries associades al CCR, la poliposi adenomatosa familiar i el càncer colorectal hereditari no associat a poliposi (Rustgi, 1994). Ambdues entitats, malgrat representar una proporció reduïda del total de neoplàsies colorectals, tenen una gran importància des d'un punt de vista fisiopatològic, clínic i terapèutic. En primer lloc, els coneixements adquirits en relació als factors que participen en el desenvolupament d'aquestes malalties hereditàries, com són els gens que es troben mutats a nivell germinal, han permès conèixer mecanismes que tenen una implicació clau en el CCR esporàdic (Fearon et al., 1990). En segon lloc, la identificació dels gens responsables ha permès establir el diagnòstic presimptomàtic dels individus portadors de mutacions en aquests gens i, per tant, el risc de desenvolupar la malaltia, amb la consegüent repercussió en les estratègies de cribatge (Giardiello et al., 2001). Per últim, el diagnòstic molecular d'ambdues formes de CCR possibilita l'adopció de mesures terapèutiques més radicals, diferenciades de les emprades a les formes esporàdiques, la qual cosa hauria de tenir un impacte favorable en el pronòstic d'aquests malalts.

En els darrers anys, diversos estudis han permès establir les alteracions gèniques que participen en la patogènia del CCR esporàdic al llarg de la seqüència adenoma-carcinoma. En aquest model seqüencial, el desenvolupament del CCR reflecteix l'activació de determinats oncogens i la inactivació de diversos gens supressors. L'acumulació d'aquestes alteracions, més que no pas l'ordre en que s'han adquirit, és la responsable de la transformació i progressió neoplàstica (Fearon et al., 1990).

### **1.6.2. Tractament del cancer colorectal**

El tractament del CCR depèn fonamentalment del seu estadi evolutiu i de la seva localització. L'únic tractament amb finalitat curativa és el tractament quirúrgic. La finalitat de la cirurgia és l'exèresi del tumor primari amb uns marges de resecció amplis, així com de tots els ganglis adjacents amb la finalitat de disminuir la probabilitat de recidiva de la malaltia (Nelson et al., 2001).

En els pacients amb càncer colorectal en estadi III de la classificació TNM, està universalment acceptat la necessitat de realitzar tractament complementari amb quimioteràpia. Així, múltiples estudis han demostrat l'efecte beneficiós del tractament en relació al risc de recidiva i a la probabilitat de supervivència (Moertel et al., 1995; O'Connell et al., 1998). Actualment, persisteix la controvèrsia sobre la necessitat d'efectuar tractament complementari en pacients en estadi II, ja que el seu relatiu bon pronòstic redueix el potencial efecte beneficiós del tractament (Boland et al., 2000). La disparitat de resultats obtinguts en diferents estudis suggereix que és necessari identificar nous indicadors de mal pronòstic (afectació peritoneal, invasió venosa, afectació marges, perforació tumoral, etc.) que permetin seleccionar aquells pacients en estadi II amb una major probabilitat de recidiva i, per tant, que es puguin beneficiar de tractament adjuvant de manera similar al que passa en pacients amb tumors en estadi III (Petersen et al., 2002).

### **1.6.3. Pronostic dels pacients amb cancer colorectal**

El pronòstic dels pacients amb CCR depèn de diversos factors clínics, histològics i biològics. El factor predictiu més determinant pel que fa a la supervivència i recidiva tumoral és l'estadi tumoral, el qual té en compte la penetració en la paret del budell, l'afectació ganglionar i la presència de metàstasis a distància.

L'estadi evolutiu del CCR pot establir-se d'acord amb la classificació de Dukes o amb el sistema TNM de la *Internacional Union Against Cancer* (Fleming et al., 1997). Ambdues classificacions es correlacionen amb el pronòstic dels malalts. Així, els carcinomes in situ tindrien una supervivència del 98-100% als 5 anys, mentre que per un estadi TNM IV, la supervivència als 5 anys seria inferior al 5%.

La presència de disseminació metastàtica és un dels factors amb major valor predictiu independent. Un 40-50% dels malalts amb CCR desenvolupen metàstasis hepàtiques, ja sigui de manera simultània amb el tumor primari (sincròniques, 15-25%) o al llarg del seguiment (metacròniques, 75-85%). El desenvolupament de metàstasis implica un pessim pronòstic a llarg termini, amb una supervivència als 5 anys del 25-30% pels pacients sotmesos a cirurgia radical, i de menys del 5% en aquells amb malaltia irreseccable (Castells et al., 2000). El valor pronòstic de l'estadi evolutiu del tumor justifica que aquest sigui el principal criteri a l'hora d'indicar la realització de tractament complementari.

Malgrat que les diferents classificacions basades en criteris anatomopatològics permeten establir el pronòstic de manera global, cap d'elles possibilita la predicció del comportament individual d'un determinat malalt a fi de seleccionar aquells que més es poden beneficiar d'un seguiment estricte o d'un tractament adjuvant més intens. Donat que el pronòstic dels malalts intervinguts amb finalitat radical està condicionat per la recurrència de la malaltia, una estratègia vàlida per aconseguir aquest objectiu seria la identificació precoç de disseminació metastàtica oculta o microscòpica o, dit d'altra manera, de malaltia mínima residual. Altres aproximacions contemplen l'establiment del valor pronòstic de diferents marcadors moleculars implicats en el creixement i/o la progressió tumoral (Campo et al., 1992; Campo et al., 1994; Castells et al., 1998).

## **1.7. TUMORS CEREBRALS**

### **1.7.1. Epidemiologia, patologia i classificació dels tumors cerebrals**

Dintre de les patologies del sistema nerviós, els tumors cerebrals són malalties de gran importància. A Espanya, cada any es diagnostiquen més de 3100 nous casos de càncer primari de cervell i sistema nerviós. Encara que els tumors cerebrals poden tenir lloc a qualsevol edat, són més comuns en nens de 3 a 12 anys i en adults de 40 a 70 anys. Els tumors de cervell més freqüents en els adults són les metàstasis,

astrocitomes, meningiomes i adenomes hipofisaris i en els nens astrocitomes i medulloblastomes. Considerant cada gènere per separat, varis estudis epidemiològics basats en tumors primaris cerebrals a Espanya, mostren que la incidència de gliomes és major en homes que en dones (Pascual-Piazuelo et al., 2002a).

Els tumors poden localitzar-se tant dintre del cervell com a prop del mateix: en el crani, les membranes cerebrals, el teixit de sostén, els nervis cranials, la glàndula hipòfisi o la glàndula pineal. La neoplàsia pot comprimir o invadir el teixit sa adjacent, destruint àrees que tenen al seu càrrec la visió, el moviment, l'equilibri, l'audició, la parla, la memòria i la conducta; la pressió del tumor també pot causar tumefacció del teixit cerebral circumdant (Arismendi-Morillo et al., 2007), que a la vegada pot conduir a un augment de la pressió intracranial del pacient. En conseqüència, el dany provocat per la neoplàsia sobre les anteriors estructures cerebrals provoca els signes i símptomes propis de la malaltia. No obstant, és important assenyalar que cada tipus de tumor cerebral té els seus signes i símptomes, tractament i pronòstic propis; tant els tumors benignes com malignes poden produir un deteriorament neurològic profund i irreversible. A més, quasi cap dels tumors malignes cerebrals pot curar-se.

Els tumors cerebrals poden classificar-se en primaris o metastàtics (secundaris), essent aquests darrers més comuns que els primers. Un tumor metastàtic es dissemina al cervell des d'un tumor maligne localitzat en una altra part del cos (entre les lesions primàries més freqüents es troben el carcinoma de pulmó, l'adenocarcinoma de pròstata, el melanoma, el càncer de mama i el càncer digestiu). Per contra, un tumor primari del cervell s'origina i desenvolupa dins del teixit cerebral; generalment se'n desconeix la causa, i en ocasions es presenta com un tumor congènit.

### **1.7.2. Els gliomes**

Els gliomes són tumors primaris del sistema nerviós central. L'Organització Mundial de la Salut subdivideix els gliomes en quatre tipus (I-IV), d'acord amb el grau creixent de malignitat detectat en l'anàlisi histològica. Els gliomes de baix grau són tumors localitzats, ben definits i porten associat un millor pronòstic. Els gliomes d'alt grau són anaplàstics, i tenen un ràpid creixement i una alta capacitat d'invasió (Monzon et al., 1996).

Aproximadament el 60% dels casos de glioma són els d'alt grau, pels quals, la supervivència dels pacients a 2 anys és del 6%. En aquests casos, la millor opció terapèutica és la cirurgia resectiva, més radioteràpia i quimioteràpia, per permetre prolongar la vida del pacient uns pocs mesos (Hadziahmetovic et al., 2008). Malgrat s'apliqui un tractament combinat, els bons resultats són extremadament estranys degut a que queden cèl·lules infiltrades en el teixit cerebral aparentment sa, causant inevitablement la recurrència tumoral (Laerum et al., 1984; Kaba and Kyritsis, 1997). El pronòstic del pacient, a banda del tipus histològic, depèn d'altres factors com el tipus de tumor, edat, índex de Karnofsky, localització del tumor (Lamborn et al., 2004), i especialment, la magnitud de la resecció quirúrgica (Pascual-Piazuelo et al., 2002b; Hentschel and Sawaya, 2003; Martinez et al., 2007).

En el tractament dels gliomes cerebrals es té en compte la localització, el tipus cel·lular i el grau de malignitat, i sovint, és una aproximació combinada utilitzant cirurgia, radioteràpia i quimioteràpia. En l'actualitat s'estan investigant noves estratègies de tractament com la teràpia genètica, noves quimioteràpies, immunoteràpies i altres aproximacions terapèutiques basades en agents moduladors de l'estat redox (Mehta et al., 2003) o de les alteracions metabòliques del tumor (Nebeling et al., 1995).

### **1.7.3. Els gliomes i la heterogeneïtat intratumoral**

Els gliomes són una malaltia heterogènia tant des del punt de vista clínic com patològic. S'han detectat diferències regionals en els gliomes en l'activitat proliferativa, en les alteracions histològiques i en les alteracions genotípiques. Pareix ésser que el grau d'heterogeneïtat genotípica i d'heterogeneïtat en els marcadors de proliferació incrementa amb el grau histològic del tumor; i el que és més important, com major és l'heterogeneïtat intratumoral en aquests marcadors de malignitat major és l'impacte advers en la utilitat del seu anàlisi per a la predicció de la supervivència del pacient amb glioma (Coons and Johnson, 1993).

A la presència de diferències entre regions del glioma, es suma un grau més de complexitat degut a la coexistència de subpoblacions de cèl·lules canceroses dins la massa tumoral. La presència de més d'un subclon en el tumor primari s'ha relacionat tant amb la recurrència tumoral com amb la resposta a la quimioteràpia (Shapiro and Shapiro, 1985; Zhang et al., 2007). Recentment, s'ha demostrat que en els gliomes existeix una petita fracció de cèl·lules amb característiques de progenitors neurals i

amb capacitat d'induir la formació del tumor. Aquestes cèl·lules quiescents i amb capacitat d'autorenovació es coneixen com a cèl·lules mare tumorals i podrien constituir un reservori per el manteniment del tumor ja que tenen la capacitat tant d'autorenovar-se com la de produir la progènie de cèl·lules que comprenen el tumor (Singh et al., 2004). Varis estudis han relacionat la població de cèl·lules mare tumorals (positives pel marcador CD133) amb una incrementada resistència tant a l'apoptosi com a l'autofàgia induïda pel tractament amb agents antineoplàstics com la temozolamida (Fulda and Debatin, 2004). A més a més, els estudis d'expressió gènica han revelat que la quimioresistència de les cèl·lules mare tumorals CD133+ del glioma podria estar relacionada amb una elevada expressió de gens de resistència a múltiples fàrmacs, de gens inhibidors de l'apoptosi i de gens de reparació de l'ADN (Lee et al., 2006; Liu et al., 2006).





## **2. Objectius i plantejament experimental**



## 2. OBJECTIUS I PLANTEJAMENT EXPERIMENTAL

El present treball s'emmarca dins del projecte d'investigació "Papel del estrés oxidativo en la respuesta de la célula cancerosa al tratamiento antitumoral y su modulación por hormonas sexuales y elementos pro-/antioxidantes" (*Programa de Promoción de la Investigación Biomédica y en Ciencias de la Salud del Ministerio de Sanidad y Consumo; finançat pel Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Consumo del Gobierno Español*, PI060266), dirigit per la Dra. Maria Pilar Roca Salom i portat a terme en el Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut; amb l'objectiu d'establir el paper de l'estrès oxidatiu sobre la supervivència cel·lular i la resposta de la cèl·lula tumoral al tractament, i caracteritzar la seva modulació per hormones sexuals en tumors hormonodepenents, així com per elements pro-oxidants i antioxidants dietètics en un tipus de càncer molt sensible a la dieta com és el càncer colorectal.

Certs estudis apunten a que les diferències en l'estrès oxidatiu i en el metabolisme energètic entre la cèl·lula normal i la cèl·lula cancerosa podrien suposar una base bioquímica per a especular noves estratègies terapèutiques dirigides selectivament contra les cèl·lules tumorals (Nebeling et al., 1995; Seyfried and Mukherjee, 2005). Encara que els mecanismes de proliferació i invasió de la cèl·lula cancerosa han sigut intensament estudiats, molts aspectes de la seva biologia són en l'actualitat bastant desconeguts (Lyons et al., 2007). D'aquesta manera, la contribució dels defectes en la cadena respiratòria i de les ROS d'origen mitocondrial en el metabolisme cel·lular, la bioquímica redox i les decisions de supervivència-mort de la cèl·lula tumoral són relativament desconegudes. Així mateix, la importància de la composició i el dany mitocondrial en l'efectivitat de la quimioteràpia, i el paper dels elements de la membrana interna mitocondrial en la resistència que mostren les cèl·lules tumorals al tractament, es desconeixen àmpliament. Per tant, l'objectiu general del present treball és aprofundir en la influència de l'equilibri redox en aspectes de la biologia tumoral com són el metabolisme oxidatiu i el creixement cel·lular; a més a més, d'avaluar la importància de les ROS en l'eficàcia de la quimioteràpia i establir la rellevància de la intensitat de l'estrès oxidatiu en la superació de la quimioresistència a fàrmacs convencionals.

Els gliomes són tumors heterogenis tant des del punt de vista clínic com patològic. Les alteracions metabòliques en el glioma tenen gran importància ja que

promouen un comportament biològic més agressiu, estimulant la proliferació i invasió del tumor. En aquest sentit, és d'esperar que el major coneixement de la naturalesa heterogènia del glioma i del seu metabolisme faciliti el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques i diagnòstiques per combatre aquest tipus de tumors cerebrals, superant les importants limitacions de la teràpia convencional. Després de la cirurgia, els gliomes malignes tendeixen a recórrer en els marges de resecció quirúrgica degut a que queden cèl·lules infiltrades en el teixit cerebral (Laerum et al., 1984; Kaba and Kyritsis, 1997). La recurrència del creixement tumoral és la major causa de mortalitat per aquest tipus de càncer.

Estudis realitzats utilitzant colònies cellulars i seccions procedents de teixits tumorals humans embeguts en parafina suggereixen una distribució espacial heterogènia de les cèl·lules canceroses dins la massa tumoral, on les cèl·lules més proliferatives es localitzarien en la perifèria del tumor (Bru et al., 2003). De la mateixa manera, estudis d'imatge per ressonància magnètica evidencien una heterogeneïtat estructural del tumor i una heterogeneïtat en la seva vascularització; indicant que l'estructura del tumor presenta diferents zones des de la perifèria, l'àrea més proliferativa del tumor, fins al centre (Le Duc et al., 1999). Considerant que la recurrència del tumor és un problema important en els pacients amb gliomes, fins i tot per aquells sotmesos a una resecció quirúrgica màxima, l'existència de subpoblacions de cèl·lules tumorals amb diferents característiques fenotípiques podria aportar una explicació a l'alta taxa de recidives de la malaltia tumoral. Per altra banda, donat que la terapèutica convencional està dirigida contra la població global de cèl·lules tumorals, el propi tractament podria exercir una pressió selectiva facilitant la supervivència de les cèl·lules tumorals més resistents.

Estudis previs fins a la data, havien considerat la comparació de l'estrès oxidatiu en la massa del glioma globalment en relació al teixit sa, o bé s'havia suggerit una heterogeneïtat intratumoral sense concretar la seva possible relació amb el desequilibri redox o la funció mitocondrial, ambdues molt importants per a poder comprendre tant la proliferació del càncer com la resposta de les cèl·lules malignes al tractament citotòxic. Considerant aquestes apreciacions i els aspectes prèviament mencionats, el primer objectiu de la present tesi es centra en caracteritzar les possibles diferències entre el centre i la perifèria de la massa tumoral de gliomes humans, en relació al funcionament mitocondrial i a l'estrès oxidatiu. Per a cobrir aquest objectiu, es van incloure en l'estudi pacients adults amb tumors gials fàcilment

accessibles per cirurgia als quals s'aplicàs una resecció màxima del tumor. En tots els casos, el tractament quirúrgic es va considerar de primera elecció després d'una valoració mèdica multidisciplinària per part del comitè de neoroncologia de l'Hospital Universitari de Son Dureta (HUSD). En cadascuna de les mostres es va assegurar una distinció inequívoca del centre i la perifèria de la massa tumoral. Els resultats d'aquest primer estudi es troben detallats en el **manuscrit I** (Santandreu et al., 2008).

Com a complement del model d'estudi de les diferències en l'estrès oxidatiu i la funció mitocondrial en la distribució espacial dintre de la massa tumoral, es va utilitzar un model *in vitro* representatiu de l'evolució tumoral en el temps. A tal efecte, es van comparar línies cel·lulars canceroses de còlon humà derivades de la lesió primària i metastàtica i cèl·lules epitelials intestinals amb un major grau de diferenciació. Els estudis *in vitro* es van utilitzar per poder aprofundir en la regulació de la proliferació cel·lular per estrès oxidatiu, i a la vegada, per investigar possibles mecanismes moleculars que ajudessin a entendre com la cèl·lula tumoral pot sobreviure sota nivells endògens elevats d'espècies reactives d'oxigen. Els experiments i resultats que engloben aquest segon objectiu es recullen en els **manuscrits II** (Santandreu et al., 2009) i **III**. L'objectiu global d'aquest segon estudi es concreta en els següents objectius específics:

- a) Estudiar les diferències en l'estres oxidatiu, funció mitocondrial i proliferació en relació al grau de diferenciació cel·lular.
- b) Descriure la rellevància de la capacitat desacoblant mitocondrial en el control de la producció endògena de ROS en les cèl·lules canceroses.
- c) Establir els efectes de l'estres oxidatiu sobre l'expressió de proteïnes desacoblants.
- d) Caracteritzar la resposta adaptativa antioxidant de la cèl·lula tumoral enfront d'estímul oxidants que resulten citotòxics a llarg termini.
- e) Estudiar la importància del balanç redox dels tiols en el manteniment de la quiescència de les cèl·lules intestinals diferenciades.

No tots els tumors són tractables per resecció quirúrgica, que és l'únic tractament potencialment curatiu, ja sigui perquè es troben en zones anatòmiques que no puguin ser operades o bé per l'estat avançat de la malaltia. Els pacients amb tumors irreseccables són tractats amb quimioteràpia, i en determinats tipus de tumors, la quimioteràpia suposa un tractament important en combinació amb la cirurgia i radioteràpia per aconseguir un increment en la supervivència dels pacients oncològics.

Els nous esquemes terapèutics estan basats en un tractament combinat i els estudis preclínic i limitats estudis clínics han mostrat resultats esperançadors usant els fàrmacs antitumorals convencionals juntament amb moduladors de l'estat redox cel·lular. La regulació farmacològica a favor de l'increment de la producció de ROS o de la disminució de metabòlits reductors com el glutatí ha demostrat que pot incrementar l'estrès oxidatiu i superar la resistència intrínseca de la cèl·lula tumoral a la mort programada. Per altra banda, s'ha descrit que en les cèl·lules tumorals resistents als agents antitumorals es dona una elevada expressió de sistemes de defensa antioxidant. Les cèl·lules tumorals adquireixen resistència com a resultat de la pressió selectiva dictada per les alteracions genètiques i metabòliques, i recentment s'ha vist que el procés de supervivència es troba facilitat per el control de les ROS d'origen mitocondrial. És probable que un millor coneixement dels mecanismes pels que s'interrelaciona la supressió del creixement tumoral amb les ROS permeti la utilització efectiva i més racional dels agents redox en la terapèutica antitumoral. Així, l'objectiu del tercer estudi és establir la importància dels mitocondris com elements de resposta i amplificació de les senyals oxidatives que participen en l'acció citotòxica de la quimioteràpia, i per altra banda, determinar també la rellevància de la intensitat de l'estrès oxidatiu per tal de reconduir les cèl·lules tumorals resistents a la mort cel·lular. Els experiments i resultats que engloben aquest darrer objectiu es recullen en els **manuscrits IV i V**. L'objectiu global d'aquest últim estudi es concreta en els següents objectius específics:

- a) Estudiar la relació existent entre la quimiosensibilitat i el grau de disrupció de la capacitat antioxidant endògena en la cèl·lula tumoral.
- b) Avaluar la relació entre la sensibilitat a la quimioteràpia i la capacitat d'induir en moments inicials dany mitocondrial en la cèl·lula tumoral.
- c) Descriure la importància de les ROS en la inhibició de la proliferació de les cèl·lules canceroses induïda per antitumorals convencionals com el cisplatí i el 5-fluorouracil.
- d) Determinar els efectes oxidatius dels antitumorals sobre els components mitocondrials.
- e) Determinar la importància de les interaccions que el cisplatí estableix sobre el balanç energètic i redox mitocondrial en la seva acció citotòxica: implicacions de la proteïna UCP2.
- f) Establir la importància de la intensitat de l'estrès oxidatiu i de la inactivació de les senyals de supervivència cel·lular sensibles a l'estat redox en la sensibilització de les cèl·lules tumorals al 5-fluorouracil.

A continuació es presenta la metodologia que ha sigut utilitzada per a la consecució dels objectius proposats en els diversos estudis que formen part d'aquesta tesi doctoral:

- Estudi immunohistoquímic de les diferències en el marcador de proliferació Ki-67 entre diferents regions tumorals.
- Centrifugació diferencial per a obtenir la fracció mitocondrial a partir de regions tumorals i línies cel·lulars canceroses d'origen humà.
- Determinació del contingut en proteïna total i mitocondrial (indicador bioquímic de la massa mitocondrial).
- Determinació de l'activitat enzimàtica lactat deshidrogenasa (LDH; EC 1.1.1.27) com indicador de la puresa mitocondrial.
- Anàlisi del contingut en ADN total per espectrofotometria i en ADNmt (indicador bioquímic del nombre de mitocondris) per PCR a temps real.
- Anàlisi del potencial de membrana i dels nivells de cardiolipina mitocondrials per fluorimetria.
- Determinació de la capacitat respiratòria mitocondrial i cel·lular mitjançant elèctrode d'oxigen.
- Anàlisi de l'activitat fosfatasa alcalina, present en els microvillis, com indicador de la diferenciació de la cèl·lula intestinal (AP; EC 3.1.3.1).
- Determinació de la capacitat mitocondrial aeròbia-oxidativa i oxidativa mitjançant l'anàlisi de l'activitat dels enzims citrat sintasa (CS; EC 4.1.3.7) i citocrom c oxidasa (COX; EC 1.9.3.1) i fosforilativa, a través de l'activitat ATP sintasa (ATPasa; EC 3.6.1.3). Determinació de l'activitat dels complexos respiratoris I (EC 1.6.5.3) i II-III (EC 1.3.5.1 i EC 1.10.2.2).
- Anàlisi de la capacitat màxima mitocondrial de producció de ROS mitjançant tractament de mitocondris aïllats amb rotenona (inhibidor del complex I) i antimicina A (inhibidor del complex III).
- Anàlisi dels nivells intracel·lulars de ROS per espectrofluorimetria i microscòpia confocal.
- Avaluació de la capacitat antioxidant mitocondrial a través de la determinació de l'activitat dels enzims glutatí peroxidasa (GPx; EC 1.11.1.9), glutatí reductasa (GRd; EC 1.8.1.7), i superòxid dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1). Així com de l'activitat de proteïnes no enzimàtiques com les UCPs a través de la inhibició

depenent de GDP (o depenent de genipina, en el cas específic de la proteïna UCP2) de la producció de ROS en mitocondris atllats.

- Avaluació de la capacitat antioxidant celular a través de la determinació de l'activitat enzimàtica de les proteïnes catalasa (EC 1.11.1.6.), glutatí reductasa (GRd; EC 1.8.1.7), glutatí peroxidasa (GPx; EC 1.11.1.9) i superòxid dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1); i a través de la determinació dels nivells i estat d'oxidació d'antioxidants solubles com el glutatí.
- Anàlisi del dany oxidatiu de l'ADN mitocondrial per PCR a temps real.
- Quantificació del dany oxidatiu a proteïnes cel·lulars i mitocondrials avaluant la presència de grups carbonil mitjançant assajos espectrofotomètrics i immunoassaig per dot-blot.
- Quantificació del dany oxidatiu a lípids cel·lulars i mitocondrials mitjançant assajos espectrofotomètrics (TBARS) i immunoassaig per dot-blot (determinació d'adductes formats per reacció amb 4-hidroxi-2-nonenal).
- Determinació de la viabilitat cel·lular mitjançant l'assaig colorimètric (MTT).
- Determinació de la citotoxicitat per avaluació del nombre de clons viables formats a llarg termini.
- Anàlisi del cicle cel·lular mitjançant citometria de flux.
- Determinació de la capacitat desacoblant mitocondrial a través de l'estudi dels nivells de proteïnes desacoblants per western blot.
- Determinació dels nivells de proteïnes de vies de senyalització sensibles a l'estat redox i el seu grau d'activació, analitzant el seu estat de fosforilació per western blot.
- Anàlisi de l'expressió genètica mitjançant la determinació dels nivells d'ARNm per PCR a temps real.

*Per al desenvolupament del projecte de tesi la doctoranda va obtenir una beca per a Formació de Personal Investigadors dins del marc del Pla de Recerca i Desenvolupament Tecnològic de les Illes Balears fomentat per la Conselleria d'Economia, Hisenda i Innovació del Govern de les Illes Balears.*



### **3. Resultats i discussió**



**MANUSCRIT I**

**Differences in mitochondrial function and antioxidant systems between regions of human glioma.**

Santandreu, F.M.; Brell, M.; Gene, A.H.; Guevara, R.; Oliver, J.; Couce, M.E.; Roca, P.

*Cell Physiol Biochem* 2008; 22(5-6): 757-768.

DOI: 10.1159/000185559



**MANUSCRIT II**

**Hydrogen peroxide regulates the mitochondrial content of uncoupling protein 5  
in colon cancer cells.**

Santandreu, F.M.; Valle, A.; Fernández de Mattos, S.; Roca, P.; Oliver, J.

*Cell Physiol Biochem* 2009; 24(5-6): 379-390.

DOI: 10.1159/000257430



**MANUSCRIT III**

**Improvement of mitochondrial energy and oxidative balance during intestinal differentiation.**

Santandreu, F.M.; Oliver, J.; Roca, P.





**MANUSCRIT IV**

**Uncoupling protein-2 knockdown mediates the cytotoxic effects of cisplatin.**

Santandreu, F.M.; Roca, P.; Oliver, J.



**MANUSCRIT V**

**Overcoming 5-fluorouracil resistance through downregulation of redox-sensitive survival signals. Manuscrit.**

Santandreu, F.M.; Oliver, J.; Roca, P.



## **4. Recapitulació**



#### 4. RECAPITULACIÓ

Els estudis portats a terme en la present tesi es fonamenten en tres aspectes bàsics:

1. L'heterogeneïtat intratumoral i les diferències en les característiques mitocondrials i marcadors d'estrès oxidatiu en les subpoblacions de cèl·lules malignes localitzades en la regió central i perifèrica del tumor glial.
2. Les diferències en l'estrès oxidatiu i funcionalitat mitocondrial en relació al grau de diferenciació cel·lular.
3. La utilitat d'induir una acumulació intracel·lular de ROS que superi el llindar citotòxic de la cèl·lula tumoral per aconseguir l'eficàcia de fàrmacs fonamentals en el tractament de tumors avançats com són el cisplatí i 5-fluorouracil.

Les sèries d'estudis recents donen suport al concepte de que els gliomes s'haurien de contemplar com un "microecosistema" on s'interrelacionen les cèl·lules tumorals, el microambient, la vasculatura i les cèl·lules mare tumorals (Singh et al., 2004; Sonveaux et al., 2008). Els nostres experiments indiquen una expressió diferencial d'alteracions en el metabolisme energètic, en els marcadors d'estrès oxidatiu i en els marcadors de proliferació amb una distribució regional a l'interior de la massa tumoral. En concret, els nostres resultats derivats de l'estudi de gliomes humans indiquen que la major proliferació cel·lular localitzada en la perifèria del tumor està acompanyada d'un millor manteniment de la funció mitocondrial i homeòstasi redox. Tot i que els mitocondris d'ambdues regions presenten característiques estructurals semblants en relació al grau d'abundància cel·lular i diferenciació, la major funcionalitat mitocondrial es troba en la perifèria del tumor, com evidencien un major consum mitocondrial d'oxigen i una major capacitat oxidativa mitocondrial en estat basal. Els nostres resultats mostren també que la pèrdua de funcionalitat mitocondrial a l'interior del glioma es troba vinculada a una major tendència cap a la peroxidació lipídica. Així, encara que en la regió central del tumor glial vàrem observar una activació dels mecanismes antioxidants enzimàtics i no enzimàtics, el dany oxidatiu als components cel·lulars no s'aconsegueix neutralitzar completament.

L'heterogeneïtat intratumoral és, per tant, un factor important a tenir en compte per les seves implicacions en diversos aspectes clínics tals com la caracterització del grau histològic, la resposta terapèutica i la recurrència de la malaltia, i és especialment rellevant en els gliomes (Coons and Johnson, 1993). Per exemple, l'heterogeneïtat intratumoral en els gliomes s'hauria de considerar en la classificació del tumor, ja que

la biòpsia procedeix del centre de la massa tumoral i la presència de subpoblacions de cèl·lules amb diferent grau de malignitat podria comportar errors en la classificació histològica (Coons and Johnson, 1993), i en conseqüència en la pauta de tractament establerta pel pacient. En concret, l'existència de diverses poblacions de cèl·lules canceroses dins la massa tumoral (Singh et al., 2004), fa pensar que aquelles que tinguin una capacitat més agressiva i puguin sobreviure millor en condicions adverses (per exemple, sota la pressió del sistema immunològic o sota la pressió del tractament amb radioteràpia o quimioteràpia) resultaran la població seleccionada, de major malignitat i resistent al tractament convencional (Fu et al., 2009). En les cèl·lules de glioma, l'augment dels sistemes de defensa antioxidant s'ha relacionat amb una incrementada resistència a l'acció de la radioteràpia i quimioteràpia (Lee et al., 2004). Els nostres experiments van demostrar l'existència de diferències en la capacitat oxidativa mitocondrial entre la regió central i perifèrica del glioma, que es trobaven acompanyades per una activació diferencial dels mecanismes antioxidants mitocondrials i cel·lulars. Aquestes diferències en la fisiologia cel·lular observades entre regions individuals del glioma fan pensar que les teràpies estàndard pels gliomes podrien retardar el creixement del tumor a curt termini però facilitar la recurrència a llarg termini, exercint una pressió selectiva *in vivo* que facilitaria la supervivència de la població cel·lular més resistent. En la majoria d'assajos clínics en els que s'han utilitzat anticossos monoclonals o inhibidors de quinases implicades en la desregulació del creixement del glioma, la monoteràpia ha fracassat en mostrar un benefici per la supervivència del pacient (Faivre et al., 2006). Si considerem la coexistència de més d'un fenotip en les cèl·lules canceroses que integren el glioma humà, en principi, seria indicat l'ús d'una politeràpia per tal de poder eliminar de forma més efectiva les diverses poblacions de cèl·lules tumorals. És d'esperar que la major comprensió d'aspectes com és l'heterogeneïtat metabòlica dins un mateix tumor aportin llum a la pregunta de per què pacients diagnosticats de glioma amb un mateix grau histològic tenen evolucions diferents i responen diferent al tractament estàndard.

Com a complement de la caracterització de les diferències en l'estrès oxidatiu en la distribució espacial dintre del tumor sòlid humà. Es va usar un altre model, el càncer colorectal, que resulta apropiat per a l'estudi de les diferències d'estrès oxidatiu associades a la progressió tumoral. S'ha vist que durant la progressió del càncer colorectal en humans es dona un canvi en l'activitat de la superòxid dismutasa citosòlica i mitocondrial, que va acompanyat d'un increment del dany oxidatiu en les proteïnes mitocondrials i de la pèrdua d'activitat dels complexos respiratoris, principalment del complex I (Navarro A et al., 2003). Per altra banda, es sap que en les



primeres etapes del càncer, les cèl·lules canceroses són més sensibles a la quimioteràpia que les cèl·lules normals, però, així com progressa la malaltia, les cèl·lules canceroses perden la seva sensibilitat preferencial als mateixos tractaments (Faivre et al., 2006). Una de les possibles causes que explicaria aquest comportament és l'elevació dels sistemes de defensa antioxidants (Yoshida et al., 2003; Ramanathan et al., 2005).

L'estudi *in vitro* del comportament de les línies d'adenocarcinoma colònic, com l'HT-29, pareix particularment rellevant en la investigació dels mecanismes moleculars de la tumorigènesi (Lesuffleur et al., 1998). Tot i el seu aspecte indiferenciat en un medi ric en glucosa, aquestes cèl·lules exhibeixen algunes propietats interessants com la capacitat de desenvolupar característiques fenotípiques dels enteròcits, quan es cultiven sota baixes concentracions de glucosa i en presència d'un substrat alternatiu (Guzman-Aranguez et al., 2005). En el nostre estudi evidenciem la utilitat del cultiu en condicions de baix contingut de glucosa en presència d'inosina durant 72h per induir l'aturada del cicle cel·lular i l'expressió de característiques fenotípiques i morfològiques pròpies de la cèl·lula enterocítica diferenciada. Els nostres resultats posen de manifest que quan es força la cèl·lula tumoral a usar un substrat que no sigui la glucosa, s'exerceix una pressió selectiva que constitueix un fort estímul apoptòtic, i probablement a través de mecanismes tant adaptatius com selectius, s'obté una població cel·lular amb característiques més diferenciades. Així, l'anàlisi dels canvis que acompanyen a l'adquisició d'un major grau de diferenciació cel·lular indica una reducció de l'estrès oxidatiu mitocondrial i un increment en la capacitat oxidativa i fosforilativa mitocondrial, procés que també va acompanyat d'un augment en el nombre de mitocondris. De forma concomitant es dona un increment dels sistemes enzimàtics antioxidants i una deplecció del glutatió reduït, que és un factor determinant de la menor taxa de proliferació que presenten aquestes cèl·lules en comparació a les cèl·lules més indiferenciades.

Els cultius de cèl·lules humanes de càncer colorectal ens van permetre aprofundir en els mecanismes moleculars subjacents a la regulació de la proliferació cel·lular per estrès oxidatiu i establir el possible paper del mitocondri en la resposta proliferativa de la cèl·lula tumoral, principalment sota els efectes pro-oxidatius induïts per fàrmacs antitumorals. Estudis previs fins a la data, havien relacionat la resposta antioxidant protectora amb els antioxidants solubles com el glutatió i els enzims antioxidants (Benhar et al., 2002). En el nostre model *in vitro*, la caracterització de l'evolució de la resposta adaptativa i del patró d'estrès oxidatiu durant la pèrdua de

diferenciació cel·lular indica que l'activació de la resposta cel·lular adaptativa és característica del tipus cel·lular, i en ella, és important l'expressió i activació de proteïnes no enzimàtiques com les UCPs, que actuarien localment sobre el control de la producció mitocondrial de ROS en les cèl·lules tumorals. Aquestes proteïnes es troben sobreexpressades en les cèl·lules de càncer colorectal, d'acord amb el major grau de disfunció mitocondrial i de nivells intracel·lulars de ROS que presenten, en relació a cèl·lules intestinals més diferenciades. És important assenyalar que aquest patró d'expressió concorda amb el fet que els mitocondris són determinants en la concentració de ROS a l'interior de la cèl·lula tumoral, fet que vàrem posar de manifest exposant aquestes cèl·lules a inhibidors de la cadena de transport electrònic i demostrant un increment significatiu en l'acumulació intracel·lular de ROS.

La investigació dels mitocondris ha revelat dos paradigmes en la biologia cel·lular del tumor. El primer deriva de la recerca pionera d'Otto Warburg, que va descriure que les cèl·lules canceroses freqüentment fan ús del metabolisme glicolític, malgrat disposar de concentracions suficients d'oxigen (Warburg, 1956). El segon paradigma és l'apreciació que l'habilitat de les cèl·lules tumorals per eludir l'apoptosi contribueix al seu potencial replicatiu il·limitat i atenua l'eficàcia de la quimioteràpia (Thompson, 1995). Cada vegada existeix més evidència de que els mitocondris de les cèl·lules tumorals podrien ser importants punts d'intervenció farmacològica (Modica-Napolitano and Singh, 2002). En concret, estudis recents suggereixen que un candidat mitocondrial important en el control de l'apoptosi i quimioresistència en el càncer colorectal podria ser l'UCP2 (Harper et al., 2002; Derdak et al., 2008), i a la vegada, s'ha descrit també que l'UCP5 podria ser important en el control de l'apoptosi induïda per toxicitat oxidativa en el neuroblastoma (Ho et al., 2006). En el present estudi, es van dissenyar experiments per a conèixer la implicació de les UCPs en la mediació de la toxicitat oxidativa dels antitumorals cisplatí i 5-fluorouracil sobre la cèl·lula de càncer colorectal. Donat que fruit dels primers experiments descrits en aquesta tesi havíem vist que en conjunt aquestes proteïnes actuaven com un sistema de defensa antioxidant mitocondrial en les cèl·lules tumorals, a través de la inhibició GDP-dependent de la funció de les UCPs en mitocondris aïllats, i per altra banda, havíem observat que l'expressió de la proteïna mitocondrial UCP5 s'incrementava com a part d'una resposta adaptativa ràpida a estímuls oxidants. La pròxima passa va ser confirmar que l'activitat desacoblant de les UCPs tenia efectes moduladors de la proliferació cel·lular, a tal efecte, ens vàrem centrar en estudiar l'UCP2, per mitjà d'un inhibidor específic de la seva activitat desacoblant (que té la versatilitat de poder-se usar en cèl·lules intactes) com és la genipina. Els nostres resultats revelaren que la

UCP2 conferia citoprotecció en les cèl·lules de càncer colorectal i que l'activitat desacoblant d'aquesta proteïna era rellevant en el control de la producció endògena de ROS d'origen mitocondrial.

Els nostres resultats, a més a més, evidencien que la davallada dels nivells d'UCP2 és important en el mecanisme d'acció del cisplatí. Així, demostrarem que aquest antitumoral convencional, que havia estat clàssicament catalogat per la seva acció sobre l'ADN nuclear, té efectes directes i immediats sobre els mitocondris de les cèl·lules de càncer colorectal. Aquestes observacions estarien d'acord amb estudis previs que proposen l'ADNmt com una diana crítica per l'acció del cisplatí en les cèl·lules d'hepatoma (Zhang et al., 2007) i de carcinoma esquamós de cap i coll (Yang et al., 2006; Cullen et al., 2007). Els nostres experiments evidencien també que el cisplatí estableix altres interaccions amb components de la membrana interna mitocondrial de la cèl·lula tumoral com són la inhibició dels complexos respiratoris i de l'activitat ATPsintasa, que en conjunt amb els canvis anteriorment mencionats en relació a l'UCP2 ocasionen un ràpid increment en el potencial de membrana mitocondrial i en la producció de ROS d'aquests orgànuls. En paral·lel als efectes mitocondrials, el cisplatí inhibeix els sistemes antioxidants enzimàtics, impedit una adequada detoxificació de l'excés de ROS, fet que es manifesta en una ràpida oxidació de components cel·lulars i mitocondrials - com l'ADNmt i cardiolipina. Totes aquestes alteracions probablement exacerben la deficiència respiratòria i faciliten la mort cel·lular, assolint concentracions intracel·lulars de ROS per superen el llindar citotòxic de la cèl·lula tumoral. De fet, l'ús d'antioxidants i desacoblants químics bloqueja la inhibició del creixement induïda per cisplatí.

Els resultats del present estudi també mostren que l'eficàcia d'agents antitumorals que actuen per diferents mecanismes d'acció depèn de la rapidesa en la que provoquen toxicitat oxidativa mitocondrial i desequilibren els sistemes de defensa antioxidant cel·lular. La deplecció de GSH amb L-butionin-(R,S)-sulfoximina (BSO), un inhibidor de la  $\gamma$ -glutamil-cisteïna sintasa, incrementa la mort cel·lular i la resposta citotòxica del cisplatí. Per contra, un augment dels antioxidants solubles com la vitamina C i d'antioxidants precursors del glutatió, com  $\alpha$ -N-acetil-L-cisteïna, incrementen la resistència de les cèl·lules tumorals a la inhibició del creixement cel·lular induïda per cisplatí.

Els experiments efectuats amb el 5-fluorouracil, pel qual les línies cel·lulars estudiades manifesten una major resistència, recolzarien el fet que majors nivells d'expressió de proteïnes mitocondrials UCP2 i UCP5 en les cèl·lules de càncer

colorectal estarien associades a un estat de major quimioresistència, ja que els mecanismes implicats en la sensibilització condueixen a una davallada significativa en els nivells de les dues isoformes. La sensibilització de la cèl·lula tumoral al 5-fluorouracil és complexa ja que implica també la inactivació del factor de transcripció STAT3 i de la quinasa AKT, proteïnes que són sensibles a l'estat redox (Simon et al., 1998; Martindale and Holbrook, 2002; Taylor et al., 2004) i participen en la transducció de senyals, resultant en la promoció de la supervivència cel·lular (Bromberg et al., 1999; Testa and Bellacosa, 2001; Klampfer, 2006).

Per altra banda és important assenyalar que moltes de les propietats benefactores dels flavonoids com el resveratrol s'han atribuït a les propietats antioxidants d'aquestes molècules. Els resultats del present treball mostren que el resveratrol, a dosis farmacològiques, inhibeix el creixement de la cèl·lula cancerosa comportant-se com un agent pro-oxidant, de forma anàlega a altres antitumorals convencionals. A més a més, els nostres resultats mostren que aquesta acció pro-oxidant també és important per sensibilitzar les cèl·lules de càncer colorectal a l'acció del 5-fluorouracil. Així, la teràpia combinada del resveratrol amb 5-fluorouracil induïx la mort cel·lular, disminuint la tolerància que mostren aquestes cèl·lules tumorals a l'estrès oxidatiu induït pel 5-fluorouracil.

## **5. Conclusions**



## 5. CONCLUSIONS

1. Els mitocondris de la regio central i perifèrica del glioma, malgrat presentar característiques estructurals i una abundància similar, difereixen en la seva funcionalitat. Així, en la perifèria del tumor es localitza una major capacitat oxidativa i un major consum d'oxigen en estat basal, que s'acompanya d'un millor manteniment de l'homeòstasi redox i d'una major proliferació cel·lular.
2. La pèrdua de funcionalitat mitocondrial a l'interior del glioma està vinculada a una marcada tendència cap a una major peroxidació lipídica i a l'activació de mecanismes antioxidants enzimàtics i no enzimàtics, que són incapaços de neutralitzar totalment l'oxidació cel·lular. L'existència d'una marcada activació dels sistemes antioxidants en les cèl·lules de l'interior del glioma podria ser un mecanisme subjacent al desenvolupament de resistència tumoral durant la teràpia estàndard aplicada als pacients.
3. La disfunció del metabolisme oxidatiu en les cèl·lules de càncer colorectal s'acompanya d'una elevació dels nivells de ROS i d'una major taxa de proliferació cel·lular. A mesura que augmenta el grau de diferenciació enterocítica, l'abundància i funcionalitat mitocondrial s'incrementen i els nivells intracel·lulars de ROS disminueixen.
4. Les pròpies espècies reactives d'oxigen, a concentracions no citotòxiques, són capaces d'estimular en les cèl·lules de càncer colorectal una resposta antioxidant adaptativa que és característica del tipus cel·lular i que pot implicar tant l'increment de l'activitat d'enzims antioxidants com dels nivells d'antioxidants solubles com el glutatió.
5. El contingut mitocondrial de proteïnes desacoblants s'incrementa en les cèl·lules de càncer colorectal en resposta a estímuls oxidants de forma coordinada amb els sistemes de defensa enzimàtics i no enzimàtics. En les cèl·lules tumorals, la capacitat desacoblant es troba activada i actua com un mecanisme antioxidant controlant la producció mitocondrial de ROS.
6. Els fàrmacs anticancerosos com el cisplatí i 5-fluorouracil, a dosis clínicament rellevants, ocasionen un impacte significatiu sobre l'estructura i funció mitocondrial de les cèl·lules tumorals. El cisplatí causa des de moments inicials alteracions en la composició de la membrana interna mitocondrial i un alentiment del flux electrònic

a través dels complexos respiratoris. Aquestes interaccions faciliten l'increment dels nivells intracel·lulars de ROS i són importants per aturar el creixement cel·lular. La disminució dels nivells de proteïna UCP2 participa en el mecanisme d'acció del cisplatí i ajuda a amplificar l'estrès oxidatiu induït per aquest agent citotòxic. En el mateix sentit, la deplecció dels nivells de proteïnes UCP2 i UCP5 s'acompanya d'estrès oxidatiu citotòxic i permet augmentar la resposta de la cèl·lula tumoral al 5-fluorouracil.

7. L'estat redox cel·lular, així com la resposta immediata al desequilibri oxidatiu generat, determinen l'eficàcia d'agents antitumorals com el cisplatí i 5-fluorouracil. Els moduladors redox que són capaços de potenciar l'acció pro-oxidant dels fàrmacs anticancerosos poden tenir un potencial benefici no només per controlar el creixement de les cèl·lules tumorals sinó per sensibilitzar-les novament a l'acció d'agents antitumorals clàssics.
8. Els antitumorals d'origen natural com el resveratrol promouen la inhibició del creixement de la cèl·lula tumoral actuant com agents pro-oxidants. L'acció pro-oxidant del resveratrol és necessària també quan actua com a sensibilitzant, potenciant la citotoxicitat del 5-fluorouracil sobre les cèl·lules de càncer colorectal.



## **6. Bibliografia**



## 6. BIBLIOGRAFIA

- Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 24:2783-2840.
- Amuthan G, Biswas G, Zhang SY, Klein-Szanto A, Vijayasarathy C, Avadhani NG. 2001. Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *Embo J* 20:1910-1920.
- Anderson CP, Reynolds CP. 2002. Synergistic cytotoxicity of buthionine sulfoximine (BSO) and intensive melphalan (L-PAM) for neuroblastoma cell lines established at relapse after myeloablative therapy. *Bone Marrow Transplant* 30:135-140.
- Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. 1998. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 279:377-380.
- Arias JI, Aller MA, Arias J. 2007. Cancer cell: using inflammation to invade the host. *Mol Cancer* 6:29.
- Arismendi-Morillo GJ, Castejon OJ, Castellano-Ramirez A. 2007. [Ultrastructural features of the synaptic plasticity in peritumoral cerebral oedema in humans]. *Rev Neurol* 45:587-593.
- Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Gubern M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S, Ricquier D. 2000. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* 26:435-439.
- Athar M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL. 2007. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol* 224:274-283.
- Attardi G, Schatz G. 1988. Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 4:289-333.
- Aw TY. 1999. Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine. *Am J Clin Nutr* 70:557-565.
- Backus HH, Pinedo HM, Wouters D, Kuiper CM, Jansen G, van Groeningen CJ, Peters GJ. 2000. Differences in the induction of DNA damage, cell cycle arrest, and cell death by 5-fluorouracil and antifolates. *Oncol Res* 12:231-239.
- Bagrij T, Kralovanszky J, Gyergyay F, Kiss E, Peters GJ. 1993. Influence of uridine treatment in mice on the protection of gastrointestinal toxicity caused by 5-fluorouracil. *Anticancer Res* 13:789-793.

- Bar-Sela G, Haim N. 2004. Abnoba-viscum (mistletoe extract) in metastatic colorectal carcinoma resistant to 5-fluorouracil and leucovorin-based chemotherapy. *Med Oncol* 21:251-254.
- Behrens A, Jochum W, Sibilio M, Wagner EF. 2000. Oncogenic transformation by ras and fos is mediated by c-Jun N-terminal phosphorylation. *Oncogene* 19:2657-2663.
- Benhar M, Dalyot I, Engelberg D, Levitzki A. 2001. Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* 21:6913-6926.
- Benhar M, Engelberg D, Levitzki A. 2002. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep* 3:420-425.
- Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A, Cervellati C. 2004. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Des* 10:1611-1626.
- Bianco R, Ciardiello F, Tortora G. 2005. Chemosensitization by antisense oligonucleotides targeting MDM2. *Curr Cancer Drug Targets* 5:51-56.
- Bing C, Brown M, King P, Collins P, Tisdale MJ, Williams G. 2000. Increased gene expression of brown fat uncoupling protein (UCP)1 and skeletal muscle UCP2 and UCP3 in MAC16-induced cancer cachexia. *Cancer Res* 60:2405-2410.
- Boland CR, Sinicrope FA, Brenner DE, Carethers JM. 2000. Colorectal cancer prevention and treatment. *Gastroenterology* 118:S115-128.
- Bouzier AK, Voisin P, Goodwin R, Canioni P, Merle M. 1998. Glucose and lactate metabolism in C6 glioma cells: evidence for the preferential utilization of lactate for cell oxidative metabolism. *Dev Neurosci* 20:331-338.
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr. 1999. Stat3 as an oncogene. *Cell* 98:295-303.
- Brown NS, Bicknell R. 2001. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res* 3:323-327.
- Brozovic A, Osmak M. 2007. Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. *Cancer Lett* 251:1-16.
- Bru A, Albertos S, Luis Subiza J, Garcia-Asenjo JL, Bru I. 2003. The universal dynamics of tumor growth. *Biophys J* 85:2948-2961.
- Burt RW. 2000. Colon cancer screening. *Gastroenterology* 119:837-853.
- Cadenas E, Boveris A. 1980. Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. *Biochem J* 188:31-37.

- Campo E, Monteagudo C, Castronovo V, Claysmith AP, Fernandez PL, Sobel ME. 1992. Detection of laminin receptor mRNA in human cancer cell lines and colorectal tissues by in situ hybridization. *Am J Pathol* 141:1073-1083.
- Campo E, Munoz J, Miquel R, Palacin A, Cardesa A, Sloane BF, Emmert-Buck MR. 1994. Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patient survival. *Am J Pathol* 145:301-309.
- Capuano F, Guerrieri F, Papa S. 1997. Oxidative phosphorylation enzymes in normal and neoplastic cell growth. *J Bioenerg Biomembr* 29:379-384.
- Capuano F, Varone D, D'Eri N, Russo E, Tommasi S, Montemurro S, Prete F, Papa S. 1996. Oxidative phosphorylation and F(O)F(1) ATP synthase activity of human hepatocellular carcinoma. *Biochem Mol Biol Int* 38:1013-1022.
- Castells A, Bessa X, Daniels M, Ascaso C, Lacy AM, Garcia-Valdecasas JC, Gargallo L, Novell F, Astudillo E, Filella X, Pique JM. 1998. Value of postoperative surveillance after radical surgery for colorectal cancer: results of a cohort study. *Dis Colon Rectum* 41:714-723; discussion 723-714.
- Castells A, Kroser J, Rustgi A. 2000. Gastrointestinal neoplasms. In: Beers M, Berkow R, editors. *The Merck Manual of Geriatrics*. p 1134-1153.
- Clementi E, Nisoli E. 2005. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis: a key to long-term regulation of cellular metabolism. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 142:102-110.
- Conklin KA. 2000. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. *Nutr Cancer* 37:1-18.
- Coons SW, Johnson PC. 1993. Regional heterogeneity in the DNA content of human gliomas. *Cancer* 72:3052-3060.
- Cretney E, Shanker A, Yagita H, Smyth MJ, Sayers TJ. 2006. TNF-related apoptosis-inducing ligand as a therapeutic agent in autoimmunity and cancer. *Immunol Cell Biol* 84:87-98.
- Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. 1987. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 107:526-545.
- Cuezva JM, Krajewska M, de Heredia ML, Krajewski S, Santamaria G, Kim H, Zapata JM, Marusawa H, Chamorro M, Reed JC. 2002. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 62:6674-6681.
- Cullen KJ, Yang Z, Schumaker L, Guo Z. 2007. Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *J Bioenerg Biomembr* 39:43-50.

- Custodio JB, Cardoso CM, Santos MS, Almeida LM, Vicente JA, Fernandes MA. 2009. Cisplatin impairs rat liver mitochondrial functions by inducing changes on membrane ion permeability: prevention by thiol group protecting agents. *Toxicology* 259:18-24.
- Chance B, Sies H, Boveris A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605.
- Chau YP, Shiah SG, Don MJ, Kuo ML. 1998. Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor beta-lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. *Free Radic Biol Med* 24:660-670.
- Chen C, Shen G, Hebbar V, Hu R, Owuor ED, Kong AN. 2003. Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 24:1369-1378.
- Chen CT, Shih YR, Kuo TK, Lee OK, Wei YH. 2008. Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26:960-968.
- Chen N, Nomura M, She QB, Ma WY, Bode AM, Wang L, Flavell RA, Dong Z. 2001. Suppression of skin tumorigenesis in c-Jun NH(2)-terminal kinase-2-deficient mice. *Cancer Res* 61:3908-3912.
- Chen YR, Wang X, Templeton D, Davis RJ, Tan TH. 1996. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem* 271:31929-31936.
- Chiba T, Takahashi S, Sato N, Ishii S, Kikuchi K. 1996. Fas-mediated apoptosis is modulated by intracellular glutathione in human T cells. *Eur J Immunol* 26:1164-1169.
- D'Alessio M, Cerella C, Amici C, Pesce C, Coppola S, Fanelli C, De Nicola M, Cristofanon S, Clavarino G, Bergamaschi A, Magrini A, Gualandi G, Ghibelli L. 2004. Glutathione depletion up-regulates Bcl-2 in BSO-resistant cells. *Faseb J* 18:1609-1611.
- Dahlman A, Wile AG, Burns RG, Mason GR, Johnson FM, Berns MW. 1983. Laser photoradiation therapy of cancer. *Cancer Res* 43:430-434.
- Dang CV, Semenza GL. 1999. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 24:68-72.
- Davis RJ. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103:239-252.
- Davis W, Jr., Ronai Z, Tew KD. 2001. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther* 296:1-6.

- de Bernardo S, Canals S, Casarejos MJ, Solano RM, Menendez J, Mena MA. 2004. Role of extracellular signal-regulated protein kinase in neuronal cell death induced by glutathione depletion in neuron/glia mesencephalic cultures. *J Neurochem* 91:667-682.
- de Bilbao F, Arsenijevic D, Vallet P, Hjelle OP, Ottersen OP, Bouras C, Raffin Y, Abou K, Langhans W, Collins S, Plamondon J, Alves-Guerra MC, Haguenaer A, Garcia I, Richard D, Ricquier D, Giannakopoulos P. 2004. Resistance to cerebral ischemic injury in UCP2 knockout mice: evidence for a role of UCP2 as a regulator of mitochondrial glutathione levels. *J Neurochem* 89:1283-1292.
- de la Asuncion JG, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardo FV, Sastre J, Vina J. 1996. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *Faseb J* 10:333-338.
- DeAtley SM, Aksenov MY, Aksenova MV, Harris B, Hadley R, Cole Harper P, Carney JM, Butterfield DA. 1999. Antioxidants protect against reactive oxygen species associated with adriamycin-treated cardiomyocytes. *Cancer Lett* 136:41-46.
- Debatin K. 2000. Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment. *Toxicol Lett* 112-113:41-48.
- Demple B, Harrison L. 1994. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 63:915-948.
- Deponte M, Urig S, Arscott LD, Fritz-Wolf K, Reau R, Herold-Mende C, Koncarevic S, Meyer M, Davioud-Charvet E, Ballou DP, Williams CH, Jr., Becker K. 2005. Mechanistic studies on a novel, highly potent gold-phosphole inhibitor of human glutathione reductase. *J Biol Chem* 280:20628-20637.
- Derdak Z, Mark NM, Beldi G, Robson SC, Wands JR, Baffy G. 2008. The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells. *Cancer Res* 68:2813-2819.
- Diano S, Matthews RT, Patrylo P, Yang L, Beal MF, Barnstable CJ, Horvath TL. 2003. Uncoupling protein 2 prevents neuronal death including that occurring during seizures: a mechanism for preconditioning. *Endocrinology* 144:5014-5021.
- Dolado I, Swat A, Ajenjo N, De Vita G, Cuadrado A, Nebreda AR. 2007. p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell* 11:191-205.
- Duchen MR. 2004. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* 25:365-451.
- Duval C, Negre-Salvayre A, Dogilo A, Salvayre R, Penicaud L, Casteilla L. 2002. Increased reactive oxygen species production with antisense oligonucleotides

- directed against uncoupling protein 2 in murine endothelial cells. *Biochem Cell Biol* 80:757-764.
- Eastman A. 1991. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Cancer Treat Res* 57:233-249.
- Echtay KS, Murphy MP, Smith RA, Talbot DA, Brand MD. 2002. Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants. *J Biol Chem* 277:47129-47135.
- Echtay KS, Pakay JL, Esteves TC, Brand MD. 2005. Hydroxynonenal and uncoupling proteins: a model for protection against oxidative damage. *Biofactors* 24:119-130.
- Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. 2004. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 64:3892-3899.
- Ellerby HM, Arap W, Ellerby LM, Kain R, Andrusiak R, Rio GD, Krajewski S, Lombardo CR, Rao R, Ruoslahti E, Bredesen DE, Pasqualini R. 1999. Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med* 5:1032-1038.
- Engel RH, Evens AM. 2006. Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. *Front Biosci* 11:300-312.
- Evans P, Halliwell B. 2001. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 85 Suppl 2:S67-74.
- Faivre S, Kroemer G, Raymond E. 2006. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 5:671-688.
- Fariss MW, Chan CB, Patel M, Van Houten B, Orrenius S. 2005. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol Interv* 5:94-111.
- Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, et al. 1990. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247:49-56.
- Feo F, Canuto RA, Garcea R, Gabriel L. 1975. Effect of cholesterol content on some physical and functional properties of mitochondria isolated from adult rat liver, fetal liver, cholesterol-enriched liver and hepatomas AH-130, 3924A and 5123. *Biochim Biophys Acta* 413:116-134.
- Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Montoya J. 2003. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol* 88:41-56.
- Fiordaliso F, Bianchi R, Staszewsky L, Cuccovillo I, Doni M, Laragione T, Salio M, Savino C, Melucci S, Santangelo F, Scanziani E, Masson S, Ghezzi P, Latini R. 2004. Antioxidant treatment attenuates hyperglycemia-induced cardiomyocyte death in rats. *J Mol Cell Cardiol* 37:959-968.



- Fisher RP, Clayton DA. 1988. Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol Cell Biol* 8:3496-3509.
- Fisher RP, Lisowsky T, Parisi MA, Clayton DA. 1992. DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. *J Biol Chem* 267:3358-3367.
- Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, Hutter RV, Kennedy BJ, Murphy GP. 1997. *AJCC cancer staging manual*. 5th ed. Philadelphia:Lippincott-Raven.
- Flier JS, Mueckler MM, Usher P, Lodish HF. 1987. Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. *Science* 235:1492-1495.
- Foot CS. 1984. Mechanisms of photooxygenation. *Prog Clin Biol Res* 170:3-18.
- Fu J, Liu ZG, Liu XM, Chen FR, Shi HL, Pangjese CS, Ng HK, Chen ZP. 2009. Glioblastoma stem cells resistant to temozolomide-induced autophagy. *Chin Med J (Engl)* 122:1255-1259.
- Fulda S, Debatin KM. 2004. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Oncogene* 23:6702-6711.
- Fulda S, Debatin KM. 2005. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by betulinic Acid. *Neoplasia* 7:162-170.
- Gallego MA, Ballot C, Kluza J, Hajji N, Martoriati A, Castera L, Cuevas C, Formstecher P, Joseph B, Kroemer G, Bailly C, Marchetti P. 2008. Overcoming chemoresistance of non-small cell lung carcinoma through restoration of an AIF-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 27:1981-1992.
- Galli S, Antico Arciuch VG, Poderoso C, Converso DP, Zhou Q, Bal de Kier Joffe E, Cadenas E, Boczkowski J, Carreras MC, Poderoso JJ. 2008. Tumor cell phenotype is sustained by selective MAPK oxidation in mitochondria. *PLoS One* 3:e2379.
- Garcia Fernandez M, Troiano L, Moretti L, Nasi M, Pinti M, Salvioli S, Dobrucki J, Cossarizza A. 2002. Early changes in intramitochondrial cardiolipin distribution during apoptosis. *Cell Growth Differ* 13:449-455.
- Gewirtz DA, Hilliker ML, Wilson EN. 2009. Promotion of autophagy as a mechanism for radiation sensitization of breast tumor cells. *Radiother Oncol* 92:323-328.
- Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM. 2001. AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology* 121:198-213.
- Goffart S, Wiesner RJ. 2003. Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp Physiol* 88:33-40.
- Gogvadze V, Zhivotovsky B. 2007. Alteration of mitochondrial function and cell sensitization to death. *J Bioenerg Biomembr* 39:23-30.

- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2:48-58.
- Gottlieb E, Vander Heiden MG, Thompson CB. 2000. Bcl-x(L) prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 20:5680-5689.
- Grant S, Dent P. 2004. Kinase inhibitors and cytotoxic drug resistance. *Clin Cancer Res* 10:2205-2207.
- Gupta A, Rosenberger SF, Bowden GT. 1999. Increased ROS levels contribute to elevated transcription factor and MAP kinase activities in malignantly progressed mouse keratinocyte cell lines. *Carcinogenesis* 20:2063-2073.
- Guzman-Aranguiz A, Olmo N, Turnay J, Lecona E, Perez-Ramos P, Lopez de Silanes I, Lizarbe MA. 2005. Differentiation of human colon adenocarcinoma cells alters the expression and intracellular localization of annexins A1, A2, and A5. *J Cell Biochem* 94:178-193.
- Hadziahmetovic M, Lo SS, Clarke JW, Farace E, Cavaliere R. 2008. Palliative treatment of poor prognosis patients with malignant gliomas. *Expert Rev Anticancer Ther* 8:125-132.
- Halliwell B, Gutteridge J. 1999. *The chemistry of free radicals and related "reactive species"*, Oxford University press ed.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219:1-14.
- Hamilton D, Wu JH, Batist G. 2007. Structure-based identification of novel human gamma-glutamylcysteine synthetase inhibitors. *Mol Pharmacol* 71:1140-1147.
- Hampton MB, Fadeel B, Orrenius S. 1998. Redox regulation of the caspases during apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 854:328-335.
- Han Z, Hong L, Han Y, Wu K, Han S, Shen H, Li C, Yao L, Qiao T, Fan D. 2007. Phospho Akt mediates multidrug resistance of gastric cancer cells through regulation of P-gp, Bcl-2 and Bax. *J Exp Clin Cancer Res* 26:261-268.
- Hardman WE, Munoz J, Jr., Cameron IL. 2002. Role of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in omega 3 fatty acids induced suppression of breast cancer xenograft growth in mice. *Cancer Cell Int* 2:10.
- Harper ME, Antoniou A, Villalobos-Menuey E, Russo A, Trauger R, Vendemelio M, George A, Bartholomew R, Carlo D, Shaikh A, Kupperman J, Newell EW, Bespalov IA, Wallace SS, Liu Y, Rogers JR, Gibbs GL, Leahy JL, Camley RE,

- Melamede R, Newell MK. 2002. Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells. *Faseb J* 16:1550-1557.
- Harper ME, Bevilacqua L, Hagopian K, Weindruch R, Ramsey JJ. 2004. Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling. *Acta Physiol Scand* 182:321-331.
- Heffner JE, Repine JE. 1989. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis* 140:531-554.
- Hentschel SJ, Sawaya R. 2003. Optimizing outcomes with maximal surgical resection of malignant gliomas. *Cancer Control* 10:109-114.
- Hersey P, Zhuang L, Zhang XD. 2006. Current strategies in overcoming resistance of cancer cells to apoptosis melanoma as a model. *Int Rev Cytol* 251:131-158.
- Ho PW, Chu AC, Kwok KH, Kung MH, Ramsden DB, Ho SL. 2006. Knockdown of uncoupling protein-5 in neuronal SH-SY5Y cells: Effects on MPP<sup>+</sup>-induced mitochondrial membrane depolarization, ATP deficiency, and oxidative cytotoxicity. *J Neurosci Res* 84:1358-1366.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75:241-251.
- Horie T, Awazu S, Itakura Y, Fuwa T. 2001. Alleviation by garlic of antitumor drug-induced damage to the intestine. *J Nutr* 131:1071S-1074S.
- Horimoto M, Resnick MB, Konkin TA, Routhier J, Wands JR, Baffy G. 2004. Expression of uncoupling protein-2 in human colon cancer. *Clin Cancer Res* 10:6203-6207.
- Hsu PP, Sabatini DM. 2008. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134:703-707.
- Huppertz C, Fischer BM, Kim YB, Kotani K, Vidal-Puig A, Sliker LJ, Sloop KW, Lowell BB, Kahn BB. 2001. Uncoupling protein 3 (UCP3) stimulates glucose uptake in muscle cells through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem* 276:12520-12529.
- Hwang C, Sinsky AJ, Lodish HF. 1992. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257:1496-1502.
- Hwang JT, Ha J, Park IJ, Lee SK, Baik HW, Kim YM, Park OJ. 2007. Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Lett* 247:115-121.
- Isidoro A, Casado E, Redondo A, Acebo P, Espinosa E, Alonso AM, Cejas P, Hardisson D, Fresno Vara JA, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M, Cuezva JM. 2005. Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* 26:2095-2104.

- Isidoro A, Martinez M, Fernandez PL, Ortega AD, Santamaria G, Chamorro M, Reed JC, Cuezva JM. 2004. Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J* 378:17-20.
- Jabs T. 1999. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem Pharmacol* 57:231-245.
- Jackson AL, Loeb LA. 2001. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res* 477:7-21.
- Jang JH, Surh YJ. 2003. Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function. *Biochem Pharmacol* 66:1371-1379.
- Jiang H, Zhang L, Kuo J, Kuo K, Gautam SC, Groc L, Rodriguez AI, Koubi D, Hunter TJ, Corcoran GB, Seidman MD, Levine RA. 2005. Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. *Mol Cancer Ther* 4:554-561.
- Joshi B, Li L, Taffe BG, Zhu Z, Wahl S, Tian H, Ben-Josef E, Taylor JD, Porter AT, Tang DG. 1999. Apoptosis induction by a novel anti-prostate cancer compound, BMD188 (a fatty acid-containing hydroxamic acid), requires the mitochondrial respiratory chain. *Cancer Res* 59:4343-4355.
- Juan ME, Wenzel U, Ruiz-Gutierrez V, Daniel H, Planas JM. 2006. Olive fruit extracts inhibit proliferation and induce apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr* 136:2553-2557.
- Kaba SE, Kyritsis AP. 1997. Recognition and management of gliomas. *Drugs* 53:235-244.
- Kagan VE, Bayir A, Bayir H, Stoyanovsky D, Borisenko GG, Tyurina YY, Wipf P, Atkinson J, Greenberger JS, Chapkin RS, Belikova NA. 2009. Mitochondria-targeted disruptors and inhibitors of cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes: a new strategy in anti-apoptotic drug discovery. *Mol Nutr Food Res* 53:104-114.
- Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Ord T, Bredesen DE. 1993. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262:1274-1277.
- Kanki T, Nakayama H, Sasaki N, Takio K, Alam TI, Hamasaki N, Kang D. 2004. Mitochondrial nucleoid and transcription factor A. *Ann N Y Acad Sci* 1011:61-68.
- Kanno T, Sato EE, Muranaka S, Fujita H, Fujiwara T, Utsumi T, Inoue M, Utsumi K. 2004. Oxidative stress underlies the mechanism for Ca(2+)-induced permeability transition of mitochondria. *Free Radic Res* 38:27-35.

- Karbowski M, Youle RJ. 2003. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* 10:870-880.
- Ketterer B, Coles B, Meyer DJ. 1983. The role of glutathione in detoxication. *Environ Health Perspect* 49:59-69.
- Kim-Han JS, Reichert SA, Quick KL, Dugan LL. 2001. BMCP1: a mitochondrial uncoupling protein in neurons which regulates mitochondrial function and oxidant production. *J Neurochem* 79:658-668.
- Kim YJ, Lee WS, Ip C, Chae HZ, Park EM, Park YM. 2006. Prx1 suppresses radiation-induced c-Jun NH2-terminal kinase signaling in lung cancer cells through interaction with the glutathione S-transferase Pi/c-Jun NH2-terminal kinase complex. *Cancer Res* 66:7136-7142.
- Klampfer L. 2006. Signal transducers and activators of transcription (STATs): Novel targets of chemopreventive and chemotherapeutic drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 6:107-121.
- Kluza J, Gallego MA, Loyens A, Beauvillain JC, Sousa-Faro JM, Cuevas C, Marchetti P, Bailly C. 2006. Cancer cell mitochondria are direct proapoptotic targets for the marine antitumor drug lamellarin D. *Cancer Res* 66:3177-3187.
- Kodach LL, Bos CL, Duran N, Peppelenbosch MP, Ferreira CV, Hardwick JC. 2006. Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 27:508-516.
- Kowaltowski AJ, Fiskum G. 2005. Redox mechanisms of cytoprotection by Bcl-2. *Antioxid Redox Signal* 7:508-514.
- Kozuch P, Grossbard ML, Barzdins A, Araneo M, Robin A, Frager D, Homel P, Marino J, DeGregorio P, Bruckner HW. 2001. Irinotecan combined with gemcitabine, 5-fluorouracil, leucovorin, and cisplatin (G-FLIP) is an effective and noncrossresistant treatment for chemotherapy refractory metastatic pancreatic cancer. *Oncologist* 6:488-495.
- Kropotov A, Gogvadze V, Shupliakov O, Tomilin N, Serikov VB, Tomilin NV, Zhivotovsky B. 2006. Peroxiredoxin V is essential for protection against apoptosis in human lung carcinoma cells. *Exp Cell Res* 312:2806-2815.
- Kruidering M, Van de Water B, de Heer E, Mulder GJ, Nagelkerke JF. 1997. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J Pharmacol Exp Ther* 280:638-649.
- Laerum OD, Bjerkvig R, Steinsvag SK, de Ridder L. 1984. Invasiveness of primary brain tumors. *Cancer Metastasis Rev* 3:223-236.

- Lamborn KR, Chang SM, Prados MD. 2004. Prognostic factors for survival of patients with glioblastoma: recursive partitioning analysis. *Neuro Oncol* 6:227-235.
- Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA. 1998. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 18:231-236.
- Le Bras M, Clement MV, Pervaiz S, Brenner C. 2005. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol* 20:205-219.
- Le Duc G, Peoc'h M, Remy C, Charpy O, Muller RN, Le Bas JF, Decorps M. 1999. Use of T(2)-weighted susceptibility contrast MRI for mapping the blood volume in the glioma-bearing rat brain. *Magn Reson Med* 42:754-761.
- Lee FY, Li Y, Zhu H, Yang S, Lin HZ, Trush M, Diehl AM. 1999. Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating mice [correction of rat] liver. *Hepatology* 29:677-687.
- Lee HC, Kim DW, Jung KY, Park IC, Park MJ, Kim MS, Woo SH, Rhee CH, Yoo H, Lee SH, Hong SI. 2004. Increased expression of antioxidant enzymes in radioresistant variant from U251 human glioblastoma cell line. *Int J Mol Med* 13:883-887.
- Lee HC, Wei YH. 2005. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol* 37:822-834.
- Lee RA, Kim HA, Kang BY, Kim KH. 2006. Hemoglobin induces colon cancer cell proliferation by release of reactive oxygen species. *World J Gastroenterol* 12:5644-5650.
- Leininger GM, Russell JW, van Golen CM, Berent A, Feldman EL. 2004. Insulin-like growth factor-I regulates glucose-induced mitochondrial depolarization and apoptosis in human neuroblastoma. *Cell Death Differ* 11:885-896.
- Lesuffleur T, Violette S, Vasile-Pandrea I, Dussaulx E, Barbat A, Muleris M, Zweibaum A. 1998. Resistance to high concentrations of methotrexate and 5-fluorouracil of differentiated HT-29 colon-cancer cells is restricted to cells of enterocytic phenotype. *Int J Cancer* 76:383-392.
- Li D, Ueta E, Kimura T, Yamamoto T, Osaki T. 2004. Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. *Cancer Sci* 95:644-650.
- Li F, Meng L, Zhou J, Xing H, Wang S, Xu G, Zhu H, Wang B, Chen G, Lu YP, Ma D. 2005. Reversing chemoresistance in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells: a role of c-Jun NH2-terminal kinase 1. *Biochem Biophys Res Commun* 335:1070-1077.

- Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS. 2006. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 5:67.
- Longley DB, Johnston PG. 2005. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* 205:275-292.
- Lu SC. 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *Faseb J* 13:1169-1183.
- Luo Y, Levenson JD. 2005. New opportunities in chemosensitization and radiosensitization: modulating the DNA-damage response. *Expert Rev Anticancer Ther* 5:333-342.
- Lyons SA, Chung WJ, Weaver AK, Ogunrinu T, Sontheimer H. 2007. Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion. *Cancer Res* 67:9463-9471.
- Mahyar-Roemer M, Kohler H, Roemer K. 2002. Role of Bax in resveratrol-induced apoptosis of colorectal carcinoma cells. *BMC Cancer* 2:27.
- Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. 2003. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J Biol Chem* 278:9100-9106.
- Martindale JL, Holbrook NJ. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192:1-15.
- Martinez R, Janka M, Soldner F, Behr R. 2007. Gross-total resection of malignant gliomas in elderly patients: implications in survival. *Zentralbl Neurochir* 68:176-181.
- Martins NM, Santos NA, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. 2008. Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. *J Appl Toxicol* 28:337-344.
- Masuda H, Tanaka T, Takahama U. 1994. Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun* 203:1175-1180.
- Mattiasson G, Shamloo M, Gido G, Mathi K, Tomasevic G, Yi S, Warden CH, Castilho RF, Melcher T, Gonzalez-Zulueta M, Nikolich K, Wieloch T. 2003. Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med* 9:1062-1068.
- Mattiasson G, Sullivan PG. 2006. The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics. *Antioxid Redox Signal* 8:1-38.
- McCarthy S, Somayajulu M, Sikorska M, Borowy-Borowski H, Pandey S. 2004. Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death; neuroprotection by water-soluble Coenzyme Q10. *Toxicol Appl Pharmacol* 201:21-31.

- Mehta MP, Rodrigus P, Terhaard CH, Rao A, Suh J, Roa W, Souhami L, Bezjak A, Leibenhaut M, Komaki R, Schultz C, Timmerman R, Curran W, Smith J, Phan SC, Miller RA, Renschler MF. 2003. Survival and neurologic outcomes in a randomized trial of motexafin gadolinium and whole-brain radiation therapy in brain metastases. *J Clin Oncol* 21:2529-2536.
- Meiler J, Schuler M. 2006. Therapeutic targeting of apoptotic pathways in cancer. *Curr Drug Targets* 7:1361-1369.
- Meredith MJ, Reed DJ. 1982. Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J Biol Chem* 257:3747-3753.
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE, Jr. 1980. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 15:575-591.
- Modica-Napolitano JS, Aprille JR. 1987. Basis for the selective cytotoxicity of rhodamine 123. *Cancer Res* 47:4361-4365.
- Modica-Napolitano JS, Singh KK. 2002. Mitochondria as targets for detection and treatment of cancer. *Expert Rev Mol Med* 4:1-19.
- Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH, Veeder MH, Mailliard JA. 1995. Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report. *Ann Intern Med* 122:321-326.
- Monzon MJ, Pascual-Piazuelo MC, Lopez-Lopez A, Calatayud V, Eiras J. 1996. [Incidence of glioblastoma multiforme in Aragon and La Rioja. An epidemiological survey]. *Rev Neurol* 24:73-76.
- Nagane M, Levitzki A, Gazit A, Cavenee WK, Huang HJ. 1998. Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5724-5729.
- Navarro A, Moreno P, Boveris A. 2003. Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en la progresión del cáncer de colon y recto en humanos. *Antioxid Calidad Vida* 10:1-5.
- Nebeling LC, Miraldi F, Shurin SB, Lerner E. 1995. Effects of a ketogenic diet on tumor metabolism and nutritional status in pediatric oncology patients: two case reports. *J Am Coll Nutr* 14:202-208.
- Negre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Trolly M, Salvayre R, Penicaud L, Casteilla L. 1997. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Faseb J* 11:809-815.



- Nelson H, Petrelli N, Carlin A, Couture J, Fleshman J, Guillem J, Miedema B, Ota D, Sargent D. 2001. Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J Natl Cancer Inst* 93:583-596.
- Nemoto S, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Finkel T. 2000. Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Mol Cell Biol* 20:7311-7318.
- Neupert W. 1997. Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 66:863-917.
- Nicholls DG, Locke RM. 1984. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 64:1-64.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404:787-790.
- Nisoli E, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. 2004. Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework. *Biochem Pharmacol* 67:1-15.
- Nkabyo YS, Ziegler TR, Gu LH, Watson WH, Jones DP. 2002. Glutathione and thioredoxin redox during differentiation in human colon epithelial (Caco-2) cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G1352-1359.
- Nohl H, Hegner D. 1978. Evidence for the existence of catalase in the matrix space of rat-heart mitochondria. *FEBS Lett* 89:126-130.
- Nubel T, Ricquier D. 2006. Respiration under control of uncoupling proteins: Clinical perspective. *Horm Res* 65:300-310.
- O'Connell MJ, Laurie JA, Kahn M, Fitzgibbons RJ, Jr., Erlichman C, Shepherd L, Moertel CG, Kocha WI, Pazdur R, Wieand HS, Rubin J, Vukov AM, Donohue JH, Krook JE, Figueredo A. 1998. Prospectively randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy in patients with high-risk colon cancer. *J Clin Oncol* 16:295-300.
- O'Dwyer PJ, Hamilton TC, LaCreta FP, Gallo JM, Kilpatrick D, Halbherr T, Brennan J, Bookman MA, Hoffman J, Young RC, Comis RL, Ozols RF. 1996. Phase I trial of buthionine sulfoximine in combination with melphalan in patients with cancer. *J Clin Oncol* 14:249-256.
- Ohmichi M, Hayakawa J, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y. 2005. Mechanisms of platinum drug resistance. *Trends Pharmacol Sci* 26:113-116.
- Okuda M, Lee HC, Kumar C, Chance B. 1992. Comparison of the effect of a mitochondrial uncoupler, 2,4-dinitrophenol and adrenaline on oxygen radical production in the isolated perfused rat liver. *Acta Physiol Scand* 145:159-168.

- Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA, Dang CV. 2000. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* 275:21797-21800.
- Oudard S, Boitier E, Miccoli L, Rousset S, Dutrillaux B, Poupon MF. 1997. Gliomas are driven by glycolysis: putative roles of hexokinase, oxidative phosphorylation and mitochondrial ultrastructure. *Anticancer Res* 17:1903-1911.
- Papa S, Skulachev VP. 1997. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem* 174:305-319.
- Parisi MA, Clayton DA. 1991. Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science* 252:965-969.
- Pascual-Piazuelo M, Bestue M, Serrano-Ponz M. 2002a. [Epidemiological study of oligodendrogliomas in Aragon and La Rioja]. *Rev Neurol* 34:997-998.
- Pascual-Piazuelo MC, Serrano-Ponz M, Bestue M, Montori-Lasilla M. 2002b. [An epidemiological study of astrocytomas in Aragon and La Rioja]. *Rev Neurol* 34:799-800.
- Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Levi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, Ricquier D, Bouillaud F, Miroux B. 2001. Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* 276:8705-8712.
- Pedersen PL. 1978. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog Exp Tumor Res* 22:190-274.
- Pegram MD, Lopez A, Konecny G, Slamon DJ. 2000. Trastuzumab and chemotherapeutics: drug interactions and synergies. *Semin Oncol* 27:21-25; discussion 92-100.
- Petersen VC, Baxter KJ, Love SB, Shepherd NA. 2002. Identification of objective pathological prognostic determinants and models of prognosis in Dukes' B colon cancer. *Gut* 51:65-69.
- Petrosillo G, Ruggiero FM, Pistolese M, Paradies G. 2004. Ca<sup>2+</sup>-induced reactive oxygen species production promotes cytochrome c release from rat liver mitochondria via mitochondrial permeability transition (MPT)-dependent and MPT-independent mechanisms: role of cardiolipin. *J Biol Chem* 279:53103-53108.
- Pineda-Molina E, Klatt P, Vazquez J, Marina A, Garcia de Lacoba M, Perez-Sala D, Lamas S. 2001. Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding. *Biochemistry* 40:14134-14142.

- Poh TW, Pervaiz S. 2005. LY294002 and LY303511 sensitize tumor cells to drug-induced apoptosis via intracellular hydrogen peroxide production independent of the phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway. *Cancer Res* 65:6264-6274.
- Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E. 2004. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem* 11:1163-1182.
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. 1997. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389:300-305.
- Preston TJ, Abadi A, Wilson L, Singh G. 2001. Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: potential for drug development. *Adv Drug Deliv Rev* 49:45-61.
- Ramanathan B, Jan KY, Chen CH, Hour TC, Yu HJ, Pu YS. 2005. Resistance to paclitaxel is proportional to cellular total antioxidant capacity. *Cancer Res* 65:8455-8460.
- Rappa G, Gamcsik MP, Mitina RL, Baum C, Fodstad O, Lorico A. 2003. Retroviral transfer of MRP1 and gamma-glutamyl cysteine synthetase modulates cell sensitivity to L-buthionine-S,R-sulphoximine (BSO): new rationale for the use of BSO in cancer therapy. *Eur J Cancer* 39:120-128.
- Real PJ, Sierra A, De Juan A, Segovia JC, Lopez-Vega JM, Fernandez-Luna JL. 2002. Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells. *Oncogene* 21:7611-7618.
- Robertson JD, Zhivotovsky B, Gogvadze V, Orrenius S. 2003. Outer mitochondrial membrane permeabilization: an open-and-shut case? *Cell Death Differ* 10:485-487.
- Roovers K, Assoian RK. 2000. Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays* 22:818-826.
- Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, Ricquier D. 2004. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 53 Suppl 1:S130-135.
- Rustgi AK. 1994. Hereditary gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes. *N Engl J Med* 331:1694-1702.
- Rustin P. 2002. Mitochondria, from cell death to proliferation. *Nat Genet* 30:352-353.
- Salomon AR, Voehringer DW, Herzenberg LA, Khosla C. 2000. Understanding and exploiting the mechanistic basis for selectivity of polyketide inhibitors of F(0)F(1)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14766-14771.
- Samudio I, Fiegl M, Andreeff M. 2009. Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Res* 69:2163-2166.

- Sanchis D, Fleury C, Chomiki N, Gubern M, Huang Q, Neverova M, Gregoire F, Easlick J, Raimbault S, Levi-Meyrueis C, Miroux B, Collins S, Seldin M, Richard D, Warden C, Bouillaud F, Ricquier D. 1998. BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J Biol Chem* 273:34611-34615.
- Santandreu FM, Brell M, Gene AH, Guevara R, Oliver J, Couce ME, Roca P. 2008. Differences in mitochondrial function and antioxidant systems between regions of human glioma. *Cell Physiol Biochem* 22:757-768.
- Santandreu FM, Valle A, Fernandez de Mattos S, Roca P, Oliver J. 2009. Hydrogen peroxide regulates the mitochondrial content of uncoupling protein 5 in colon cancer cells. *Cell Physiol Biochem* 24:379-390.
- Sanvicens N, Gomez-Vicente V, Masip I, Messeguer A, Cotter TG. 2004. Oxidative stress-induced apoptosis in retinal photoreceptor cells is mediated by calpains and caspases and blocked by the oxygen radical scavenger CR-6. *J Biol Chem* 279:39268-39278.
- Sasahara M, Nishi M, Kawashima H, Ueda K, Sakagashira S, Furuta H, Matsumoto E, Hanabusa T, Sasaki H, Nanjo K. 2004. Uncoupling protein 2 promoter polymorphism -866G/A affects its expression in beta-cells and modulates clinical profiles of Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53:482-485.
- Sato T, Machida T, Takahashi S, Iyama S, Sato Y, Kuribayashi K, Takada K, Oku T, Kawano Y, Okamoto T, Takimoto R, Matsunaga T, Takayama T, Takahashi M, Kato J, Niitsu Y. 2004. Fas-mediated apoptosome formation is dependent on reactive oxygen species derived from mitochondrial permeability transition in Jurkat cells. *J Immunol* 173:285-296.
- Scandalios JG. 2002. Oxidative stress responses--what have genome-scale studies taught us? *Genome Biol* 3:REVIEWS1019.
- Schmidt-Mende J, Gogvadze V, Hellstrom-Lindberg E, Zhivotovsky B. 2006. Early mitochondrial alterations in ATRA-induced cell death. *Cell Death Differ* 13:119-128.
- Seyfried TN, Mukherjee P. 2005. Targeting energy metabolism in brain cancer: review and hypothesis. *Nutr Metab (Lond)* 2:30.
- Shadel GS, Clayton DA. 1997. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem* 66:409-435.
- Shapiro JR, Shapiro WR. 1985. The subpopulations and isolated cell types of freshly resected high grade human gliomas: their influence on the tumor's evolution in vivo and behavior and therapy in vitro. *Cancer Metastasis Rev* 4:107-124.

- Shen H, Kauvar L, Tew KD. 1997. Importance of glutathione and associated enzymes in drug response. *Oncol Res* 9:295-302.
- Shiah SG, Chuang SE, Chau YP, Shen SC, Kuo ML. 1999. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase and subsequent CPP32/Yama during topoisomerase inhibitor beta-lapachone-induced apoptosis through an oxidation-dependent pathway. *Cancer Res* 59:391-398.
- Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215:213-219.
- Sies H, Stahl W. 1995. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 62:1315S-1321S.
- Simon AR, Rai U, Fanburg BL, Cochran BH. 1998. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am J Physiol* 275:C1640-1652.
- Singal PK, Iliskovic N, Li T, Kumar D. 1997. Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *Faseb J* 11:931-936.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432:396-401.
- Sinha AK, Anand S, Ortel BJ, Chang Y, Mai Z, Hasan T, Maytin EV. 2006. Methotrexate used in combination with aminolaevulinic acid for photodynamic killing of prostate cancer cells. *Br J Cancer* 95:485-495.
- Skulachev VP. 1998. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1363:100-124.
- Sminia P, Kuipers G, Geldof A, Lafleur V, Slotman B. 2005. COX-2 inhibitors act as radiosensitizer in tumor treatment. *Biomed Pharmacother* 59 Suppl 2:S272-275.
- Sohn KJ, Croxford R, Yates Z, Lucock M, Kim YI. 2004. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *J Natl Cancer Inst* 96:134-144.
- Sonveaux P, Vegran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, De Saedeleer CJ, Kennedy KM, Diepart C, Jordan BF, Kelley MJ, Gallez B, Wahl ML, Feron O, Dewhirst MW. 2008. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* 118:3930-3942.
- Soubannier V, McBride HM. 2009. Positioning mitochondrial plasticity within cellular signaling cascades. *Biochim Biophys Acta* 1793:154-170.
- Stocker R, Bowry VW, Frei B. 1991. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1646-1650.

- Sun AS, Sepkowitz K, Geller SA. 1981. A study of some mitochondrial and peroxisomal enzymes in human colonic adenocarcinoma. *Lab Invest* 44:13-17.
- Sun X, Wray C, Tian X, Hasselgren PO, Lu J. 2003. Expression of uncoupling protein 3 is upregulated in skeletal muscle during sepsis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E512-520.
- Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. 2006. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5:219-234.
- Szatrowski TP, Nathan CF. 1991. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 51:794-798.
- Szewczyk A, Wojtczak L. 2002. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev* 54:101-127.
- Takamatsu C, Umeda S, Ohsato T, Ohno T, Abe Y, Fukuoh A, Shinagawa H, Hamasaki N, Kang D. 2002. Regulation of mitochondrial D-loops by transcription factor A and single-stranded DNA-binding protein. *EMBO Rep* 3:451-456.
- Taylor JM, Crack PJ, Gould JA, Ali U, Hertzog PJ, Iannello RC. 2004. Akt phosphorylation and NFkappaB activation are counterregulated under conditions of oxidative stress. *Exp Cell Res* 300:463-475.
- Teshima Y, Akao M, Jones SP, Marban E. 2003. Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res* 93:192-200.
- Testa JR, Bellacosa A. 2001. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10983-10985.
- Tews DS. 1999. Cell death and oxidative stress in gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25:272-284.
- Thomas H, Coley HM. 2003. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* 10:159-165.
- Thompson CB. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.
- Tinhofer I, Bernhard D, Senfter M, Anether G, Loeffler M, Kroemer G, Kofler R, Csordas A, Greil R. 2001. Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes, induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2. *Faseb J* 15:1613-1615.
- Tiranti V, Savoia A, Forti F, D'Apolito MF, Centra M, Rocchi M, Zeviani M. 1997. Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Hum Mol Genet* 6:615-625.

- Tobiome K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T, Ichijo H. 2001. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2:222-228.
- Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ. 2000. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288:870-874.
- Troyano A, Fernandez C, Sancho P, de Blas E, Aller P. 2001. Effect of glutathione depletion on antitumor drug toxicity (apoptosis and necrosis) in U-937 human promonocytic cells. The role of intracellular oxidation. *J Biol Chem* 276:47107-47115.
- Tsai CM, Levitzki A, Wu LH, Chang KT, Cheng CC, Gazit A, Perng RP. 1996. Enhancement of chemosensitivity by tyrphostin AG825 in high-p185(neu) expressing non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 56:1068-1074.
- van Haaften RI, Haenen GR, Evelo CT, Bast A. 2003. Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. *Drug Metab Rev* 35:215-253.
- Van Houten B, Woshner V, Santos JH. 2006. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* 5:145-152.
- Van Meter TE, Broaddus WC, Cash D, Fillmore H. 2006. Cotreatment with a novel phosphoinositide analogue inhibitor and carmustine enhances chemotherapeutic efficacy by attenuating AKT activity in gliomas. *Cancer* 107:2446-2454.
- Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szczepanik A, Wade J, Mootha V, Cortright R, Muoio DM, Lowell BB. 2000. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem* 275:16258-16266.
- Viktorsson K, Lewensohn R, Zhivotovsky B. 2005. Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies. *Adv Cancer Res* 94:143-196.
- Vincent MA, Clerk LH, Lindner JR, Klibanov AL, Clark MG, Rattigan S, Barrett EJ. 2004. Microvascular recruitment is an early insulin effect that regulates skeletal muscle glucose uptake in vivo. *Diabetes* 53:1418-1423.
- Votyakova TV, Reynolds IJ. 2001. DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* 79:266-277.
- Wang D, Lippard SJ. 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4:307-320.
- Warburg O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science* 123:309-314.
- Weckbecker G. 1991. Biochemical pharmacology and analysis of fluoropyrimidines alone and in combination with modulators. *Pharmacol Ther* 50:367-424.

- Weiss SJ. 1986. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand Suppl* 548:9-37.
- Wenzel U, Nickel A, Daniel H. 2005. Increased mitochondrial palmitoylcarnitine/carnitine countertransport by flavone causes oxidative stress and apoptosis in colon cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 62:3100-3105.
- Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Waye JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF, et al. 1993. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 329:1977-1981.
- Winston GW. 1990. Physicochemical basis for free radical formation in cells: production and defenses. In: *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimatization Mechanisms*, Wilwy-Liss, Inc ed. p 57-86.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98:115-124.
- Yaffe MP. 1999. The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science* 283:1493-1497.
- Yamada S, Isojima Y, Yamatodani A, Nagai K. 2003. Uncoupling protein 2 influences dopamine secretion in PC12h cells. *J Neurochem* 87:461-469.
- Yamanaka K, Rocchi P, Miyake H, Fazli L, Vessella B, Zangemeister-Wittke U, Gleave ME. 2005. A novel antisense oligonucleotide inhibiting several antiapoptotic Bcl-2 family members induces apoptosis and enhances chemosensitivity in androgen-independent human prostate cancer PC3 cells. *Mol Cancer Ther* 4:1689-1698.
- Yang Z, Schumaker LM, Egorin MJ, Zuhowski EG, Guo Z, Cullen KJ. 2006. Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. *Clin Cancer Res* 12:5817-5825.
- Yoshida Y, Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Itoh H, Kang D, Kohno K. 2003. P53 physically interacts with mitochondrial transcription factor A and differentially regulates binding to damaged DNA. *Cancer Res* 63:3729-3734.
- Yu HG, Ai YW, Yu LL, Zhou XD, Liu J, Li JH, Xu XM, Liu S, Chen J, Liu F, Qi YL, Deng Q, Cao J, Liu SQ, Luo HS, Yu JP. 2008. Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway plays an important role in chemoresistance of gastric cancer cells against etoposide and doxorubicin induced cell death. *Int J Cancer* 122:433-443.



- Yu XX, Mao W, Zhong A, Schow P, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan G. 2000. Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation. *Faseb J* 14:1611-1618.
- Zhang H, Mizumachi T, Carcel-Trullols J, Li L, Naito A, Spencer HJ, Spring PM, Smoller BR, Watson AJ, Margison GP, Higuchi M, Fan CY. 2007. Targeting human 8-oxoguanine DNA glycosylase (hOGG1) to mitochondria enhances cisplatin cytotoxicity in hepatoma cells. *Carcinogenesis* 28:1629-1637.
- Zhao K, Zhao GM, Wu D, Soong Y, Birk AV, Schiller PW, Szeto HH. 2004. Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *J Biol Chem* 279:34682-34690.



## **7. Annex**



**MANUSCRIT VI**

**Metabolic differences in different regions of glioma samples.**

Santandreu, F.M.; Oliver, J.; Roca, P.

Manuscrit.



**MANUSCRIT VII**

**Implications of oxidative stress and mitochondrial damage in the response of colon cancer cells to cisplatin.**

Santandreu, F.M.; Oliver, J.; Roca, P.

*Free Radicals, Health and Lifestyle*. Monduzzi Editore International Proceedings Division. 115-120. 2009. ISBN 978 88 7587 515 2.





**MANUSCRIT VIII**

**Resveratrol enhances 5-fluorouracil and cisplatin cytotoxicity in cdlon cancer cells.**

Santandreu, F.M.; Oliver, J.; Roca, P.

*Free Radicals, Health and Lifestyle.* Monduzzi Editore International Proceedings Division. 121-126. 2009. ISBN 978 88 7587 515 2.



**MANUSCRIT IX**

**Sex-dependent differences in old rat brain mitochondrial function and oxidative stress.**

Guevara, R.; Santandreu, F.M.; Valle, A.; Gianotti, M.; Oliver, J.; Roca, P.

*Free Radic Biol Med* 2009; 46(2): 169-175.

[DOI:10.1016/J.FREERADBIOMED.2008.09.035](https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2008.09.035)





**MANUSCRIT X**

**The serum levels of 17 $\beta$ -estradiol, progesterone and triiodothyronine correlate with brown adipose tissue thermogenic parameters during aging.**

Valle, A.; Santandreu F.M.; Garcia-Palmer, F.J.; Roca, P.; Oliver, J.

*Cell Physiol Biochem* 2008; 22(1-4): 337-346.

DOI: 10.1159/000149812







