



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR E HISTOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

INFLUENCIA DEL METABOLISMO DEL GLUTATIÓN Y DE LA ACTIVIDAD GAMMA-
GLUTAMILTRANSPEPTIDASA EN LA RESPUESTA ANTITUMORAL DEL ÁCIDO
RETINOICO EN LÍNEAS TUMORALES DE RABDOMIOSARCOMA CON DIFERENTE
GRADO DE DIFERENCIACIÓN

María Begoña Castro Feo

Leioa, 2006

ISBN: 978-84-9860-150-3

INFLUENCIA DEL METABOLISMO DEL GLUTATIÓN Y DE LA ACTIVIDAD GAMMA-
GLUTAMILTRANSEPTIDASA EN LA RESPUESTA ANTITUMORAL DEL ÁCIDO
RETINOICO EN LÍNEAS TUMORALES DE RABDOMIOSARCOMA CON DIFERENTE
GRADO DE DIFERENCIACIÓN

María Begoña Castro Feo

Leioa, 2006

Directores de Tesis

Dra. Ana Isabel Alonso Varona

Dr. Teodoro Palomares Casado

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO / EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR E HISTOLOGÍA

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a las ayudas económicas de una Beca predoctoral de la UPV/EHU, Subvención General a Grupos de Investigación de la UPV/EHU y a la Fundación Gangoiti Barrera. Asimismo, se agradece la colaboración del animalario perteneciente a la UPV/EHU.

A mis padres Candelas y Jose Mari

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a

Mis directores, la Doctora Ana Alonso y el Doctor Teodoro Palomares por su asesoramiento, tiempo dedicado, su paciencia, las interminables horas de discusiones científicas, por aceptar emprender una nueva aventura juntos y por su amistad.

Mi amiga Maite, porque sin ella la realización de esta Tesis no habría sido lo mismo, por su capacidad de aguantarme, por su increíble disposición en todo momento, por su apoyo incondicional y por los gratísimos momentos que pasamos juntas.

Mi amiga Loli, por poder contar siempre con ella, por su asesoramiento, por hacer las cosas más fáciles y por continuar conmigo.

Mis amigos del laboratorio, Lorea, Miren, Josune, Billy, Olga, Marco, Elvira por los buenos ratos que hemos pasado y seguimos pasando juntos.

Mis compañeros del Instituto Curie en París, Florence, Francis, Rui, Laurence por aceptarme como parte de su equipo y su familia y especialmente a la Doctora Marie France Poupon, por su asesoramiento, su gran humanidad y su especial cariño.

Los Profesores y PAS del Departamento, a Mila y Marijose, por su ayuda en todo momento, por habernos reído tanto.

Mis compañeros de la Comarca Uribe de Sanidad, por su inestimable ayuda, respaldo, afecto, por el gratísimo ambiente de trabajo que me proporcionaron y por continuar contando conmigo.

Mis amigos de la Biokabi, por su apoyo, su alegría, su energía, su cariño y por los buenos momentos que pasamos juntos.

A Marta, Julio y todos los Noraybio, porque han confiado en mi para iniciar una nueva aventura, por su inestimable apoyo diario y su gran afecto.

Por último, los más importantes, quisiera dar las gracias a mis amigas, por estar pendientes de mi en los momentos difíciles, sus ánimos e interés, por entender mis ausencias, por estar siempre a mi lado y por los buenísimos momentos que pasamos juntas.

A mi familia y a la de Pedro, por poder contar con ellos en todo momento y por su cariño. A Xavier y Aitor por ser una nueva alegría en mi vida.

A Pedro, por estar ahí siempre, por aguantar mis cambios de humor, estrés, preocupaciones, mis interminables jornadas de trabajo. Gracias por tu paciencia, por tu cariño y por haber decidido estar a mi lado.

Especialmente, a mis padres (Cande y Jose Mari), por ser mi soporte, por su apoyo incondicional, por su ilusión en esta Tesis y en mi trabajo, por su ayuda, por hacerme la vida más fácil a su lado, por la alegría que me dan día a día, por lo que me cuidan y me quieren, por ser como sois. MUCHAS GRACIAS POR TODO.

ÍNDICE

II. 3. 3. 7. Radioprotección	34
II. 3. 3. 8. Detoxificación	34
II. 3. 4. Modulación de los niveles de glutatión	35
II. 3. 4. 1. Agentes que incrementan los niveles de GSH	35
II. 3. 4. 2. Agentes que disminuyen los niveles de GSH.....	39
II. 3. 5. Glutatión y patología	41
II. 3. 5. 1. Influencia de glutatión en la patología no tumoral.....	41
II. 3. 5. 2. Glutatión y patología tumoral.....	42
II. 4. La enzima γ-glutamiltanspeptidasa (GGT)	43
II. 5. Agentes inductores de la diferenciación celular. Los retinoides	46
II. 5. 1. Mecanismos de acción	47
II. 5. 2. Los receptores de los retinoides	48
II. 5. 3. Efectos celulares de los retinoides.....	50
II. 5. 4. Aplicación de retinoides en la terapia antitumoral.....	51
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	57
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	61
IV. 1. Experimentación in vitro	61
IV. 1. 1. Células tumorales.....	61
IV. 1. 1. 1. Obtención y origen de las células tumorales	61
IV. 1. 1. 2. Cultivo de las células tumorales	62
IV. 1. 2. Fármacos.....	63
IV. 1. 2. 1. Acroleína.....	63
IV. 1. 2. 2. L-butionina-[S,R]-sulfoximina	63
IV. 1. 2. 3. Ácido transretinoico (ATRA)	64
IV. 1. 2. 4. Acivicina.....	64

IV. 1. 3. Procedimientos experimentales.....	65
IV. 1. 3. 1. Determinación de la expresión de miogenina.....	65
IV. 1. 3. 2. Determinación de la proliferación celular	66
IV. 1. 3. 3. Determinación de los niveles intracelulares de glutatión de las células tumorales	66
IV. 1. 3. 4. Determinación de la apoptosis en las células tumorales	70
IV. 1. 3. 5. Determinación de la enzima γ -glutamiltanspeptidasa .	71
IV. 1. 3. 6. Determinación de metabolitos reactivos del oxígeno...	73
IV. 2. Experimentación in vivo	74
IV. 2. 1. Animales	74
IV. 2. 2. Fármacos	74
IV. 2. 2. 1. Ciclofosfamida.....	74
IV. 2. 2. 2. L-butionina-[S,R]-sulfoximina	75
IV. 2. 2. 3. Ácido transretinoico (ATRA)	75
IV. 2. 3. Procedimiento experimentales.....	76
IV. 2. 3. 1. Inoculación de las células tumorales	76
IV. 2. 3. 2. Determinación de la capacidad tumorigénica de las células S4MH y F21	76
IV. 2. 3. 2. 1. Determinación de la capacidad tumorigénica de las células tratadas <i>in vitro</i> con BSO y ATRA solos y en combinación.....	76
IV. 2. 3. 2. 2. Determinación del efecto sobre la capacidad tumorigénica del tratamiento <i>in vivo</i> de los animales con CY, BSO y ATRA, solos y en combinación	77

IV. 2. 3. 3. Determinación de la capacidad metastática de las células tumorales en animales tratados con CY, BSO y ATRA solos y combinados	79
IV. 2. 3. 4. Evaluación de la toxicidad producida por los tratamientos <i>in vivo</i>	79
IV. 3. Análisis estadístico.....	81
V. RESULTADOS.....	85
V. 1. RESULTADOS <i>IN VITRO</i>	87
V. 1. 1. Estudio de grado de diferenciación de las células S4MH y F21	89
V. 1. 2. Efecto producido por el ATRA sobre la diferenciación de las células S4MH Y F21	90
V. 1. 3. Niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21	91
V. 1. 3. 1. Niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21 controles	91
V. 1. 3. 2. Estudio del efecto del BSO, ATRA y acivicina solos y en combinación, sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21	92
V. 1. 3. 2. 1. Efecto del BSO sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21	92
V. 1. 3. 2. 2. Efecto del ATRA sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21	94
V. 1. 3. 2. 3. Efecto de la acivicina sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21	96
V. 1. 3. 2. 4. Efecto del tratamiento combinado BSO+acivicina sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21	97

V. 1. 3. 2. 5. Efecto del tratamiento combinado BSO+ ATRA sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21	98
V. 1. 3. 3. Estudio del efecto producido por la acroleína (AC) sola y en combinación con ATRA y BSO, sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21	100
V. 1. 3. 3. 1. Efecto de la AC sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21 ...	100
V. 1. 3. 3. 2. Efecto del tratamiento combinado de AC+BSO sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21	102
V. 1. 3. 3. 3. Efecto del tratamiento combinado de AC+ATRA sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21	104
V. 1. 3. 3. 4. Efecto del tratamiento combinado de AC+BSO+ATRA sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21	106
V. 1. 4. Actividad del enzima γ-glutamiltanspeptidasa (GGT).....	108
V. 1. 4. 1. Actividad GGT de las células S4MH F21 controles	108
V. 1. 4. 2. Estudio del efecto del BSO, ATRA y acivicina, sobre la actividad de la enzima GGT en las células S4MH y F21	109
V. 1. 4. 2. 1. Estudio del efecto de la acivicina sobre la actividad de la enzima GGT en las células S4MH y F21	109
V. 1. 4. 2. 2. Estudio del efecto del BSO sobre la actividad de la enzima GGT en las células	

S4MH y F21	110
V. 1. 4. 2. 3. Estudio del efecto del ATRA sobre la actividad de la enzima GGT en las células S4MH y F21	111
V. 1. 4. 2. 4. Estudio del efecto de la combinación BSO+ATRA sobre la actividad de la enzima GGT en las células S4MH y F21	112
V. 1. 4. 3. Estudio del efecto producido por la AC sola y en combinación con ATRA y BSO, sobre la actividad de la enzima GGT en las células S4MH y F21	113
V. 1. 4. 3. 1. Estudio del efecto de la AC sobre la actividad de la enzima GGT en las células S4MH y F21	113
V. 1. 4. 3. 2. Estudio del efecto combinado AC+BSO sobre la actividad de la enzima GGT en las células S4MH y F21	114
V. 1. 4. 3. 3. Estudio del efecto combinado AC+ATRA sobre la actividad de la enzima GGT en las células S4MH y F21	115
V. 1. 4. 3. 4. Estudio del efecto combinado AC+BSO+ATRA sobre la actividad de la enzima GGT en las células S4MH y F21	116
V. 1. 5. Determinación de metabolitos reactivos del oxígeno (MROs) en las células S4MH y F21	117
V. 1. 5. 1. MROS de las células S4MH y F21 controles.....	117
V. 1. 5. 2. Estudio del efecto del BSO, ATRA y acivicina solos y en combinación, sobre la producción de	

MROs en las células S4MH y F21	118
V. 1. 5. 2. 1. Estudio del efecto del BSO sobre la producción de MROs en las células S4MH y F21	118
V. 1. 5. 2. 2. Estudio del efecto del ATRA sobre la producción de MROs en las células S4MH y F21	119
V. 1. 5. 2. 3. Estudio del efecto de la acivicina y BSO sobre la producción de MROs en las células S4MH y F21	120
V. 1. 5. 2. 4. Estudio del efecto de la combinación BSO+ATRA sobre la producción de MROs en las células S4MH y F21	121
V. 1. 5. 3. Estudio del efecto producido por la AC sola y en combinación con ATRA y BSO, sobre la producción de MROs en las células S4MH y F21	122
V. 1. 5. 3. 1. Estudio del efecto de la AC sobre la producción de MROs en las células S4MH y F21	122
V. 1. 5. 3. 2. Estudio del efecto combinado AC+BSO sobre la producción de MROs en las células S4MH y F21	123
V. 1. 5. 3. 3. Estudio del efecto combinado AC+ATRA sobre la producción de MROs en las células S4MH y F21	124
V. 1. 5. 3. 4. Estudio del efecto combinado AC+BSO+ATRA sobre la producción de MROs en las células S4MH y F21	125

V. 1. 6. Determinación de la apoptosis en las células S4MH y F21	126
V. 1. 6. 1. Apoptosis en las células S4MH y F21 controles	126
V. 1. 6. 2. Estudio del efecto del BSO, ATRA y acivicina solos y en combinación, sobre la apoptosis en las células S4MH y F21	126
V. 1. 6. 2. 1. Estudio del efecto del BSO sobre la apoptosis en las células S4MH y F21	126
V. 1. 6. 2. 2. Estudio del efecto del ATRA sobre la apoptosis en las células S4MH y F21	128
V. 1. 6. 2. 3. Estudio del efecto de la acivicina sobre la apoptosis en las células S4MH y F21	129
V. 1. 6. 2. 4. Estudio del efecto de la acivicina+BSO sobre la apoptosis en las células S4MH y F21	130
V. 1. 6. 2. 5. Estudio del efecto de la combinación BSO+ATRA sobre la apoptosis en las células S4MH y F21	131
V. 1. 6. 3. Estudio del efecto producido por la AC sola y en combinación con BSO y ATRA, sobre la apoptosis en las células S4MH y F21	132
V. 1. 6. 3. 1. Estudio del efecto de la AC sobre la apoptosis en las células S4MH y F21	132
V. 1. 6. 3. 2. Estudio del efecto combinado AC+BSO sobre la apoptosis en las células S4MH y F21	133
V. 1. 6. 3. 3. Estudio del efecto combinado AC+ATRA sobre la apoptosis en las células S4MH y F21	134

V. 1. 6. 3. 4. Estudio del efecto combinado AC+BSO+ATRA sobre la apoptosis en las células S4MH y F21	135
V. 2. RESULTADOS <i>IN VIVO</i>	137
V. 2. 1. Determinación de la capacidad tumorigénica de las células S4MH y F21	139
V. 2. 2. Efecto de los tratamientos aplicados <i>in vitro</i> a las células S4MH y F21 sobre su capacidad tumorigénica	140
V. 2. 2. 1. Capacidad tumorigénica de las células S4MH y F21 tratadas <i>in vitro</i> con BSO	140
V. 2. 2. 2. Capacidad tumorigénica de las células S4MH y F21 tratadas <i>in vitro</i> con ATRA	141
V. 2. 3. Efecto de los tratamientos <i>in vivo</i> con CY, BSO y ATRA sobre la enfermedad tumoral de las células S4MH y F21	142
V. 2. 3. 1. Efecto del tratamiento con ciclofosfamida (CY) sobre el desarrollo del tumor y las metástasis ganglionares de las células S4MH Y F21. Valoración de la toxicidad	142
V. 2. 3. 1. 1. Efecto de la CY sobre la evolución tumoral y metastática de las células S4MH y F21	142
V. 2. 3. 1. 2. Evaluación de la toxicidad asociada a los tratamientos	143
V. 2. 3. 1. 2. 1. Estudio de parámetros hematológicos	143
V. 2. 3. 1. 2. 2. Modificación del Peso del Animal (MPA)...	144
V. 2. 3. 2. Efecto del tratamiento con BSO: influencia sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21. Valoración de la toxicidad.....	145

V. 2. 3. 2. 1. Efecto del BSO sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis inducidos por las células S4MH y F21	145
V. 2. 3. 2. 2. Estudio de la toxicidad asociada a los tratamientos..	146
V. 2. 3. 2. 2. 1. Valoración de parámetros hematológicos .	146
V. 2. 3. 2. 2. 2. Modificación del Peso del Animal (MPA)...	147
V. 2. 3. 3. Efecto producido por el ATRA sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21. Valoración de la toxicidad.....	148
V. 2. 3. 3. 1. Efecto del ATRA sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21 ..	148
V. 2. 3. 3. 2. Estudio de la toxicidad asociada a los tratamientos..	149
V. 2. 3. 3. 2. 1. Valoración de parámetros hematológicos .	149
V. 2. 3. 3. 2. 2. Modificación del Peso del Animal (MPA)...	149
V. 2. 3. 4. Efecto producido por el tratamiento combinado BSO+ATRA sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21. Valoración de la toxicidad.....	150
V. 2. 3. 4. 1. Efecto del BSO+ATRA sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21	150
V. 2. 3. 4. 2. Estudio de la toxicidad asociada a los tratamientos..	151
V. 2. 3. 4. 2.1. Valoración de parámetros hematológicos ..	151
V. 2. 3. 4. 2. 2. Modificación del Peso del Animal (MPA)...	152
V. 2. 3. 5. Efecto producido por la combinación de CY+BSO sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21. Valoración de la toxicidad.....	153

V. 2. 3. 5. 1. Efecto de la combinación de CY+BSO sobre el desarrollo tumoral y la afectación ganglionar de las células S4MH y F21	153
V. 2. 3. 5. 2. Estudio de la toxicidad asociada a los tratamientos..	154
V. 2. 3. 5. 2. 1. Valoración de parámetros hematológicos .	154
V. 2. 3. 5. 2. 2. Modificación del Peso del Animal (MPA)...	155
V. 2. 3. 6. Efecto producido por la combinación de CY+ATRA sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21. Valoración de la toxicidad	156
V. 2. 3. 6. 1. Efecto de la combinación CY+ATRA sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21	156
V. 2. 3. 6. 2. Estudio de la toxicidad asociada a los tratamientos..	157
V. 2. 3. 6. 2.1. Valoración de parámetros hematológicos ..	157
V. 2. 3. 6. 2. 2. Modificación del Peso del Animal (MPA)...	158
V. 2. 3. 7. Efecto producido por la combinación de CY+BSO+ATRA sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21. Valoración de la toxicidad	159
V. 2. 3. 7. 1. Efecto de la combinación de CY+BSO+ATRA sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21	159
V. 2. 3. 7. 2. Estudio de la toxicidad asociada a los tratamientos..	160
V. 2. 3. 7. 2.1. Valoración de parámetros hematológicos ..	160
V. 2. 3. 7. 2. 2. Modificación del Peso del Animal (MPA)...	161

VI. DISCUSIÓN	165
VII. CONCLUSIONES	185
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	189
IX. ANEXO I: Esquema de las pautas de los tratamientos <i>in vitro</i>	215
X. ANEXO II: Esquema de las pautas de los tratamientos <i>in vivo</i>	219

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resonancia magnética de un sarcoma de partes blandas (SPB) de alto grado de malignidad, apariencia de masa con lobulaciones y zonas isquémicas y necróticas en su interior (imagen tomada de www.gaitano.net)	9
Figura 2. Distribución de las localizaciones primarias más comunes del SPB.....	10
Figura 3. Distribución de las localizaciones primarias más comunes del rhabdomyosarcoma (RMS)	13
Figura 4. Estructura del glutati6n (γ -glutamilcisteinilglicina, GSH).....	25
Figura 5. Proceso de oxidaci6n-reducci6n del glutati6n.....	26
Figura 6. Ciclo del γ -glutamilo.....	27
Figura 7. Reacciones de sntesis del GSH catalizadas por las enzimas γ -glutamilcisteína sintetasa y GSH sintetasa	28
Figura 8. Funci6n detoxificadora del GSH.....	29
Figura 9. Estructura de la N-acetilcisteína (NAC).....	37
Figura 10. Metabolismo del L-2-oxo-4-tiazolidina carboxilato (OTZ) y de la 5-oxo-L-prolina mediante la 5-OPasa	38
Figura 11. Inhibici6n de la γ -Glutamilcisteína sintetasa mediante la L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO).....	40
Figura 12. Mecanismo de producci6n de MROs (O_2^- , H_2O_2) derivado de la actividad de la GGT (Djavaheri M, 2002).....	44
Figura 13. Mecanismos a trav6s de los cuales la actividad de la GGT interfiere en la sensibilidad de la c6lula frente a drogas antitumorales.	45
Figura 14. Mecanismos de acci6n del ATRA (Njar VCO, 2006)	48
Figura 15. Mecanismo de acci6n de los receptores del ATRA	49
Figura 16. C6lulas tumorales S4MH y F21, obtenidas de un rhabdomyosarcoma de rata inducido químicamente.....	62

Figura 17. Proceso de inoculación intraperitoneal de los fármacos en ratas singénicas de la especie WISTAR.....	75
Figura 18. Análisis de microscopía confocal de la morfología y la inmunolocalización del marcaje con miogenina en las células S4MH (A) y F21 (B) controles.....	89
Figura 19. Análisis de microscopía confocal de la morfología y la inmunolocalización de marcaje con miogenina en las células S4MH y F21 tratadas con ATRA.	90
Figura 20. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 controles	91
Figura 21. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 tratadas con BSO (100 y 500 μM).....	93
Figura 22. Efecto del tratamiento con BSO (100 y 500 μM) en las células S4MH y F21	93
Figura 23. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 tratadas con ATRA (10^{-8} y 10^{-6} M)	95
Figura 24. Efecto del tratamiento con ATRA en las células S4MH y F21	95
Figura 25. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 tratadas con acivicina.....	96
Figura 26. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 tratadas con BSO y acivicina	98
Figura 27. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 tratadas con BSO+ATRA	99
Figura 28. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)	101
Figura 29. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)+BSO (100 μM)	103
Figura 30. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)+ATRA (10^{-8} M)	105

Figura 31. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)+BSO (100 μM)+ATRA (10^{-8} M).....	107
Figura 32. Actividad GGT (mU GGT/mg Proteína) de las células S4MH y F21	108
Figura 33. Actividad GGT (mU GGT/mg proteína) de las células S4MH y F21 tratadas con acivicina (0.5-10 μM)	109
Figura 34. Actividad GGT (mU GGT/mg proteína) de las células S4MH y F21 tratadas con BSO (100 Y 500 μM)	110
Figura 35. Actividad GGT (mU GGT/mg proteína) de las células S4MH y F21 tratadas con ATRA (10^{-8} y 10^{-6} M)	111
Figura 36. Actividad GGT (mU GGT/mg proteína) de las células S4MH y F21 tratadas con ATRA (10^{-8} M)+BSO (100 μM)	112
Figura 37. Actividad GGT (mU GGT/mg Proteína) de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)	113
Figura 38. Actividad GGT (mU GGT/mg Proteína) de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)+BSO (100 μM)	114
Figura 39. Actividad GGT (mU GGT/mg Proteína) de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)+ATRA (10^{-8} M)	115
Figura 40. Actividad GGT (mU GGT/mg proteína) de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)+BSO (100 μM)+ATRA (10^{-8} M).....	116
Figura 41. MROs de las células S4MH y F21 controles	117
Figura 42. Niveles de MROs de las células S4MH y F21 tratadas con BSO (100 y 500 μM)	118
Figura 43. Niveles de MROs de las células S4MH y F21 tratadas con ATRA (10^{-8} M).....	119
Figura 44. Niveles de MROs de las células S4MH y F21 tratadas con acivicina (1 μM) y BSO (100 μM)	120
Figura 45. Niveles de MROs de las células S4MH y F21 tratadas con BSO (100 μM)+ATRA (10^{-8} M).....	121

Figura 46. Niveles de MROs de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)	122
Figura 47. Niveles de MROs de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)+BSO (100 μM)	123
Figura 48. Niveles de MROs de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)+ATRA (10^{-8} M)	124
Figura 49. Niveles de MROs de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)+BSO (100 μM)+ATRA (10^{-8} M)	125
Figura 50. Apoptosis de las células S4MH y F21 tratadas con BSO (100 μM y 500 μM).....	127
Figura 51. Apoptosis de las células S4MH y F21 tratadas con ATRA (10^{-8} M y 10^{-6} M).....	128
Figura 52. Apoptosis de las células S4MH y F21 tratadas con acivicina (1-25 μM).....	129
Figura 53. Apoptosis de las células S4MH y F21 tratadas con acivicina (1 μM)+BSO (100 μM)	130
Figura 54. Apoptosis de las células S4MH y F21 tratadas con BSO (100 μM)+ATRA (10^{-8} M).....	131
Figura 55. Apoptosis de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM).....	132
Figura 56. Apoptosis de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)+BSO (100 μM)	133
Figura 57. Apoptosis de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)+ATRA (10^{-8} M).....	134
Figura 58. Porcentaje células apoptóticas de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)+BSO (100 μM)+ATRA (10^{-8} M)	135
Figura 59. Evolución del peso de los tumores inducidos por las células S4MH y F21	139
Figura 60. Capacidad tumorigénica de las células S4MH y F21 tratadas con BSO (100 y 500 μM)	140
Figura 61. Capacidad tumorigénica de las células S4MH y F21 control	

y tratadas con ATRA (10^{-8} y 10^{-6} M).....	141
Figura 62. Modificación del Peso Animal (MPA) de los animales tratados con 50 y 75 mg/kg de CY	144
Figura 63. Modificación del Peso del Animal (MPA) tras el tratamiento con BSO (50 y 100 mg/kg).....	147
Figura 64. Modificación del Peso de los Animales (MPA) tratados con ATRA (5 mg/kg) y su comparación con los animales control.....	149
Figura 65. Variación del MPA de los animales tratados con BSO (50 mg/kg)+ATRA (5 mg/kg)	152
Figura 66. Variación del MPA de los animales tratados con CY (50 mg/kg)+BSO (50 mg/kg)	155
Figura 67. Variaciones del MPA de los animales tratados con CY (50 mg/kg)+ATRA (5 mg/kg)	158
Figura 68. Variaciones del MPA de los animales tratados con CY (50 mg/kg)+BSO (50 mg/kg)+ATRA (5 mg/kg).....	161

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos histológicos de sarcomas de partes blandas	11
Tabla 2. Retinoides actualmente utilizados en la terapia antitumoral.....	52
Tabla 3. Desarrollo tumoral y metastático de las células S4MH y F21 tras el tratamiento con CY (50 y 75 mg/kg)	143
Tabla 4. Parámetros sanguíneos de los animales tratados con CY.....	143
Tabla 5. Desarrollo tumoral y afectación ganglionar de las células S4MH y F21 tratadas con BSO (50 y 100 mg/kg)	145
Tabla 6. Parámetros sanguíneos de los animales tratados con BSO	146
Tabla 7. Capacidad tumorigénica y metastática de las células S4MH y F21 tratadas con ATRA (5 mg/kg).....	148
Tabla 8. Parámetros sanguíneos de los animales tratados con ATRA	149
Tabla 9. Desarrollo tumoral y afectación ganglionar de las células S4MH y F21 tratadas con BSO (50 mg/kg)+ATRA (5 mg/kg).....	151
Tabla 10. Parámetros sanguíneos de los animales tratados con BSO+ATRA	151
Tabla 11. Desarrollo tumoral y afectación ganglionar de las células S4MH y F21 tratadas con CY (50 mg/kg)+BSO (50 mg/kg)	154
Tabla 12. Valores de parámetros hematológicos de los animales tratados con CY+BSO.....	155
Tabla 13. Desarrollo tumoral y afectación ganglionar de las células S4MH y F21 tratadas con CY (50 mg/kg)+ATRA (5 mg/kg)	157
Tabla 14. Valores de los parámetros sanguíneos de los animales tratados con CY+ATRA.....	157
Tabla 15. Desarrollo tumoral y afectación ganglionar de las células S4MH y F21 tratadas con CY (50 mg/kg)+BSO (50 mg/kg) +ATRA (5 mg/kg).....	160
Tabla 16. Valores de los parámetros sanguíneos de los animales tratados con CY+BSO+ATRA	161

ABREVIATURAS

AA: Aminoácidos

AC: Acroleína

ADN: Ácido desoxirribonucléico

ADP: AdenosIndifosfato

ANOVA: Análisis factorial de las varianzas

ARMS: rabdomiosarcoma tipo alveolar

ATP: adenosintrifosfato

ATRA: Ácido transretinoico

BSO: L-butionina-[S,R]-sulfoximina

Ca: Calcio

cdks: Ciclinas dependientes de kinasas

COG: Children oncology group

CY: Ciclofosfamida

CYPs: Citocromo P450 oxidasas

Cys: Cisteína

CWS: Grupo de estudio multicéntrico alemán sobre los sarcomas de partes blandas

DCF: Diclorofluoresceína

DG: diacilglicerol

DMEM: Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: factor de crecimiento epidérmico

ERMS: Rabdomiosarcoma tipo embrionario

γ -EtMSO: γ -etil metionina sulfoximina

FICT: Isotiocianato de fluoresceína

FMD: Factor modificador de dosis

FRC: Factor de retardo del crecimiento

Glu: Glutamato

γ -GCS: γ -glutamilcisteína sintetasa

GGT: γ -glutamyltranspeptidasa

Gly: Glicina

GSH: Glutati3n reducido, γ -glutamylcisteinilglicina

GSSG: Glutati3n oxidado

GST: Glutati3n S-transferasa

GU: Genito urinario

HCL: 1cido clorh3drico

HBSS: Soluci3n salina equilibrada de Hanks

H₂DCFDA: Diclorodihidrofluoresceína diacetato

4-HPR: 4-N-(4-hydroxyphenyl)retinamida, fenretidina

H₂O₂: Per3xido de hidr3geno

IgG: Inmunoglobulina G

InsP₃: inositol trifosfato

IMF: Intensidad media de fluorescencia

IS: Incremento de la supervivencia

IRS: Intergroupal rhabdomyosarcoma study

IVA: combinaci3n quimioter1pica de Ifosfamida, vincristina y adriamicina

LGD1069: Bexaroteno, targretina

mBCL: Monoclorobimano

MDR1: Gen del complejo de multiresistencia a drogas

MMPs: Metaloproteinasas de matriz

MMT: Malignant mesenquimal tumors

MPA: Modificación del peso del animal

MROS: Metabolitos reactivos del oxígeno

MSO: Metionina sulfoximina

mU: Miliunidades

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NAC: N-acetilcisteína

NaOH: Hidróxido sódico

NF- κ B: Factor nuclear κ B

nm: nanómetros

O²⁻: Radical superóxido

OH[•]: Radical hidroxilo

OPasa: Oxo-L-prolinasa

OPT: O-ftaldehído

OTZ: L-2-oxo-4-tiazolidina carboxilato

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica

PBS: Tampón fosfato en solución salina

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

Pi: Fósforo inorgánico

PKC: Proteína quinasa C

PRb: Proteína del retinoblastoma

RMS: Rabdomiosarcoma

RA: Retinoic acid

RARE: Retinoic acid responsive elements

SBF: Suero bovino fetal

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SIOP: Sociedad internacional de oncología pediátrica

SPB: Sarcoma de partes blandas

TRAIL: ligando del factor de necrosis tumoral inductor de apoptosis

T/C: Ratio tratado/control

TCA: Ácido tricloroacético

TD: Tiempo de duplicación

TDs: Tiazolidinas

TGF: Factor de crecimiento transformante

TNM: Sistema de estadiaje del RMS que tiene en cuenta las características del tumor, afectación de nódulos y presencia de metastásis.

TNF: Factor de necrosis tumoral

Tris: Tampón salino

UA: Unidades arbitrarias

UI: Unidades Internacionales

UKCCCR: United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research

VA: Combinación quimioterápica de vincristina y adriamicina

VAC: Combinación quimioterápica de vincristina, dactinomicina y ciclofosfamida

VRT: volumen relativo de tumor

I. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El cáncer es un proceso por el cual defectos moleculares ocasionados por daños genéticos, producen la transformación de una célula sana en tumoral. Esta transformación produce alteraciones fundamentales en la fisiología de la célula, como son, la autonomía frente a señales que controlan la proliferación, falta de sensibilidad frente a señales inhibitorias del crecimiento, evasión de la apoptosis o muerte celular programada, potencial replicativo ilimitado, capacidad angiogénica o de formación de neovascularización y capacidad de evasión del lugar de origen y colonización de nuevos órganos (metástasis).

El tumor es un sistema caracterizado por una gran heterogeneidad poblacional. Las células que lo componen tienen una alta capacidad de mutación y esta inestabilidad genética es la causa de la variabilidad intratumoral. Este hecho es una de las causas de la resistencia que presentan numerosos cánceres frente a las terapias antitumorales. Es muy probable que alguna población de células del tumor sobreviva a dichos tratamientos y provoque una nueva recidiva de la enfermedad. Se produce un sistema en el que las células tumorales interactúan con el estroma, la matriz extracelular, el sistema vascular y las células del sistema inmune. Los tumores son capaces de responder frente a los mecanismos fisiológicos de supresión del tumor, iniciando una cascada de respuestas que les permiten adaptarse al nuevo ambiente o bien migrar a otro más favorable.

Entre las tácticas adaptativas que pueden llevar a cabo se encuentran: disminución de la expresión de genes proapoptóticos (gen supresor tumoral p53), aumento de la expresión de genes que confieren resistencia a drogas (MDR1), aumento de la síntesis de metaloproteinasas (MMP), aumento de la síntesis de moléculas detoxificadoras (GSH) y alteración de los procesos de diferenciación celular. Estos aspectos confieren al tumor una gran robustez frente al ambiente que les rodea y a los diferentes tipos de tratamientos.

Uno de los factores pronósticos más relevantes, a la hora de analizar un tumor, es el grado de diferenciación de las células que lo componen. Las células tumorales tienen alterados los mecanismos que regulan los procesos de

proliferación y diferenciación celular, dando lugar a tumores con una capacidad proliferativa y un grado de diferenciación determinado en cada individuo. Aquellos tumores con un alto o medio grado de diferenciación, tendrán una menor capacidad proliferativa y, por lo tanto, un mejor pronóstico. Sin embargo, aquellos tumores con un bajo grado de diferenciación, crecerán más rápidamente aumentando también su capacidad metastática.

Estudios previos sobre las células tumorales han demostrado, que aquellas células altamente metastáticas (muy proliferativas) y poco diferenciadas, tienen niveles más altos de glutatión intracelular (GSH) que aquellas células menos proliferativas y con un mayor grado de diferenciación y, por supuesto, que las células normales. El GSH, es el tiol no proteico más abundante en el interior de la célula. Es una molécula fundamental en los procesos de detoxificación celular y está implicado en la regulación de procesos celulares esenciales para el funcionamiento normal de la célula, como son la proliferación, síntesis proteica, apoptosis y diferenciación. En condiciones normales, conforme la célula va adquiriendo el grado de diferenciación que le corresponde, los niveles de GSH van disminuyendo paulatinamente.

Actualmente, la inducción de la diferenciación de las células tumorales, se está utilizando como alternativa a la terapia convencional del cáncer. Existen moléculas reguladoras que interactúan en la célula para producir un balance correcto entre la proliferación y diferenciación celular. Los retinoides son considerados como los supresores fisiológicos de la carcinogénesis. Estos derivados de la vitamina A, regulan una amplia variedad de procesos biológicos (diferenciación, proliferación, apoptosis, morfogénesis), y se están utilizando para el tratamiento, sobre todo, de algunos cánceres epiteliales y de la leucemia promielocítica con resultados sorprendentes. Se está investigando su aplicación a numerosos tipos de cáncer, como el de próstata, páncreas, pulmón, etc.

Uno de los retinoides más utilizados para los tratamientos antitumorales, es un derivado natural de la vitamina A, el ATRA (del inglés all-trans retinoic acid) o

ácido transretinoico. El ATRA entra en las células por difusión pasiva e interacciona por mediación de una serie de moléculas a nivel nuclear; además, regula activamente la expresión génica induciendo la diferenciación celular.

Como se puede observar, tanto el GSH como el ATRA, son moléculas que se encuentran implicadas en la regulación de los mismos procesos celulares, lo que implica una posible relación entre ellas. Así lo sugiere la interacción directa que tiene el ATRA sobre proteínas dependientes de GSH o el papel del GSH en el mantenimiento del balance de oxido-reducción cuando existe un aumento del estrés oxidativo producido por moléculas como el ATRA. Sin embargo, todavía hay pocos estudios acerca de la posible influencia de los niveles de GSH sobre los efectos del ATRA en las células tumorales.

La utilización de los agentes inductores de la diferenciación solos o en combinación con otros fármacos (moduladores de GSH, citostáticos clásicos), puede producir efectos sinérgicos en el control del crecimiento, inducción de la apoptosis y diferenciación, permitiendo el uso de menores concentraciones farmacológicas, manteniendo la eficacia y disminuyendo los efectos secundarios en los pacientes.

Como se ha expuesto anteriormente, existe una gran diversidad en cuanto al tipo de células que componen los diferentes tumores y el grado de alteración de los procesos celulares básicos. Los diferentes mecanismos de respuesta que tengan las células que componen el tumor, determinará la respuesta frente a las terapias antitumorales utilizadas. Es decir, cada individuo tendrá un perfil específico tumoral, que es necesario estudiar para poder abordar el tratamiento más conveniente.

En este trabajo se estudia el efecto que produce la siguiente estrategia terapéutica: inducción del grado de diferenciación mediante el uso de retinoides, modulación de los niveles de GSH intracelular y terapia citostática clásica, utilizando la ciclofosfamida, en uno de los cánceres más común y agresivo en la población infantil como es el rhabdomyosarcoma. Además, se estudia la influencia

que tiene el grado de diferenciación tumoral sobre la respuesta a las terapias utilizadas y se determina la combinación terapéutica más adecuada en cada caso.

II. INTRODUCCIÓN

II. 1. LOS SARCOMAS DE PARTES BLANDAS

Los sarcomas denominados “de partes blandas” (SPB) engloban a un grupo heterogéneo de tumores primarios mesenquimatosos que se localizan fuera del esqueleto, de los órganos parenquimatosos, o de las vísceras huecas (Sole LA, 1998). Constituyen un 1% de las neoplasias y se han identificado hasta el momento más de 50 tipos histológicos (Hogendoom PC, 2004; tabla 1).



Fig. 1. Resonancia magnética de un sarcoma de partes blandas de alto grado de malignidad, apariencia de masa con lobulaciones y zonas isquémicas y necróticas en su interior (imagen tomada de www.gaitano.net).

Su forma más frecuente de presentación es como una masa de aparición insidiosa y lento crecimiento, que no motiva consulta médica por parte del paciente hasta que, en general, ha adquirido considerables proporciones (Sole LA, 1998). Debido a su apariencia inocua inicial, presentan una media en el retraso diagnóstico de 6-12 meses. La aparición de la sintomatología suele ser secundaria a presión o tracción en estructuras vecinas y raramente interfieren con la función motora en su inicio. El dolor, espontáneo o provocado, es síntoma de aparición tardía. La localización retroperitoneal no suele dar sintomatología hasta que los tumores son lo suficientemente grandes por su crecimiento local expansivo, e invaden por extensión a los tejidos circundantes (Tabbarah HJ, 1983). Los SPB pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo, pero la zona afectada más común son las extremidades (60%), seguido del retroperitoneo (19%), la pared abdominal/torácica (15%) y, por último, la región de cabeza y cuello (6%)[Figura 2].

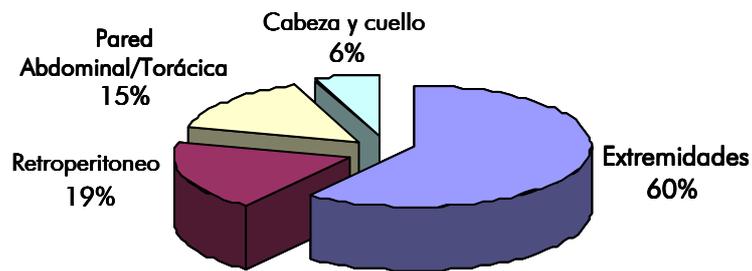


Fig. 2. Distribución de las localizaciones primarias más comunes del SPB.

Los SPB no tienen una etiología definida, aunque se han identificado múltiples factores asociados que podrían predisponer a la aparición de estos tumores. Se ha apreciado una cierta predisposición genética; los SPB ocurren con más frecuencia cuando se padece la enfermedad de Von Recklinhausen, el síndrome de Gardner, esclerosis tuberosa, poliposis colónica familiar y el síndrome de Li-Fraumeni –produce mutaciones en el gen supresor de tumores p53–. Su aparición también se ha asociado con la exposición a radiaciones ionizantes y a linfedema crónico. Además, algunos agentes químicos como los ácidos fenoxiacéticos (presente en herbicidas), las digoxinas y los clorofenoles (conservantes de la madera) se han implicado en su etiología (Vasallo J.A. 2003).

Tabla 1. Tipos histológicos de sarcomas de partes blandas

Tipo del Tejido	Tumor
Óseo	Osteosarcoma Extraóseo
Cartilaginoso	Condrosarcoma mixoide extraóseo Condrosarcoma mesenquimatoso extraóseo
Fibroso	Fibrosarcoma Dermatofibrosarcoma
Fibrohistocítico	Histiocitoma fibroso maligno
Sinovial	Sarcoma sinovial
Graso	Angiosarcoma Linfangiosarcoma Hemangiopericitoma maligno Hemangioendotelioma maligno
Nervioso	Liposarcoma
Muscular	Leiomasarcoma Rabdomiosarcoma
Vascular	Angiosarcoma
Piel/Dermis	Sarcoma de células claras Carcinoma celular escamoso
Más de un tipo de tejido	Mesenquioma maligno
Desconocido	Sarcoma epiteliode Sarcoma alveolar de partes blandas Sarcoma de Ewing Tumor desmoplásico de células redondas pequeñas

A pesar de los subtipos histológicos, los SPB presentan algunas características comunes. El comportamiento clínico de la mayoría de los SPB se correlaciona con su localización anatómica, grado histológico y tamaño del tumor (Cormier JN, 2004). Además, la vía metastática más comunmente utilizada es la hematogena, siendo los pulmones el principal órgano diana. Por el contrario, son muy raras las metástasis producidas por vía linfática (<5%). Sin embargo, la variabilidad en los resultados clínicos obtenidos hasta el momento, recalca la hereogeneidad en cuanto a la agresividad biológica de estos tumores, por lo que encontrar el tratamiento terapéutico más adecuado para cada tipo de tumor es uno de los

grandes retos de la oncología (Mocellin S, 2006). El grado histológico en los SPB tiene una gran relevancia pronóstica, debido a la relación de éste con la afectación ganglionar. Se ha observado que la incidencia en la afectación ganglionar está en gran medida relacionada con el grado histológico de malignidad, siendo los sarcomas epitelioides (con una tasa de afectación del 80%), los sarcomas de origen vascular (40%) y los rhabdomiosarcomas (36%) los que se asocian con la tasa más alta de afectación ganglionar (Mazzeron JJ, 1987).

La mayoría de los SPB se caracterizan por una resistencia relativa a la quimioterapia y la tasa de supervivencia a los 5 años suele ser del 50-60% (Brennan M, 2001). A pesar de los intentos de mantenimiento de un control local del tumor en el órgano afectado, aplicando terapias multidisciplinarias, se produce recurrencia y metástasis, lo que produce una tasa de supervivencia a los 5 años en pacientes con SPB de alto riesgo (con un perfil metastático, localización profunda, en el tronco o cabeza y cuello, tamaño superior a 5 cm y grado histológico intermedio o alto) que no supera el 15% (Grupo GEIS, 2006). Sin embargo, se están llevando a cabo grandes avances respecto a la biología de este tipo de tumor, de forma que las terapias se dirigen hacia dianas moleculares y específicas de las células que componen el SPB, lo que puede cambiar la historia natural de esta enfermedad (Fletcher JA, 2004).

II. 2. EL RABDOMIOSARCOMA

El rhabdomiosarcoma (RMS) es el SPB más comunmente encontrado en niños y jóvenes. Constituye el 4%-5% de las enfermedades infantiles con una incidencia anual de 5.3 enfermos por millón de niños con edad inferior a los 15 años (Pascual N, 2005). En Estados Unidos, por ejemplo, aparecen 350 casos nuevos al año aproximadamente. El pico de incidencia en la infancia se produce a la edad media de 5 años, con un mayor porcentaje de afectación en el género masculino (Breitfel P, 2005).

Puesto que el RMS deriva de las células mesenquimales primitivas, se puede desarrollar en cualquier zona del cuerpo incluidos aquellos en los que no se encuentra normalmente músculo estriado. Los lugares donde se localiza preferentemente son los siguientes [Figura 3]: zona genitourinaria (GU) (24%), parameninges (16%), extremidades (19%), zona orbital (9%), zonas de la región de cabeza y cuello (10%) y otras localizaciones (22%)(Meyer WH, 2004).

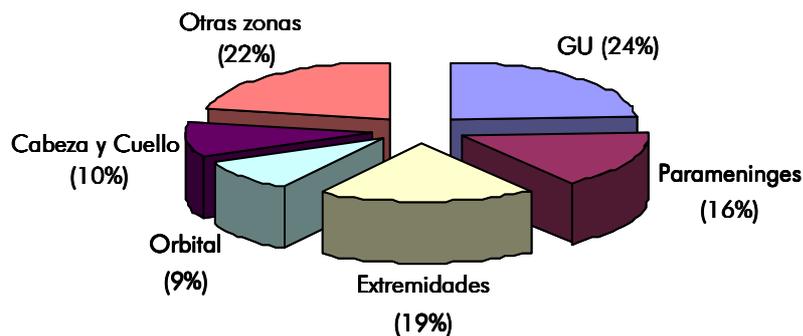


Fig. 3. Distribución de las localizaciones primarias más comunes del RMS.

Los síntomas de la enfermedad dependen de la localización primaria del tumor. Los tumores nasofaríngeos suelen producir sangrado, congestión, dificultades en la deglución o problemas neurológicos cuando se extienden hacia el cerebro. Los tumores del tracto genitourinario pueden producir sangrado vaginal o signos de obstrucción urinaria. Cuando estos tumores se presentan en músculos puede aparecer protuberancia dolorosa, aunque es posible que no presenten dolor. El diagnóstico del RMS suele tardar en realizarse debido a la falta de síntomas o porque la aparición puede coincidir con una lesión reciente; sin embargo, es muy relevante la realización de un diagnóstico temprano, puesto que se trata de tumores agresivos con una alta capacidad metastática.

Aunque la etiología del RMS es bastante desconocida, muchos tumores aparecen de forma espontánea sin que exista una predisposición por factores de riesgo asociados. Existen, sin embargo, factores genéticos que juegan un papel muy importante en la presentación de la enfermedad. La aparición del tumor puede estar asociada a un síndrome familiar en el cual se produce la inactivación del "gen

supresor de tumores" p53, el cual juega un papel crítico en la paralización del ciclo celular y el comienzo del proceso apoptótico una vez que se han producido alteraciones en el ADN. Además, como se expone más adelante existen anomalías genéticas completamente diferentes dependiendo del tipo de RMS del que se trate.

Existen dos tipos principales de RMS (National Cancer Institut, U. S., 2005):

➤ RMS embrionario (ERMS): es el más común (80%) y se presenta sobre todo en cabeza y cuello, vejiga, vagina, en zonas adyacentes a la próstata y los testículos. Afecta sobre todo a niños de corta edad. Las células que forman este tumor recuerdan a las que se encuentran en desarrollo en un feto de 6-8 semanas. Se dan dos variantes del ERMS: la botrioides y aquella en que las células tienen forma de huso.

➤ RMS alveolar (ARMS): aparece en el 15-20% de los casos, sobre todo en los músculos largos del tronco, brazos y piernas y afecta a niños de mayor edad. Se denomina alveolar porque las células se disponen dejando espacios huecos o alveolos. Estas células recuerdan a las células musculares normales presentes en un feto de 10 semanas.

La realización de una adecuada histología de la biopsia o del tumor extirpado es muy relevante en el RMS, ya que determinará el tipo de tumor y establecerá un pronóstico dependiendo de la variedad encontrada. Es indispensable realizar el marcaje inmunohistoquímico de marcadores de diferenciación de músculo esquelético: miogenina, MyoD, actina muscular específica, mioglobina y desmina (Newton WA, 1995). Utilizando estos datos, los RMS se clasifican en dos grupos dependiendo de su pronóstico: el grupo histológico favorable, en el que se encuentra el ERMS con sus dos variantes y el grupo histológico desfavorable, que comprende el ARMS.

Los dos tipos de RMS descritos tienen anomalías genéticas completamente diferentes:

➤ ERMS: se caracteriza por una pérdida de la heterocigosis del brazo corto del cromosoma 11, lo que puede producir la inactivación de un gen supresor de tumores. Esta es la región donde se encuentra el gen que codifica el factor de crecimiento insulínico y este factor está sobreexpresado en el RMS (Bridge JA, 2000).

➤ ARMS: la mayoría de estos tumores (80-85%) tienen traslocaciones cromosómicas. Estas traslocaciones dan lugar a los nuevos genes de fusión PAX3-FKHR y PAX7-FKHR (Barr FG, 2001). Los genes PAX3 y PAX7 codifican proteínas que se expresan durante el desarrollo embrionario y son esenciales para la formación de los primeros mioblastos. Por otro lado los genes FKHR forman parte de una importante familia de factores de transcripción. Las proteínas formadas, como resultado de las traslocaciones, mantienen la capacidad de unión al ADN propia de los genes PAX pero funcionando como un factor de transcripción mucho más potente que la proteína original. Los nuevos factores de transcripción formados son inhibidores de la diferenciación miogénica, inhiben también la apoptosis actuando como proteínas oncogénicas, todo lo cual se relaciona con un comportamiento clínico adverso. La detección de estas proteínas de fusión formadas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa es importante cuando se diagnostica el ARMS, puesto que la aparición de la nueva proteína PAX3-FKHR se correlaciona con una alta capacidad metastática, bajas respuestas en el tratamiento y muy frecuentemente la médula ósea se encuentra también comprometida (Sorensen PHB, 2002).

Se han conformado diferentes sistemas de estadiaje para clasificar los RMS y poder programar el tratamiento más adecuado según la prognosis esperada. Los sistemas más ampliamente utilizados son el estadiaje TNM (que tiene en cuenta la localización del tumor primario, su diámetro mayor, la afectación de estructuras vecinas, las características de los ganglios linfáticos y la presencia de metástasis) y el sistema de grupos IRS (basado en la cantidad de tumor residual tras la cirugía inicial y en el grado de diseminación tumoral en el momento del diagnóstico).

CLASIFICACIÓN TNM

Antes del Tratamiento Quirúrgico

Tumor

T0: No hay indicios del tumor primario

T1: El tumor afecta sólo al órgano o tejido de origen

T1a: Tumor ≤ 5 cm en su mayor dimensión

T1b: Tumor > 5 cm en su mayor dimensión

T2: El tumor extralimita el órgano o tejido de origen

T2: Tumor ≤ 5 cm en su mayor dimensión

T2b: Tumor > 5 cm en su mayor dimensión

TX: No hay información sobre el tamaño ni la capacidad invasiva del tumor primario

Ganglios Linfáticos

N0: No hay evidencia de ganglios linfáticos afectados

N1: Hay evidencia de afectación de los ganglios linfáticos regionales

NX: No hay información sobre la afectación en los ganglios linfáticos

Metástasis

M0: No hay evidencia de metástasis o no están afectados los ganglios linfáticos no regionales

M1: Hay evidencia de metástasis a distancia o están afectados los ganglios linfáticos no regionales

MX: No hay información sobre la presencia de metástasis.

Después del Tratamiento Quirúrgico

Tumor

- pT0:** No hay indicios del tumor primario una vez analizada histológicamente el tumor extirpado.
- pT1:** El tumor afecta sólo al órgano o tejido de origen
Excisión completa y márgenes libres histológicamente
- pT2:** El tumor extralimita el órgano o tejido de origen
Excisión completa y márgenes libres histológicamente
- pT3:** Tumor con o sin invasión más allá del órgano o tejido de origen
Excisión incompleta
- pT3a:** Evidencia de tumor residual microscópico
 - pT3b:** Evidencia de tumor residual macroscópico
 - pT3c:** Afectación maligna adyacente sin relación con el tamaño
(Adjacent malignant effusion regardless of size)
- pTX:** El estado tumoral no puede ser determinado

Ganglios Linfáticos

- pN0:** No hay evidencia de ganglios linfáticos afectados tras examen histológico de los mismos
- pN1:** Hay evidencia de afectación de los ganglios linfáticos regionales
- pN1a:** Hay evidencia de invasión a los ganglios linfáticos regionales
Los ganglios afectados han sido eliminados completamente
 - pN1b:** Hay evidencia de invasión a los ganglios linfáticos regionales
Los ganglios afectados no han sido eliminados completamente
- pNX:** El estado de los ganglios linfáticos no ha podido ser determinado debido a la falta de examen patológico o una información patológica inadecuada.

Metástasis

- pM0:** No hay evidencia de metástasis
- pM1:** Hay evidencia de metástasis
- pMX:** El estado de la metástasis linfáticos no ha podido ser determinada debido a la falta de examen patológico o una información patológica inadecuada.

Agrupamiento clínico IRS

Grupo I: Enfermedad localizada y totalmente reseçada

Los ganglios linfáticos regionales no se encuentran afectados (se requiere biopsia o disección de los ganglios linfáticos excepto para lesiones de cabeza o cuello)

IA: Limitado al músculo u órgano de origen

IB: Afectación de los músculos u órganos contiguos (hay infiltración del tumor a las zonas adyacentes así como a través de los planos fasciales)

Grupo II: Resección masiva total con evidencia de extensión regional

IIA: Tumor localizado que ha sido reseçado masivamente con enfermedad residual microscópica sin complicación ganglinar

IIB: El tumor ha sido reseçado completamente sin enfermedad residual pero con afectación de los ganglios regionales.

IIC: Existe enfermedad locoregional que ha sido reseçada masivamente pero con presencia de residuos tumorales microscópicos y con afectación de los ganglios regionales y que puede involucrar al ganglio regional más distal del sitio primario.

Grupo III: Resección incompleta con enfermedad residual macroscópica

IIIA: Solo después de la biopsia

IIIB: Después de la resección masiva del tumor primario (>50%)

Grupo IV: Hay enfermedad metastática en el momento del diagnóstico

El grupo cooperativo europeo asigna a los pacientes protocolos de tratamiento mediante el uso de un esquema de clasificación que combina los sistemas anteriores agrupándolos según el riesgo:

Riesgo	Grupos	Incidencia (%)	SLE (%)	TS (5)
Pacientes de bajo riesgo	Pacientes con ERMS localizado de los grupos I y II y aquellos del grupo III en lugares favorables (órbita, cabeza o cuello, región genitourinaria o tracto biliar).	33	88	95
Pacientes de riesgo medio	Aquellos con ERMS del grupo III en lugares no favorables (sitios parameningeos, vejiga, próstata, extremidades) y con ARMS no metastático.	50	70	75
Pacientes de alto riesgo	Niños y adolescentes con RMS metastático.	20	25	27

SLE: supervivencia libre de enfermedad a los 5 años

TS: tasa de supervivencia total

La determinación de la extensión del tumor es crítica para planificar el tratamiento más adecuado para cada situación. Para establecer el estadio exacto de la enfermedad es necesario evaluar el tumor primario y conocer su localización, tamaño, capacidad invasiva, histología y afectación ganglionar (Breitfeld PP, 2005). La metodología que se utiliza para el diagnóstico del RMS es la siguiente (National Cancer Institut, U.S., 2005):

- ✦ Biopsia (para determinación del grado histológico)
- ✦ Análisis de sangre u orina
- ✦ Estudios por imágenes:
 - Tomografía computerizada
 - Resonancia magnética nuclear
 - Radiografía
 - Ecografía
 - Gammagrafía ósea

- Aspiración o biopsia de la médula ósea (para determinar la cantidad, tamaño y madurez de las células sanguíneas o la presencia de células anormales).
- Punción lumbar (para medir la presión del conducto raquídeo y del cerebro, para análisis del líquido cefalorraquídeo en busca de células anormales o infecciones).
- Inmunohistoquímica (para confirmar la enfermedad y el tipo de tumor mediante la determinación de marcadores específicos del RMS).
- Estudios citogenéticos (para determinar aberraciones cromosómicas típicas en estos tumores, como son las traslocaciones en el ARMS).
- Técnicas moleculares (reacción en cadena de la polimerasa para la detección de la expresión de genes de fusión como los que ocurren en la variante más agresiva del RMS, como es la ARMS).

Se prevee que es posible que todos los pacientes con RMS tengan micrometástasis en el momento del diagnóstico, de tal forma que es necesario aplicar una terapia multimodal que incluye la cirugía, radioterapia y quimioterapia. Las pautas de los tratamientos y su intensidad deben ser planificadas dependiendo de los factores pronósticos (grupos de riesgo) y los efectos secundarios que se producen en el paciente. Los protocolos de tratamiento actuales, para conseguir el control local del tumor en niños con RMS localizado, prescriben la aplicación conjunta de cirugía y radioterapia. Sin embargo, en la actualidad se tiende hacia un enfoque conservador del tratamiento, de forma que se produzca el mínimo trauma sobre los órganos y tejidos del paciente, teniendo en cuenta el efecto que tiene la quimioterapia adyuvante y posquirúrgica sobre la disminución del tamaño tumoral (Gallego S, 2005).

II. 2. 1. Cirugía

La cirugía es importante en el tratamiento del RMS. Para tumores localizados en zonas fácilmente accesibles, la excisión completa del tumor antes de comenzar la quimioterapia aumenta sensiblemente las posibilidades de éxito en el tratamiento.

Sin embargo, la utilización de la cirugía se verá limitada cuando la localización del tumor no lo permita o signifique la pérdida de función de un órgano (vejiga) o parte del cuerpo (amputaciones de extremidades) (Martelli H, 1999; Arndt CA, 2001). Además la cirugía es importante para determinar la afectación de los ganglios linfáticos, sobre todo en RMS paratesticular o de extremidades. Estudios previos han demostrado que la utilización de la tomografía computerizada para conocer el estado de los ganglios puede enmascarar la presencia de afectación ganglionar en zonas como el retroperitoneo o en las extremidades, sobre todo en niños mayores de 10 años (Neville HL, 2000). Por estos motivos, la exploración quirúrgica de los ganglios regionales (o del ganglio centinela) es un procedimiento estándar en pacientes con RMS en extremidades. La determinación de la presencia de ganglios afectados es muy relevante, puesto que estos pacientes requieren radioterapia de local (Mc Mulkin HM, 2003).

II. 2. 2. Radioterapia

La utilización de radioterapia para el control local y regional del tumor se utiliza de forma rutinaria en el tratamiento del RMS (Breitfeld PP, 2005).

La forma de aplicación (externa, braquiterapia) y las pautas más convenientes (prequirúrgica, intraoperatoria y posquirúrgica) están todavía por determinar, a pesar de los numerosos grupos cooperativos de trabajo a nivel internacional que trabajan para avanzar en el tratamiento del RMS. La radioterapia posquirúrgica se plantea teniendo en cuenta el estadio del tumor, el estado en el que han quedado los márgenes quirúrgicos tras la escisión tumoral y los protocolos de tratamiento que desarrolla el centro sanitario en el que se encuentra el paciente. Por otro lado, la radioterapia prequirúrgica puede tener varias ventajas (O'Sullivan B, 2003). Las células tumorales no tratadas se encuentran en un mejor nivel de oxigenación, lo que aumenta la efectividad de la radiación. Por otro lado, los campos de radiación pueden ser menores que los que se aplican en la radioterapia posquirúrgica, lo que mejoraría la función de la zona afectada. Por último, la radioterapia puede facilitar la posterior cirugía disminuyendo previamente el tamaño

tumoral. Sin embargo la radioterapia prequirúrgica puede dificultar la determinación de los límites de resección y además puede disminuir la capacidad de cicatrización de la zona tratada (Mocellin S, 2006).

Actualmente existe un gran consenso entre los grupos cooperativos en el siguiente hecho: los pacientes con tumores del grupo I (resecados completamente en la primera cirugía) y con una patología de pronóstico favorable (RMS embrionario) tienen respuestas muy favorables sin radioterapia, es decir, mediante la cirugía y una quimioterapia complementaria. Sin embargo, los pacientes con tumores del grupo I pero de tipo histológico desfavorable (RMS alveolar), en los que es más probable que aparezca una recidiva, y los que se clasifican en los grupos II, III y IV se tratan sistemáticamente con radioterapia, además de la cirugía y la quimioterapia complementaria (Wolden SL, 1999).

II. 2. 3. Quimioterapia

La quimioterapia se utiliza para el tratamiento de todos los pacientes con RMS. La cantidad, tipo de fármacos y duración dependerá del análisis de los factores de riesgo. Puede tratarse de quimioterapia neoadyuvante (suministrada antes del proceso quirúrgico) o adyuvante (después de la cirugía). La forma de tratamiento dependerá del pronóstico esperado en cada caso (National Cancer Institut U.S, 2005).

➔ Pacientes de bajo riesgo (RMS en estadio I, con el tumor completamente resecado, grupo I o con enfermedad microscópica residual, grupo II): para los pacientes con el pronóstico más favorable el objetivo del tratamiento es mantener altas las tasas de supervivencia (>90%) y al mismo tiempo reducir las consecuencias de la quimioterapia a largo plazo. Las combinaciones de fármacos más utilizadas en este caso son Vincristina + Dactinomicina.

➤ Pacientes con riesgo intermedio (RMS embrionario con enfermedad residual macroscópica, grupo III; pacientes menores de 10 años con RMS metastático; RMS alveolar no metastático): la tasa de supervivencia que se obtienen en estos pacientes es del 55% al 70%. La quimioterapia estándar para estos pacientes consiste en la combinación de los fármacos Vincristina + Dactinomicina + Ciclofosfamida (terapia VAC).

➤ Pacientes de alto riesgo (con metástasis en el momento del diagnóstico): constituyen aproximadamente el 15% de los niños con RMS, cuyo pronóstico no ha mejorado significativamente en los últimos 15 años. La supervivencia total de estos pacientes no supera el 25%, aunque algunos grupos de tratamiento actuales han mejorado esta cifra. En el estudio IV del IRS (comité de SPB del grupo de oncología infantil –COG–) se ha utilizado dobles combinaciones de fármacos (ifosfamida + etopósido o vincristina + melfalán) antes del tratamiento convencional con VAC, pero no se han obtenido mejoras significativas en la supervivencia (Brenemann JC, 2003). En los estudios de la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica (SIOP) dentro del grupo que estudia los tumores mesenquimales malignos (MMT), se han utilizado la intensificación de la terapia estándar IVA (ifosfamida + vincristina + adriamicina) con melfalán a altas dosis como estrategia terapéutica para este grupo de pacientes. Sin embargo, la supervivencia total no ha mejorado con esta megaterapia, por lo que no se recomienda en el tratamiento del RMS metastático (Carli M, 1999).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por los grupos cooperativos de tratamiento del RMS y SPB (IRS, MMT, CWS), el tratamiento de los pacientes con RMS continúa evolucionando y se adapta continuamente a los nuevos resultados, sin poder establecer una terapia estándar absoluta. Esta evolución de los tratamientos ha permitido mejorar la supervivencia en estas últimas décadas y continuará en el futuro. En general, las combinaciones terapéuticas VAC y IVA parecen tener una efectividad similar y pueden considerarse como las terapias de referencia para la mayoría de los RMS infantiles. Es necesario mejorar la selección de los niños que pueden ser tratados con una terapia menos intensiva (VA +

radioterapia) para evitar las secuelas de los agentes alquilantes y las antraciclinas a largo plazo. Por otro lado, también se concluye que el tratamiento local es una parte fundamental en el tratamiento del RMS, pero que en los niños también deben ser tenidas en cuenta las secuelas a largo plazo de una cirugía o radioterapia muy agresiva. Aunque es posible curar un 30% de los pacientes sin la utilización de la radioterapia, solo se identificará una pequeña parte de ellos en el momento del diagnóstico. Por este motivo, es necesario mejorar los sistemas que puedan identificar a esta población de pacientes, de pronóstico favorable, en los que se pueden evitar los efectos secundarios de la radioterapia.

La tasa de curación de pacientes con RMS metastático es extremadamente baja, ya que hasta el momento no se ha encontrado una terapia satisfactoria. Es necesario buscar nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la tasa de supervivencia de este tipo de pacientes (Gallego M, 2005).

II. 3. GLUTATIÓN

El glutatión (γ -glutamilcisteinilglicina, GSH), descubierto en 1888 por Rey-Pailhade, es un tripéptido ampliamente distribuido en la mayoría de las células eucariotas y en muchas procariotas (Meister, 1983), siendo el tiol intracelular más abundante (0.2-10 mM).

Dentro del organismo, el hígado es el órgano con mayor nivel de GSH; de hecho, los hepatocitos están altamente especializados en la síntesis de este tripéptido, el cual se encuentra presente en estas células a concentraciones elevadas (10 mM). De este modo, además de la utilización del GSH para sus funciones, el hígado se encarga de exportar grandes cantidades al torrente sanguíneo, siendo la fuente más importante de este tripéptido para otros tejidos del organismo como el riñón o el pulmón (Lu, 1999).

A continuación, se analizan las características estructurales, biosíntesis, degradación y las principales funciones del GSH.

II. 3. 1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

La composición y estructura del GSH fueron determinadas por primera vez por Hopkins en 1921 (Hopkins, 1921). El GSH es un tripéptido de glutamato, cisteína y glicina con un enlace peptídico γ , poco frecuente, entre el glutamato y la cisteína, y con un grupo tiol en este último aminoácido. Estas dos características estructurales, el enlace peptídico γ y el grupo tiol, son esenciales para el conocimiento de sus propiedades [Figura 4].

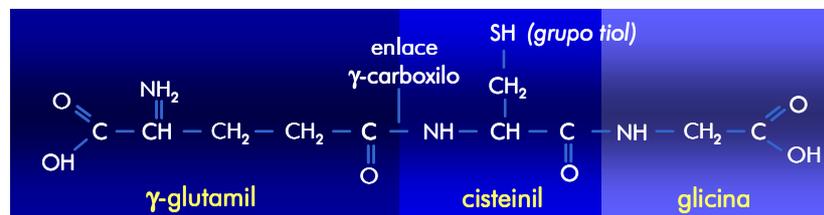


Figura 4. Estructura del glutati3n (γ -glutamilcisteinilglicina, GSH).

El enlace γ -carboxilo entre el glutamato y la cisteína confiere al GSH su estabilidad dentro de la célula, ya que evita su degradación por parte de las peptidasas intracelulares –actúan sobre los enlaces α -carboxilo– estando sólo sujeta a la hidrólisis extracelular por parte de la enzima γ -glutamyltranspeptidasa (GGT) localizada en la superficie externa de la membrana plasmática. Por otro lado, la región carboxilo terminal de la glicina protege a la molécula contra la acción de la enzima intracelular γ -glutamylciclotransferasa –los sustratos de esta enzima son los γ -glutamyl-aminoácidos que transforma el resto glutamilo en 5-oxoprolina–. De este modo, se evita la degradación intracelular del GSH, siendo únicamente metabolizado extracelularmente. Por su parte, el grupo sulfidri1o es requerido para las múltiples funciones en las que se encuentra implicado dicho tripéptido.

El glutatión puede encontrarse, principalmente, en dos formas moleculares: glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG). El GSSG está integrado por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro. El GSH intracelular, puede transformarse en GSSG y viceversa por dos tipos de reacciones [Figura 5]:

1. Reacciones en las que se produce la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otros peróxidos, catalizadas por una enzima dependiente de selenio, la glutatión peroxidasa.
2. Reacciones de transhidrogenación, en las cuales la reducción de GSSG a GSH es catalizada por la enzima GSSG reductasa (Anderson, 1998; Wu, 2004).

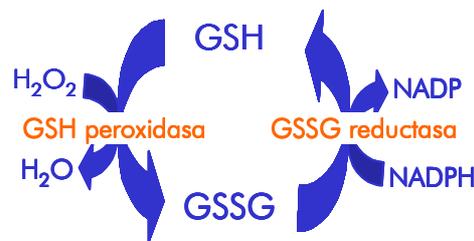


Figura 5. Proceso de oxidación-reducción del glutatión.

Las células eucariotas poseen tres reservorios principales de GSH. Casi el 90% del GSH intracelular se encuentra en el citosol, el 10% en las mitocondrias y un pequeño porcentaje en el retículo endoplasmático. En este último, la relación GSH/GSSG es de 3:1, mientras que en el citoplasma y en las mitocondrias dicha proporción supera incluso la relación 10:1 (Lu, 1999).

II. 3. 2. BIOSÍNTESIS Y DEGRADACIÓN: CICLO DEL γ -GLUTAMILO

La biosíntesis y degradación del GSH se integra en el denominado ciclo del γ -glutamilo [Figura 6], el cual implica el transporte del GSH al espacio extracelular y de los γ -glutamil-aminoácidos al espacio intracelular.

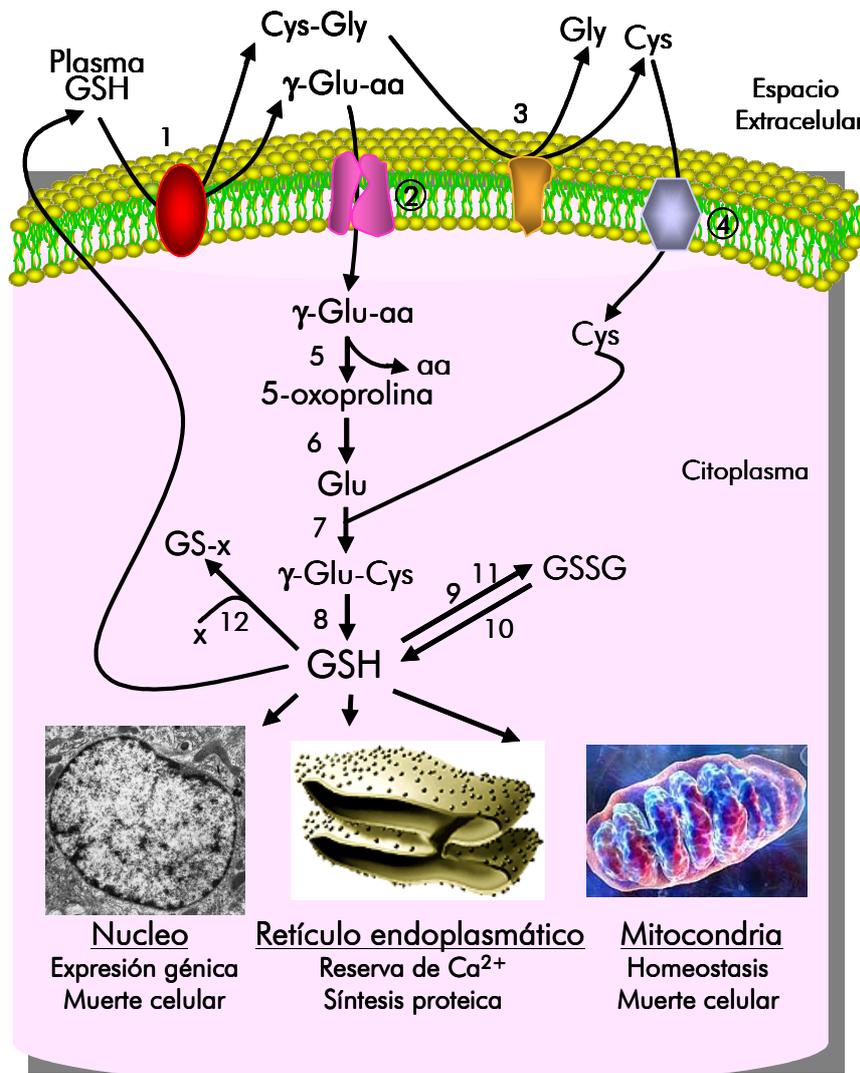


Figura 6. Ciclo del γ -glutamilo. aa: aminoácidos, x: moléculas a los que se conjuga el GSH, (1) γ -glutamyltranspeptidasa; (2) enzima transportadora de γ -glutamilaminoácidos; (3) dipeptidasas; (4) enzima transportadora de Cys; (5) γ -Glu-ciclotransferasa; (6) 5-oxoprolinasa; (7) GCS; (8) GSH sintetasa; (9) GSH peroxidasa; (10) GSH reductasa, (11) transhidrogenasas; (12) GSH transferasa (Estrela JM, 2006).

El GSH se sintetiza intracelularmente por dos reacciones consecutivas catalizadas por las enzimas γ -glutamilcisteína sintetasa o γ -GCS (Reacción a) y GSH sintetasa (Reacción b)[Figura 7]:

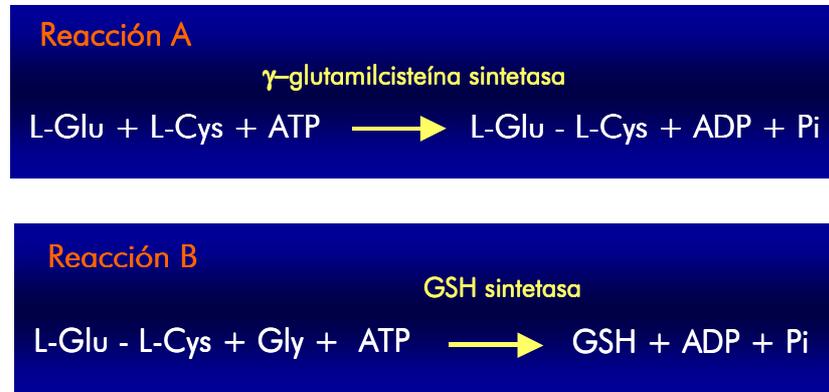


Fig. 7. Reacciones de síntesis del GSH catalizadas por las enzimas γ -glutamilcisteína sintetasa y GSH sintetasa.

A su vez, según el contenido intracelular de GSH, la síntesis de este tripéptido puede ser inhibida mediante un mecanismo de retroalimentación negativa de la enzima γ -GCS, obteniendo así, un equilibrio intracelular adecuado del mismo.

El GSH puede ser exportado fuera de la célula, si bien los aminoácidos que lo componen pueden ser de nuevo incorporados a la misma, gracias a una reacción de transpeptidación catalizada por la enzima GGT, glucoproteína que, como se ha señalado anteriormente, se localiza en la cara externa de la membrana plasmática. Dicha reacción de transpeptidación tiene lugar en presencia de aminoácidos, dando lugar a γ -glutamil-aminoácidos y cisteinilglicina (Cys-Gly). Los γ -glutamil-aminoácidos son transportados al interior de la célula, mientras que en el caso de cisteinilglicina se requiere la ruptura previa por medio de una dipeptidasa, presente también en la cara externa de la membrana plasmática, permitiendo, así, su incorporación posterior al interior celular (Meister, 1991; Wu, 2004).

Los γ -glutamil-aminoácidos constituyen el sustrato de la enzima γ -glutamilciclotransferasa, que transforma el residuo de glutamilo en 5-oxoprolina, liberándose el resto de los aminoácidos. A continuación, por la acción de la enzima 5-oxo-L-prolinasa (5-OPasa), la 5-oxoprolina se transforma en glutamato, reacción

que lleva consigo gasto de ATP. El ciclo se completa con la acción, de nuevo, de la γ -GCS y la GSH sintetasa (Meister, 1991; Wu, 2004).

El ciclo γ -glutamilo se encuentra integrado en las diferentes vías metabólicas del GSH. La formación de productos GSH S-conjugados que se producen durante las funciones de detoxificación intracelular, puede tener lugar por la reacción no enzimática de compuestos electrofílicos exógenos, o bien, por la acción de las enzimas Glutación S-transferasas (GST) [Figura 8].

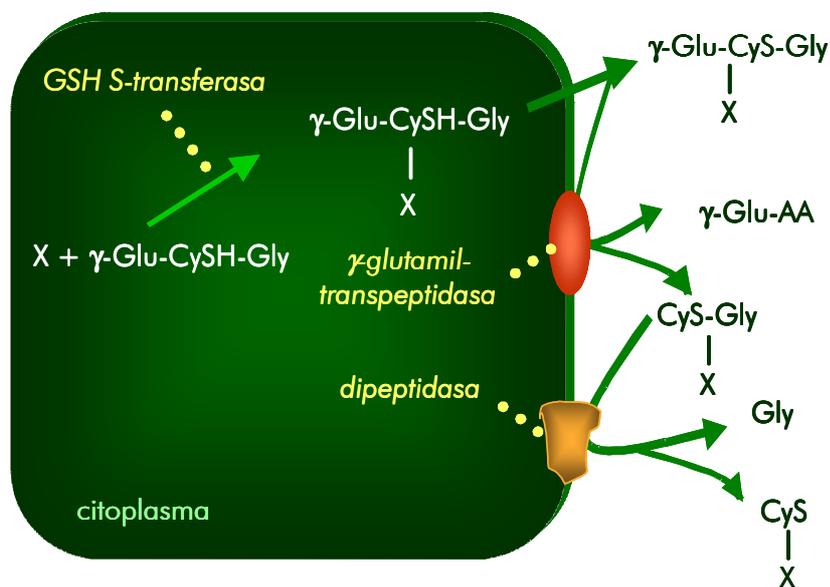


Figura 8. Función detoxificadora del GSH.

Como ha sido anteriormente señalado, la GGT puede catalizar la transformación de estos compuestos GSH S-conjugados en γ -glutamil-aminoácidos y cisteinilglicina con el azufre sustituido (Cys(X)-Gly). Este último producto puede escindirse en glicina y cisteína S-sustituido por la acción de las dipeptidasas. La cisteína S-conjugado tras sufrir N-acetilación, da lugar a la formación de ácido mercaptúrico, reacción ésta que se produce, principalmente, a nivel renal (Meister, 1991; Lu, 1999).

II. 3. 3. FUNCIONES DEL GLUTATIÓN

Debido a sus características estructurales, el GSH participa en numerosos procesos esenciales para la fisiología celular. El GSH y sus enzimas relacionados se encuentran implicados de forma fundamental en la proliferación celular, participando en el control del ciclo celular y en la síntesis y reparación de DNA, y en la síntesis de proteínas (Higuchi, 2004). Otra de sus funciones importantes es la protección celular frente a los radicales libres, compuestos reactivos del oxígeno, compuestos tóxicos endógenos y exógenos, carcinógenos, así como en la defensa celular frente a los efectos producidos por la radiación y algunos quimioterápicos como los agentes alquilantes (Meister, 1983; Anderson, 1998). Además, su capacidad de actuación como agente reductor y antioxidante hace del GSH un componente esencial para el mantenimiento de la integridad de los componentes proteínicos y lipídicos celulares (Meister, 1991)

II. 3. 3. 1. Control del ciclo celular

El GSH interviene en el control del ciclo celular por medio de la regulación de los siguientes procesos:

II. 3. 3. 1.1. Síntesis de ADN

Para la síntesis de ADN se requiere la formación de desoxirribonucleótidos a partir de ribonucleótidos. En este proceso están implicadas las enzimas ribonucleótido reductasa, tiorredoxina, tiorredoxina reductasa y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como cofactor.

Tras aceptar electrones del NADPH, la tiorredoxina, proteína con dos tioles en su centro activo, lleva a cabo la reducción de los ribonucleótidos. Para ello, es preciso el mantenimiento de niveles adecuados de GSH intracelular de forma que no se produzca la oxidación de los tioles presentes en el centro activo de la tiorredoxina (Meister, 1983; Wu, 2004).

Además, el GSH se encuentra implicado en la síntesis de ribonucleótidos, de una forma más directa, a través de la función de la glutarredoxina (Bjornstedt, 1997). Ésta es una proteína de bajo peso molecular que actúa como donante de equivalentes reductores en el proceso de reducción de ribonucleótidos. En esta reacción, el GSH es oxidado a GSSG, el cual es de nuevo reducido a GSH por la glutatión reductasa (Meister, 1983).

II. 3. 3. 1. 2. Transporte de aminoácidos

En las células proliferativas es fundamental el transporte de aminoácidos en la parte media y final de la fase G1 del ciclo celular para la progresión de las células hacia la fase de síntesis. Se ha demostrado que el transporte de aminoácidos al espacio intracelular puede llevarse a cabo por un mecanismo en el que está implicado el GSH. Este mecanismo consiste en la formación de γ -glutamil-aminoácidos en el espacio extracelular, en una reacción catalizada por la GGT en presencia de GSH, que funciona como donador del grupo γ -glutamilo. Los γ -glutamil-aminoácidos son posteriormente transportados al interior de la célula (Deneke, 1989; Anderson, 1998).

II. 3. 3. 1. 3. Homeostasis del Ca^{2+}

La unión de los factores de crecimiento –por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico, EGF, o el factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF– a sus receptores presentes en la membrana plasmática, desencadena una serie de reacciones citoplasmáticas que implican a fosfolípidos, como el inositol trifosfato (InsP3) y el diacilglicerol (DG) intracelulares. El DG controla el aumento de pH intracelular, mientras que el InsP3 controla los niveles de Ca^{2+} intracelular – extrae el calcio de sus depósitos intracelulares– actuando como segundos mensajeros.

Si bien la liberación del Ca^{2+} mitocondrial depende principalmente de la oxidación de NADPH, la movilización de los depósitos de Ca^{2+} del retículo endoplasmático depende del estado redox tiólico y, por lo tanto, del contenido intracelular de GSH (Jewell, 1982; Thanislass, 1995).

II. 3. 3. 2. Síntesis proteica

Múltiples estudios han demostrado que para la síntesis de proteínas se requiere unos niveles óptimos de GSH, de manera que la disminución del GSH o el incremento de GSSG provocan una inhibición de dicha síntesis proteica. El GSH actúa, además, como reservorio intracelular de cisteína, evitando la elevada toxicidad que produce este aminoácido en forma libre (Meister, 1983).

II. 3. 3. 3. Modulación de proteínas implicadas en la regulación de la expresión génica

Como se ha señalado anteriormente, la estimulación celular por algunos factores de crecimiento se produce por la hidrólisis del fosfatidil inositol difosfato en InsP3 y DG. El DG activa a la PKC, proteína citoplasmática que, a su vez, fosforila proteínas específicas implicadas en diferentes procesos fisiológicos, principalmente de secreción y proliferación. La PKC es una proteína rica en cisteína, que contiene grupos sulfidrilos libres en su estructura. El mantenimiento de estos tioles en estado reducido requiere la existencia de unos niveles de GSH intracelular adecuados que eviten la formación de puentes disulfuro no deseados. Así, por ejemplo, se ha demostrado que cuando se mantienen bajos los niveles de GSH intracelular, la actividad de la PKC se encuentra inhibida. Un estado de estrés oxidativo mantenido puede provocar modificaciones en la estructura de las proteínas quinasas, disfunción que puede inhibir la proliferación celular, causando, incluso, la muerte celular por apoptosis (Pellicer, 1994; Gopalakrishna, 2000).

II. 3. 3. 4. Degradación intralisosómica y citoplasmática de proteínas

Se ha demostrado que el GSH está involucrado en el mantenimiento de la integridad de las membranas lisosómicas. A su vez, la degradación intralisosómica de las proteínas precisa del mantenimiento de niveles adecuados de GSH, el cual participa en la reducción no enzimática de los puentes disulfuro de las enzimas intralisosómicos.

Por otro lado, la degradación citosólica de las proteínas es llevada a cabo por complejos enzimáticos multicatalíticos (la multipaína, la proteasoma y la enzima degradador de conjugados de ubiquinina), los cuales son tiol-dependientes, y por lo tanto, muy susceptibles a las variaciones del estado redox intracelular (Meister, 1983).

II. 3. 3. 5. Cofactor enzimático

El GSH también actúa como cofactor de diversas enzimas como la enzima GSH-peroxidasa (detoxifica el peróxido de hidrógeno y otros peróxidos), la GSH-transhidrogenasa (convierte el dihidroascorbato a ascorbato, ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos y enlaces S-S a SH), GST (transfiere el agente citotóxico a la molécula de GSH con el fin de detoxificarla) y de otras enzimas como la glioxilasa, formaldehído dehidrogenasa y la fumarilacetoacetato isomerasa, así como las enzimas encargadas de la isomerización de prostaglandinas y de la conversión de tirosina a 3,3'5'-triodotirosina (Anderson, 1998; Lu, 1999).

II. 3. 3. 6. Protección frente al estrés oxidativo

Como consecuencia del metabolismo aerobio de las células, se producen radicales libres derivados del oxígeno como son los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxilo (OH^{\cdot}). El radical $O_2^{\cdot-}$ es convertido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la superóxido dismutasa. A su vez, el H_2O_2 puede ser detoxificado por la catalasa o

por la glutatión peroxidasa. Esta última utiliza el GSH como sustrato donador de equivalentes reductores, oxidándose a GSSG (Anderson, 1998; Wu, 2004).

El GSH tiene también una función importante en el mantenimiento de la integridad celular protegiendo las membranas celulares frente al estrés oxidativo, impidiendo así, su peroxidación lipídica (Casini, 1987; Comporti, 1987). Además, puede reparar el daño oxidativo causado en las proteínas de membrana al reducir los puentes disulfuro, tanto intercatenarios como intracatenarios, de las mismas. Todo ello supone la oxidación de GSH a GSSG, que a su vez, y en presencia de NADPH, es de nuevo reducido a GSH por la glutatión reductasa.

II. 3. 3. 7. Radioprotección

La implicación de los tioles en los mecanismos de radioprotección celular tuvo su confirmación experimental en los años sesenta, al ser posible correlacionar cambios en los niveles celulares de GSH con variaciones en la radiosensibilidad de muchos tipos celulares (O'Dwyer, 1995; Emonet, 1997).

Las radiaciones ionizantes pueden interaccionar con el agua intracelular, dando lugar a compuestos reactivos del oxígeno, radicales libres y peróxidos. Los radicales hidroxilo son extremadamente reactivos y pueden interaccionar con los grupos tioles provocando la formación de radicales libres mucho menos reactivos, los cuales posteriormente pueden dimerizarse. Así, si el GSH está presente en concentraciones fisiológicas, el efecto biológico inducido por las radiaciones ionizantes puede ser, en gran medida, disminuido (Shimizu, 1998).

II. 3. 3. 8. Detoxificación

En los procesos de detoxificación, las células metabolizan las sustancias tóxicas con la finalidad de reducir su acción nociva y facilitar su excreción. Estos mecanismos de detoxificación se clasifican en reacciones de fase I y de fase II. Las

reacciones de fase I consisten en procesos de oxidación, reducción, hidroxilación e hidrólisis, mientras que las reacciones de fase II son reacciones de conjugación.

Entre estos últimos, se incluye la conjugación de numerosos metabolitos con el GSH, el cual de forma no enzimática o a través de la enzima GST provoca la solubilización de dichos metabolitos, facilitando, de esta manera, su excreción celular (Anderson, 1998; Lash, 2005).

Mediante esta función detoxificadora, el GSH protege a importantes macromoléculas celulares, como el ADN, de la acción producida por los agentes citotóxicos, como los agentes alquilantes. En consecuencia, el contenido intracelular de GSH determina, en parte, el grado de toxicidad y de respuesta celular que puede derivarse de un tratamiento antitumoral (Chen, 1998; Serrone, 1999).

II. 3. 4. MODULACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATIÓN

Se ha observado que diversas enfermedades, como el SIDA, la hepatitis C o el Parkinson, están asociadas a alteraciones en los niveles de este tiol o de sus enzimas relacionados. Por ello, se ha planteado que la utilización de agentes moduladores del GSH podría ser útil en el tratamiento de ciertas patologías (Droge, 1993; White, 1994; Adams, 2001).

II. 3. 4. 1. AGENTES QUE INCREMENTAN LOS NIVELES DE GSH

La inducción de un incremento de los niveles de GSH intracelular puede tener efectos terapéuticos cuando los niveles de este tiol están disminuidos. Entre las sustancias utilizadas para el incremento de este tripéptido podrían citarse:

GSH monoéster

Se ha comprobado en una gran variedad de condiciones experimentales que la utilización de GSH per se, no es efectiva para el aumento de los niveles de este

tripéptido, ya que presenta dificultad en su transporte hacia el interior de la célula. La administración de GSH incrementa los niveles de este tiol en el plasma y en la orina, sin aumentar en los tejidos (Anderson, 1998).

Sin embargo, su análogo monoéster es capaz de penetrar a través de la membrana plasmática celular y, mediante la acción de una esterasa, hidrolizarse a GSH y etanol. Estudios realizados por Meister en 1983, mostraron que el tratamiento en ratones con GSH monoéster protegía contra la toxicidad producida por el acetaminofeno, melfalán, ciclofosfamida y radiaciones ionizantes. Sin embargo, la aplicación con GSH éster sólo es posible durante un corto periodo de tiempo, ya que su administración prolongada produce toxicidad atribuida, principalmente, a iones metálicos (Anderson, 1989; Levy, 1993).

GSH diéster

Esta molécula es transportada más efectivamente que el GSH monoéster al interior de las células, como se ha demostrado en eritrocitos, linfocitos y fibroblastos humanos y en células tumorales de ovario. Una vez en el interior celular, se hidroliza a GSH monoéster a través de una diesterasa. Diversos estudios sugieren que la administración de GSH diéster aumenta, en mayor medida, los niveles de GSH en el hígado que el tratamiento con GSH monoéster (Anderson, 1998).

Metionina

La ruta de la cistationina sintasa es una vía que permite a los hepatocitos utilizar la metionina para sintetizar cisteína. Esta vía no es activa en determinadas células, en neonatos, ni en pacientes con enfermedades hepáticas (Anderson, 1998).

γ -Glutamilcisteína

Esta sustancia es el sustrato limitante de la enzima GSH sintetasa. La γ -glutamilcisteína se transporta al interior celular y por medio de la GSH sintetasa se produce la síntesis de GSH.

Se ha observado que la administración *in vivo* de esta sustancia incrementa los niveles intracelulares de GSH de forma óptima a nivel cerebral, mientras que para el transporte al interior celular de otros órganos, es necesaria la utilización de γ -glutamilcisteína-etil ésteres (Pileblad, 1992).

N-acetilcisteína

La administración directa de cisteína –factor limitante en la biosíntesis de GSH– puede producir un aumento intracelular de los niveles de GSH; sin embargo, su rápida oxidación a una sustancia poco soluble, la cistina, da lugar a la formación de radicales libres y, en consecuencia, a importantes efectos citóxicos, como se ha demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo* (Nishiuch, 1976; Anderson, 1997). En cambio, la administración en forma N-acetilada, N-acetilcisteína (NAC) [Figura 9], es fácilmente transportada al interior celular y mediante su metabolización a través de una N-acetilasa se transforma en cisteína, lo que posibilita el posterior aumento de GSH (De Flora, 2001).

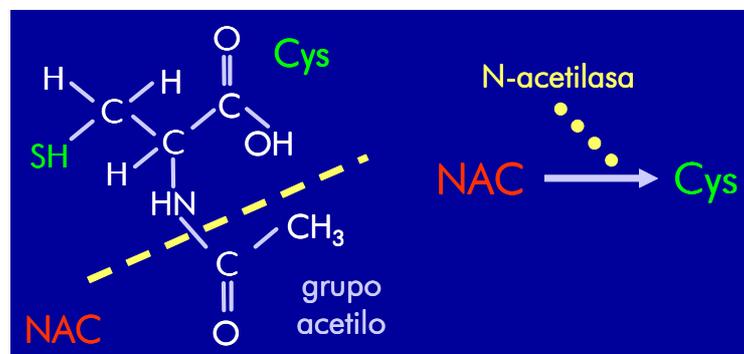


Figura 9. Estructura de la N-acetilcisteína (NAC).

Por otro lado, la NAC puede también, mediante conjugación directa, neutralizar radicales libres (van Zandwijk, 1995).

La NAC ha sido utilizada en diferentes patologías, como por ejemplo en pacientes con SIDA (Cayota, 1996; Akerlund, 1997), si bien su administración da lugar a efectos secundarios como náuseas, vómitos, diarreas y broncoespasmos (De Rosa, 2000).

Tiazolidinas

Las tiazolidinas (TDs) son sustancias formadas mediante la condensación de cisteína con compuestos carbonilos. Entre estas sustancias se pueden citar la 2-metiltiazolidina carboxilato, la 2-metiltiazolidina-4-carboxilato, la 2-metiltiazolidina-2,4-ácido dicarboxílico, la 4-tiazolidina carboxilato y la L-2-oxo-4-tiazolidina carboxilato –OTZ– (Wlodek, 1995). Esta última sustancia es un análogo de la 5-oxoprolina, la cual es un sustrato específico para la enzima 5-OPasa que forma parte del ciclo γ -glutamilo del GSH [Figura 10]. El producto de la reacción es la S-carboxicisteína, que posteriormente, se hidroliza a cisteína y CO_2 .

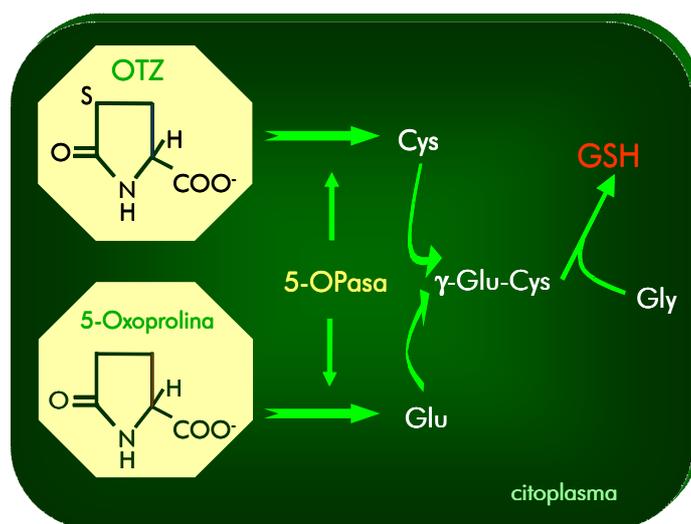


Figura 10. Metabolismo del L-2-oxo-4-tiazolidina carboxilato (OTZ) y de la 5-oxo-L-prolina mediante la 5-OPasa.

II. 3. 4. 2. AGENTES QUE DISMINUYEN LOS NIVELES DE GSH

Entre los compuestos utilizados en investigaciones toxicológicas, se encuentran una serie de sustancias oxidantes inespecíficas que disminuyen de forma rápida los niveles intracelulares de GSH, con el consecuente aumento de los niveles GSSG y la oxidación de proteínas y otros compuestos celulares. Entre estos elementos se pueden citar los siguientes:

- Diamida (Kosower, 1969)
- t-Butilhidroperóxido (Plummer, 1981)
- Dietilmaleato (Deneke, 1985)
- Diisopropilidín acetona –foron– (Yoshida, 1987)

La utilización de estas sustancias en estudios *in vivo* ha demostrado producir toxicidad multiorgánica, a través de peroxidaciones lipídicas, disfunciones microsomales e inhibición de la síntesis proteica, entre otros efectos intracelulares.

Un segundo grupo de sustancias son los aminoácidos sulfoximina, los cuales provocan la disminución de GSH a través de la inhibición de su síntesis, mediante el bloqueo de la actividad de las enzimas γ -GCS y/o la enzima glutamina sintetasa. Entre estos aminoácidos, cabe destacar la metionina sulfoximina (MSO) que inhibe las enzimas citadas anteriormente, y la γ -etil metionina sulfoximina (γ -EtMSO), la cual inhibe solamente la enzima glutamina sintetasa (Meister, 1991).

Estudios realizados *in vivo* han demostrado que la administración de estas sustancias produce convulsiones y efectos letales, limitándose su utilización a los ensayos experimentales (Meister, 1991). Sin embargo, la sustancia más utilizada, no sólo en experimentación básica sino también en ensayos clínicos, es la L-butionina-[S,R]-sulfoximina –BSO– [Figura 11], un potente inhibidor de la γ -GCS.

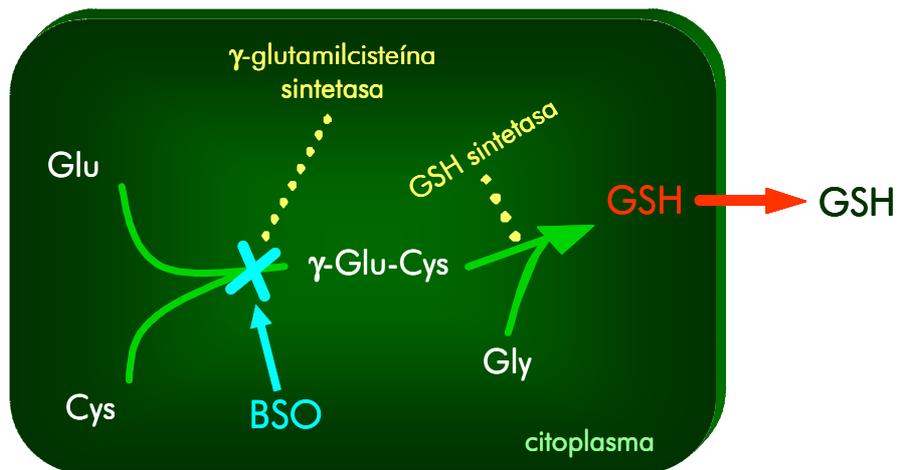


Figura 11. Inhibición de la γ -Glutamilcisteína sintetasa mediante la L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO).

El tratamiento con BSO reduce los niveles de GSH en la mayoría de los tejidos y en el plasma sanguíneo, así como en gran variedad de tumores. Se ha demostrado que el tratamiento previo con BSO, a través de la disminución de GSH, sensibiliza a las células tumorales resistentes al tratamiento con drogas citotóxicas, como los compuestos de platino y agentes alquilantes, y con radiaciones ionizantes (Bailey, 1998).

Ahora bien, el tratamiento prolongado con BSO produce también una importante toxicidad consistente en náuseas y vómitos, inmunosupresión, alteración hepática, renal, pulmonar y del sistema nervioso central, entre otros efectos (Meister, 1991; Bailey, 1998).

II. 3. 5. GLUTATIÓN Y PATOLOGÍA

II. 3. 5. 1. INFLUENCIA DEL GLUTATIÓN EN LA PATOLOGÍA NO TUMORAL

Diversos estudios han demostrado que existen una serie de enfermedades asociadas a la disminución de los niveles del GSH, como es el caso del SIDA (Lomaestro, 1995; Wu, 2004). En los pacientes afectados por esta enfermedad se ha observado una disminución de este tiol, provocada por la deficiencia de cisteína en las células polimorfonucleares de sangre periférica, reducción que es más acusada conforme progresa la enfermedad (Herzenberg, 1997; Look, 1997; Nakamura, 2002). Esta deficiencia sistémica de GSH contribuye a incrementar la replicación vírica, además de aumentar la producción de agentes oxidantes por las células inflamatorias, incrementando así, la disfunción del sistema inmune (Holroyd, 1993; Nakamura, 2002).

De igual forma, los pacientes con hepatitis C presentan también disminución de este tiol en las células polimorfonucleares de sangre periférica (Boya, 1999). Asimismo, otras patologías como la diabetes tipo II (Forrester, 1990), la colitis ulcerosa (Keshavarzian, 1995), la enfermedad de Crohn (Iantomasi, 1994), la fibrosis pulmonar idiopática (Cantin, 1989), el síndrome de distrés respiratorio (Pacht, 1991), la cirrosis (Loguercio, 1992; Fernández-Checa, 2005) y las cataratas (Calvin, 1986) se han asociado con insuficientes niveles de este tiol.

Por otro lado, la disminución de los niveles de GSH puede estar provocada por la generación de metabolitos reactivos del oxígeno (MROS) los cuales se han relacionado con diferentes enfermedades. Entre éstas, cabe destacar la enfermedad de Alzheimer, en donde los MROS producen una peroxidación lipídica del cortex cerebral, habiéndose observado de forma concomitante una disminución del GSH en las áreas corticales (Jenner, 1994). Otras patologías asociadas al estrés oxidativo inducido por la generación de MROS son la enfermedad de Parkinson,

arterioesclerosis, síndrome de distrés respiratorio, SIDA y artritis reumatoide, entre otras (Adams, 1991; Martínez-Cayuela, 1995; Nakamura, 2002).

Finalmente, algunas enfermedades están asociadas con alteraciones enzimáticas relacionadas con el metabolismo del GSH. Así, los pacientes con deficiencia de la enzima GSH sintetasa presentan alteraciones cerebrales, acidosis y hemólisis, y en pacientes con la enzima γ -GCS disminuida, además de dichos efectos, padecen degeneración espino-cerebelar, neuropatía periférica, miopatía y aminoaciduria. Por otro lado, se ha observado hemólisis en pacientes con deficiencia de la enzima GSH peroxidasa en los eritrocitos (Meister, 1991).

Por lo tanto, la modulación de los niveles intracelulares de GSH puede ofrecer una terapia potencial para las enfermedades humanas asociadas a la deficiencia de GSH y al estrés oxidativo. De hecho, se ha propuesto la utilización de antioxidantes como el GSH, NAC, ascorbato, α -tocoferol, ácido lipólico, β -caroteno, así como la enzima superóxido dismutasa para la mejora del tratamiento de estas enfermedades (Larrea, 1998; Nakamura, 2002; Jaruga, 2002).

II. 3. 5. 2. GLUTATIÓN Y PATOLOGÍA TUMORAL

La conexión entre el contenido intracelular de GSH y la carcinogénesis ha sido perfectamente establecida (Estrela JM, 2006). En este sentido, se ha demostrado que la administración de carcinógenos induce un aumento de los niveles de GSH celular, así como de la actividad de la enzima GGT (Meister, 1983). Se ha observado también que múltiples tipos tumorales, como neoplasias de ovario (Lee, 1989), cabeza y cuello (Guichard, 1990), pulmón (Kawai, 2002), hepáticos (Ahmad, 1986), etc., presentan incrementada su capacidad para sintetizar GSH y que los niveles de este tripéptido están preferentemente más elevados cuando las células tumorales proliferan activamente (Russo, 1986; Obrador, 1997).

La evidencia de que el GSH es un factor determinante en la terapia del cáncer fue descubierta por los radiólogos en 1950, quienes observaron que la

disminución de los niveles de GSH sensibiliza a las células a la acción de las radiaciones ionizantes (O'Dwyer, 1995). En base a este hecho, la disminución de los niveles de GSH mediante la utilización de agentes reductores de este tripéptido o inhibidores de su síntesis, ha sido empleada como terapia adyuvante de la radio y quimioterapia del cáncer.

II. 4. LA ENZIMA γ -GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA (GGT)

La enzima GGT se encuentra presente en la membrana de todas las células normales, pero se expresa más activamente en la superficie luminal de células secretoras y absorbentes, como son las glándulas sudoríparas, glándula mamaria, próstata, los conductos de las glándulas salivares, los conductos y canalículos biliares, acinos pancreáticos, criptas intestinales, túbulos testiculares y túbulos proximales del riñón. En condiciones normales, se encuentra presente también en el suero donde se utiliza como marcador de enfermedades hepáticas (Hanigan MH, 1999). Diversos autores han asociado un aumento expresión de la GGT a medida que se induce la diferenciación celular (Yaagoubi M, 1995; Prezioso JA, 1993).

Como se ha mostrado en la figura 6, la GGT cataliza el primer paso de la degradación extracelular del GSH, es decir, produce la hidrólisis del enlace γ -glutamilo entre el glutamato y la cisteína. En este proceso se libera el dipéptido cisteinilglicina el cual se hidroliza por la acción de las dipeptidasas de membrana en cisteína y glicina. De esta manera se recupera la cisteína al interior celular, la cual es crítica para la síntesis proteica, especialmente en las células tumorales muy proliferativas. La actividad de la GGT confiere ventajas de proliferación y supervivencia a las células tumorales (Benlloch M, 2005).

La expresión de GGT se encuentra incrementada en los tumores, por lo que puede jugar una importante función en la utilización del GSH por parte de las células tumorales. De esta manera, bajas concentraciones de GSH extracelular son suficientes para mantener unos niveles intracelulares óptimos y, además, la reposición del GSH utilizado ocurre de forma más rápida (Rajpert de Meyts E,

1992). En sarcomas inducidos en ratas, se ha observado una utilización preferencial del GSH circulante en vez del tisular. Este fenómeno es dependiente de la actividad de la GGT, como así lo indican experiencias llevadas a cabo utilizando acivicina (inhibidor irreversible de la GGT; Hochwald SN, 1996).

Además la GGT previene a la célula de los daños causados por metabolitos reactivos del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido en los procesos metabólicos. La inducción del estrés oxidativo produce un incremento rápido de los niveles del RNA mensajero de la GGT, aumenta su expresión y hace más resistente a las células tumorales frente a terapias oxidativas (Choi J, 1996).

Por otro lado, el propio catabolismo del GSH mediado por la enzima GGT, produce niveles bajos de MROs (O_2^- , H_2O_2). En condiciones normales, el metabolismo celular produce niveles bajos de MROs, a través de la actividad de componentes de la cadena respiratoria mitocondrial, como el citocromo P450 y b5, la xantina oxidasa y los sistemas NADPH-oxidasa. Este moderado estrés oxidativo estimula la proliferación celular y protege a la célula frente a señales proapoptóticas (Maellaro E, 2000). Recientemente, se ha señalado la GGT como otra fuente de formación de MROs [Figura 12], y se ha demostrado una relación entre la actividad de la enzima, la producción de MROs, el mantenimiento del estado proliferativo y la prevención de la apoptosis (Enoiu M, 2000).

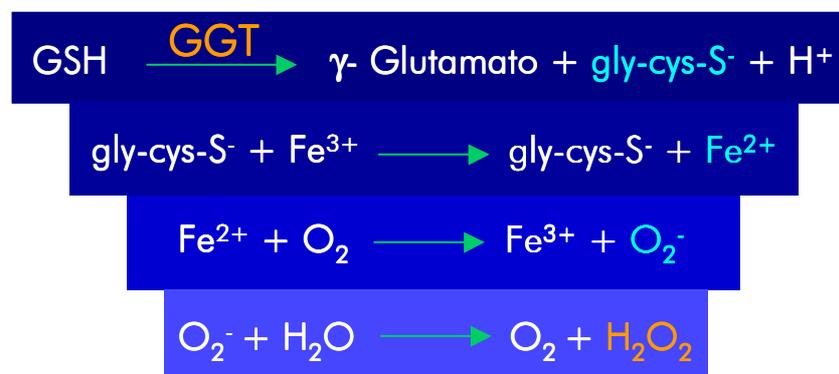


Fig. 12. Mecanismo de producción de MROs (O_2^- , H_2O_2) derivado de la actividad de la GGT (Djavaheri M, 2002).

El H_2O_2 derivado del catabolismo producido por la GGT, induce la actividad del factor de transcripción NF- κ B. Este factor juega un papel crucial en la regulación de genes implicados en la respuesta inmunitaria e inflamatoria, así como en los procesos de adhesión celular. Además, modula la respuesta celular antiapoptótica (Djavaheri M, 2002).

Por lo tanto, aquellas células tumorales con una mayor actividad de la GGT serán más proliferativas, tendrán una mayor capacidad de detoxificación frente a xenobióticos, aprovecharán de forma más eficiente los tioles extracelulares y evadirán más fácilmente las señales apoptóticas [Figura 13].

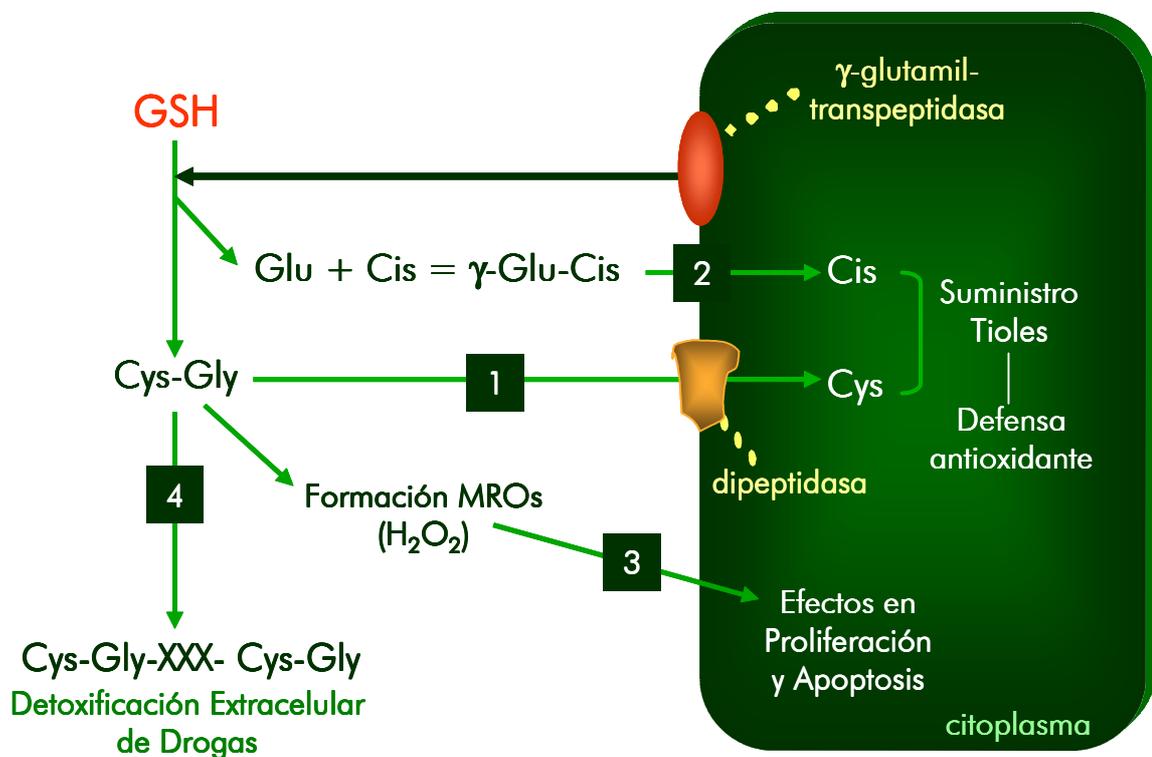


Fig. 13. Mecanismos a través de los cuales la actividad de la GGT interfiere en la sensibilidad de la célula frente a drogas antitumorales: (1) la cisteinil-glicina (Cys-Gly) originada por la escisión del GSH extracelular, se hidroliza por las dipeptidasas de membrana y la cisteína liberada puede ser transportada al interior de la célula; (2) el ácido glutámico liberado por la escisión del GSH puede reaccionar con cistina (Cis) para formar γ -Glu-Cis y en esta forma la cistina puede entrar en la célula; (3) los MROs producidos extracelularmente debido a la actividad de la GGT, pueden afectar al balance proliferación/apoptosis de la célula; (4) la cisteinil-glicina reacciona de forma rápida con xenobióticos (como el cisplatino) y la combinación disminuye la absorción celular del fármaco (detoxificación extracelular) (Pompella A, 2006).

Estudios con carcinógenos ponen en evidencia una inducción de la actividad GGT en células o áreas tisulares con expresión normalmente negativa. En estas áreas se produce una inducción de la proliferación (parece que mediada por el oncogen *ras*) (Pankiv S, 2006), con la consecuente aparición de un tumor maligno. Por este motivo, se considera a la enzima GGT como un *marcador* temprano de transformación neoplásica (Pompella A, 2006). Además, la expresión de la GGT puede estar relacionado con la progresión tumoral y las células tumorales positivas parecen presentar un fenotipo más resistente y agresivo. Además, la expresión de la GGT es considerada como parte del *fenotipo resistente* en células preneoplásicas, ya que como anteriormente se ha expuesto, esta enzima juega un papel esencial en el metabolismo del glutathion y en los sistemas celulares antioxidantes.

II. 5. AGENTES INDUCTORES DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR

Existe una relación compleja entre los procesos celulares que regulan la proliferación, diferenciación, transformación neoplásica, expresión génica y expresión de genes supresores de tumores. Existe una red de moléculas que interactúan para producir el balance correcto entre la diferenciación y la multiplicación celular. La transformación neoplásica representa una forma de pérdida de control de la proliferación pero no destruye el potencial de las células para diferenciarse, por lo que la terapia basada en la inducción de la diferenciación puede alterar las características del tumor hacia un estado de transición inestable (Szallasi Z, 2000). Esta terapia se fundamenta en la hipótesis de que el cáncer es un estado reversible con un proceso de maduración alterado, en el que el fenotipo transformado puede ser dirigido hacia formas benignas sin potencial proliferativo (Gómez-Vidal JA, 2004) mediante agentes diferenciadores farmacológicos.

LOS RETINOIDES

Los retinoides son análogos naturales y sintéticos de la vitamina A que regulan diferentes procesos biológicos entre los que se encuentran la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. El ácido retinoico (RA) es el derivado natural de

la vitamina A más potente y es esencial en diversas funciones biológicas como la proliferación, reproducción, desarrollo embrionario, diferenciación de tejidos epiteliales y en la respuesta inmunitaria (Langston AW, 1994).

II. 5. 1. Mecanismo de Acción

La isoforma natural más activa de la vitamina A es el ácido trans-retinoico o ATRA (all-trans retinoic acid), aunque también se utilizan otras como el ácido retinoico 9-cis (9-cis-RA), el 11-cis-RA y 13-cis-RA.

El ATRA entra en la célula por difusión simple o por la conversión del retinol absorbido del tracto gastrointestinal, quien en forma circulante se encuentra unido a proteínas RBPs (retinol binding proteins) e intracelularmente a las proteínas CRBPs (cellular retinol binding proteins). El ATRA puede ser metabolizado de forma inmediata mediante la unión a las proteínas CRABPs (cellular retinoic acid binding proteins) y oxidado en el retículo endoplasmático mediante la acción de las enzimas dependientes del citocromo P450 (CYPs – cytochrome P450 enzymes). Alternativamente, el ATRA y su isómero 9-cis-RA, pueden entrar en el núcleo y unirse a los receptores nucleares RAR y RXR, respectivamente. A continuación, se produce la activación de los receptores mediante la formación del heterodímero RAR-RXR o el homodímero RXR-RXR. De esta forma se unen a regiones muy afines del ADN o elementos RARE (retinoic acid responsive elements), que normalmente se encuentran en la zona del promotor de determinado gen, activando su transcripción (Njar VCO, 2006) [Figura 14].

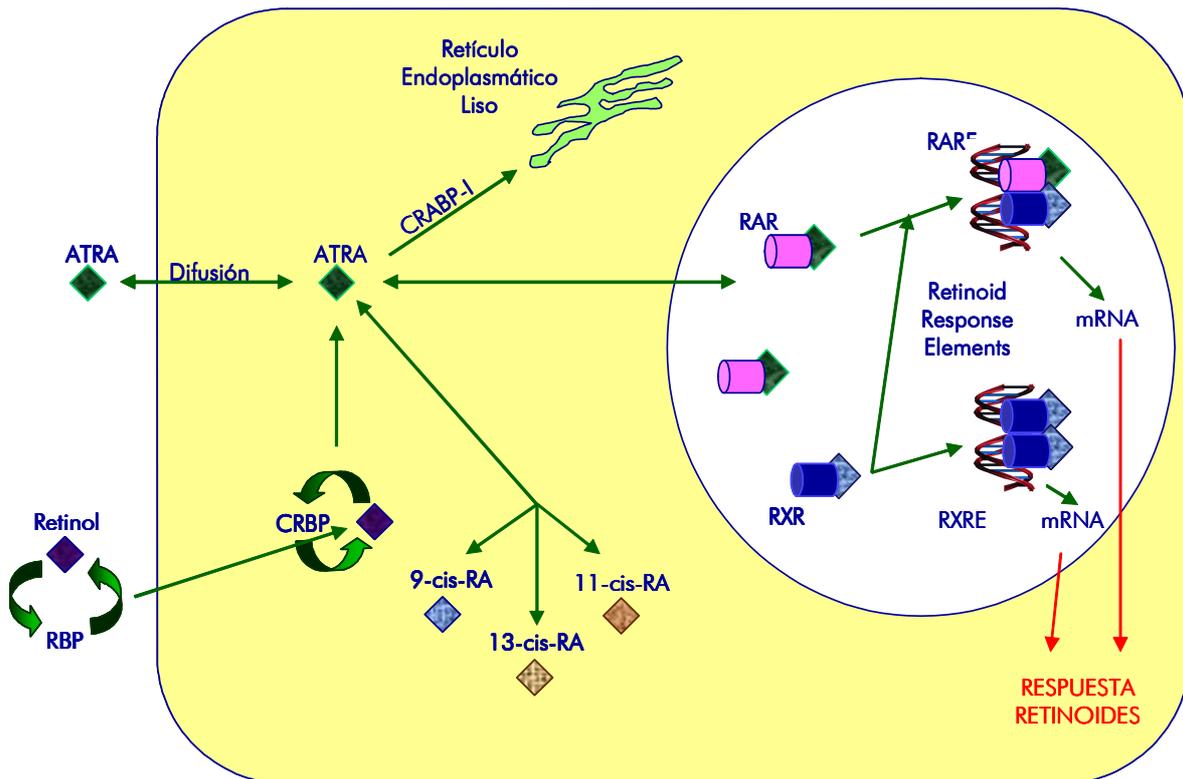


Fig. 14. Mecanismos de acción del ATRA (Njar VCO, 2006).

II. 5. 2. Los Receptores de los Retinoides

Los efectos biológicos diversos de los retinoides sobre la expresión génica está mediada por 6 receptores nucleares ($RAR\alpha$, $RAR\beta$ y $RAR\gamma$, $RXR\alpha$, $RXR\beta$ y $RXR\gamma$), los cuales son factores de transcripción dependientes de ligando y son miembros de la superfamilia de los receptores de las hormonas esteroideas/tiroideas. Estos receptores nucleares activan la transcripción uniéndose, en forma de heterodímeros RAR/RXR, a las secuencias RAREs localizadas en la región promotora de los genes diana o como homodímeros RXR/RXR a las secuencias RXREs. El ATRA puede unirse al receptor RAR pero no tiene afinidad por el RXR, sin embargo el 9-cis-RA es capaz de unirse a los dos tipos de receptores (Simeone AM, 2004).

En ausencia de RA, el dímero se une a la secuencia RARE en el promotor del gen y el receptor RXR se une a represores, los cuales producen efectos transcripcionales negativos en el gen diana, a través de la producción de cambios en la estructura de la cromatina. Cuando el RA se une al receptor, se produce un cambio de conformación en la zona de unión al ligando, de forma que moléculas activadoras sustituyen a los represores [Figura 15]. Se produce la apertura de la hebra de cromatina y la activación de la transcripción del gen asociado (Soprano DR, 2004).

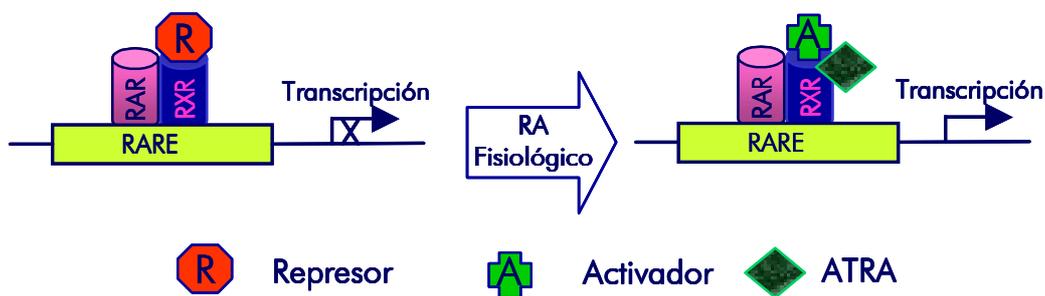


Fig. 15. Mecanismo de acción de los receptores del ATRA.

Normalmente existen niveles altos de ARN mensajero del receptor $RAR\alpha$ presentes en muchos tejidos, sin embargo, la expresión del receptor $RAR\beta$ es más específico dependiendo del tipo tisular. Los tres tipos de receptores RXR se expresan ampliamente en gran variedad de tejidos adultos, como mínimo una de las isoformas está presente en todos los tejidos examinados hasta el momento. Una adecuada expresión de los receptores es fundamental para la regulación de los procesos celulares. Alteraciones en dicha expresión se han asociado con el desarrollo de diversos tumores. Por ejemplo, en la leucemia promielocítica, se han observado traslocaciones en el gen $RAR\alpha$. Estas traslocaciones dan lugar a proteínas de fusión que no responden a las concentraciones fisiológicas del RA (Soprano DR, 2004). Asimismo, en otros tumores sólidos, como el carcinoma de pulmón, el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y en el cáncer de mama, se ha observado una pérdida de la expresión del receptor $RAR\beta$, el cual se sobreexpresa en células epiteliales mamarias normales. Estas evidencias sugieren que la expresión

del receptor RAR β juega un papel importante en los efectos antiproliferativos de los retinoides (Simeone AM, 2004).

II. 5. 3. Efectos celulares de los retinoides

El tratamiento con retinoides induce el proceso de diferenciación celular y de apoptosis y disminuye la capacidad proliferativa de las células tumorales.

En condiciones normales, los retinoides juegan un papel fundamental en la diferenciación terminal de los diferentes órganos durante la embriogénesis (Langston AW, 1994). Sus efectos sobre la diferenciación en las células tumorales se ha demostrado en numerosas ocasiones mediante la monitorización de moléculas características de un fenotipo diferenciado. En el caso de las células tumorales procedentes de RMS, conforme va transcurriendo el tratamiento con ATRA, se observa un incremento paulatino de la expresión de marcadores musculares, lo que sugiere una inducción hacia la dirección miogénica (Ogose A, 1995; Ramp U, 1994; Arnold HH, 1992).

El mecanismo principal por el cual el ATRA inhibe la proliferación celular consiste en la inducción de la detención del ciclo celular en la fase G1. Existen varios moduladores del ciclo celular, los cuales median la transición de la fase G1 de reposo a la fase S de síntesis. Entre éstos se encuentran la proteína del retinoblastoma (pRb, supresor tumoral), las ciclinas D y E, las ciclinas dependientes de kinasas (cdks) 2, 4 y 6 y sus inhibidores, p15, p16 y p21 (Wilcken NR, 1996; Weinberg RA, 1995; Planas-Silva MD, 1997). El efecto inhibitorio de la proliferación del ATRA se ha relacionado con su capacidad para disminuir la expresión de la ciclina D1 y D3, la actividad de cdk2 y cdk4 y la expresión y fosforilación de pRb. También los inhibidores de las cdk pueden estar regulados por el ATRA como se ha visto en el caso del p21. Así, el ATRA parece ejercer su efecto antiproliferativo mediante el bloqueo de la transición de la fase G1 a la S del ciclo celular (Yang L, 2001).

Por otro lado, se ha observado que el tratamiento con retinoides en células tumorales induce la formación de metabolitos reactivos del oxígeno (MROs) (Castro OS, 1996), los cuales pueden producir daño oxidativo en el ADN y mediar en el proceso apoptótico (Matés JM, 2000). Además, diversos estudios relacionan al RA con la inducción de TRAIL (ligando del factor de necrosis tumoral inductor de apoptosis) y la caspasa 8 en la leucemia promielocítica (Jiménez-Lara AM, 2004). Además se ha observado disminución de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y una inducción de la proteína proapoptótica p53 tras el tratamiento con RA en células tumorales prostáticas (Pasquali D, 1999).

El RA también se ha implicado en otros procesos celulares que son relevantes para su utilización en terapias antitumorales. Así, el tratamiento con RA se relaciona con un incremento en las uniones intercelulares tipo GAP (las cuales se van perdiendo durante el proceso de carcinogénesis) (Carystinos GD, 2001) y una inhibición de la expresión de los receptores de superficie celular para integrinas (Chattopadhyay N, 1999) y metaloproteinasas de la matriz extracelular, como la colagenasa (las cuales aumentan la capacidad invasiva de las células tumorales; Guérin E, 1997).

II. 5. 4. Aplicación de retinoides en la terapia antitumoral

El retinoide natural más utilizado en las terapias antitumorales es el ATRA puesto que es más activo que su isómero 9-cis-RA. Sin embargo, estas moléculas actúan de forma global en el organismo (sus receptores se encuentran en prácticamente todos los tipos celulares analizados) por lo que se asocian a su tratamiento efectos secundarios como la hiperlipidemia y la toxicidad mucocutánea y hepática (Sutton L, 1997). Por este motivo, se han desarrollado retinoides sintéticos con una actividad más específica y con mayor potencia, lo que disminuye la toxicidad de los retinoides naturales. Los principales retinoides sintéticos utilizados hasta el momento son el LGD1069 (bexaroteno, targretina), un derivado sintético del retinoide 9-cis-RA y la N-(4-hydroxyphenyl)retinamida (4-HPR, fenretidina), derivado sintético del ATRA (Simeone AM, 2004).

Los retinoides se han asociado a otros compuestos para aumentar su eficacia clínica. Se han desarrollado terapias que combinan los retinoides con la quimioterapia, butirato sódico y tricostatina A (inhibidores de la deacetilasa de las histonas, las cuales ejercen un efecto inhibitorio de la acción del receptor del RA) (Lin RH, 1998), trióxido arsénico (el ATRA actúa de forma sinérgica con el trióxido arsénico para aumentar la capacidad antiproliferativa y proapoptótica del tratamiento en un proceso mediado por el GSH) (Lin LM, 2005), interferones y tamoxifeno (Jiménez-Lara AM, 2004).

Tabla 2. Retinoides actualmente utilizados en la terapia antitumoral.

Nombre Comercial	Retinoide	Actividad	Aplicación Terapéutica
Treitonina	Transretinoico	RAR	Leucemia promielocítica Keratosis actínica
Alitreitonina Panretina	Ácido retinoico 9-cis	RAR	Sarcoma de Kaposi
Isotretionina	Ácido retinoico 13-cis	RAR	Leucoplaquia oral Cáncer de piel Carcinoma de cabeza y cuello (con IFN α -2a) Neuroblastoma
Bexaroteno	LDG1069	RXR RAR residual	Linfoma cutáneo de las células T (estadios IA-IB, IIA)
Fenretidina (4-HRP)	4-hydroxy-phenylretinamida	RAR γ RAR β Otras	Cáncer de mama secundario
Retinoide acíclico	Ácido poliprenoico	RAR RXR PPAR	Carcinoma hepatocelular (prevención)
Adapaleno CD271		RAR γ RAR β (baja)	Neoplasia intraepitelial cervical (prevención)

En la actualidad, la aplicación en los sarcomas está siendo objeto de investigación por numerosos grupos de investigación, puesto que se ha observado su efecto diferenciador y antiproliferativo en células de RMS tanto humanas como murinas (Barlow JW, 2005; Ricaud S, 2005; Arnold HH, 1992). Estos estudios reflejan la utilidad de los retinoides en el tratamiento del RMS, pero también exponen la necesidad de conocer previamente la reactividad de las células tumorales al tratamiento, puesto que existen tipos celulares que no responden al RA, lo que podría ser debido a disfunciones en los receptores de los retinoides (traslocaciones y formación de nuevas proteínas de fusión que impiden la respuesta al tratamiento) (Ricaud S, 2005) y a otras diferencias biológicas celulares que precisan ser estudiadas.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Este trabajo de investigación analiza posibles alternativas terapéuticas complementarias a los tratamientos clásicos del rhabdomioma. Para ello, se centra en el estudio del efecto producido por el ATRA –retinoide utilizado como agente diferenciador y aplicado en la actualidad en el tratamiento de diversos tumores–, y en la implicación del metabolismo del GSH en dicho efecto.

El efecto del ATRA podría estar influenciado por el estado redox de las células tumorales, el cual depende del metabolismo intracelular del GSH de cada tipo celular, metabolismo que, a su vez, podría ser diferente dependiendo del grado de diferenciación tumoral. Con el objetivo de profundizar en estos hechos, se plantea la siguiente **hipótesis**:

“El tratamiento del rhabdomioma con ATRA produce efectos que varían dependiendo del grado de diferenciación de las células tumorales. Dichos efectos son dependientes del metabolismo del glutati3n de cada tipo celular, ejerciendo un papel esencial el nivel de expresi3n de la enzima gamma-glutamiltanspeptidasa”.

Para demostrar dicha hipótesis, en este estudio realizado sobre un modelo experimental de rhabdomioma de rata, se han planteado los siguientes **objetivos concretos**:

1. Estudiar la respuesta celular producida por el ATRA en dos líneas tumorales con diferente grado de diferenciación.
2. Determinar el grado de implicación del metabolismo del GSH sobre el efecto del ATRA en dichas líneas celulares.
3. Analizar la implicación de la capacidad de expresi3n de la enzima gamma-glutamiltanspeptidasa sobre los efectos del ATRA.
4. Determinar el posible beneficio terapéutico de la adici3n de ATRA y BSO a la quimioterapia clásica, a través de la combinaci3n de sus respectivos efectos inductor de la diferenciación e inhibidor de la síntesis de GSH en el rhabdomioma.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. 1. EXPERIMENTACIÓN *In Vitro*

IV. 1. 1. CÉLULAS TUMORALES

IV. 1. 1. 1. Obtención y Origen de las Células Tumoraes

En este estudio, se han utilizado dos líneas celulares de rhabdomyosarcoma de rata: F21 y S4MH.

Estas células se encuentran relacionadas parentalmente. Ambas provienen de un mismo tumor inducido mediante inyección intramuscular de níquel en una rata WAG. El tumor se dispuso en cultivo y las células parentales obtenidas fueron clonadas de forma que se obtuvieron diferentes series de líneas celulares para estudio. El método empleado aseguró un origen monocelular de las líneas celulares (Sweeney 1982).

Las células F21 y S4MH presentan diferencias en cuanto a su grado de diferenciación y su capacidad metastática. La línea celular S4MH presenta una morfología indiferenciada y su capacidad metastática es alta [Figura 16]. La inoculación de estas células en ratas WAG por vía intravenosa o subcutánea provoca la formación de metástasis en hígado, pulmón y ganglios linfáticos. Las células F21 presentan una morfología moderadamente diferenciada e inoculadas en ratas WAG por las mismas vías descritas, su capacidad de formación de metástasis tanto pulmonares como hepáticas es significativamente menor que las células S4MH (Calle 2000).

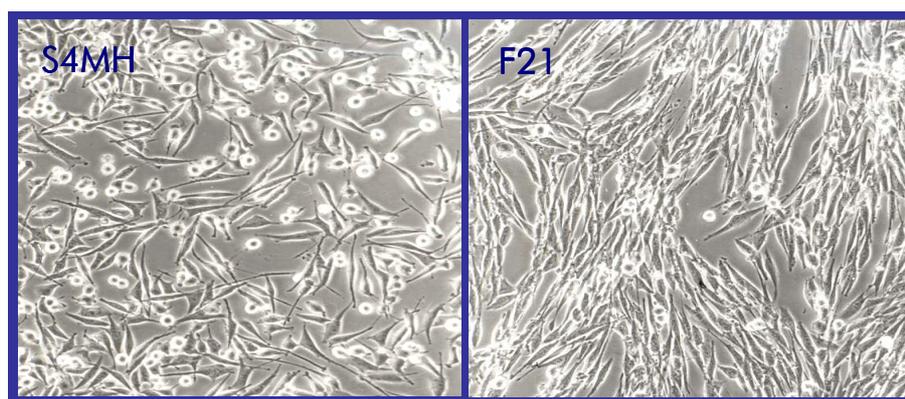


Fig. 16. Células tumorales S4MH y F21, obtenidas de un rhabdomyosarcoma de rata inducido químicamente.

IV. 1. 1. 2. Cultivo de las Células Tumorales

Las células tumorales S4MH y F21 fueron cultivadas en medio mínimo esencial de cultivo DMEM (Dubelcco's modified Eagle's médium, Gibco BRL) al que se añadió penicilina (100 UI/ml, Biochrom KG), estreptomicina (100 µg/ml, Biochrom KG) y anfotericina (100 µg/ml, Biochrom KG). Además, el medio de cultivo de las células tumorales S4MH y F21 fue suplementado con un 15% y un 10% de suero bovino fetal (SBF, Biochrom KG), respectivamente.

Para el mantenimiento de estas células se utilizaron frascos desechables de cultivo de poliestireno (Orange Scientific) de 25, 75 y 150 cm² de superficie. Para llevar a cabo experimentos puntuales se utilizaron placas de cultivo de 6, 24 y 96 pocillos (Costar).

La manipulación de los cultivos celulares se realizó en cabinas de flujo laminar vertical (Bio 48 Faster) y una vez realizada la siembra se mantuvieron en un incubador (Heraeus) ajustado a una temperatura de 37°C y una atmósfera de 5% CO₂.

Las células tumorales F21 y S4MH muestran un fenotipo adherente. Cuando los cultivos alcanzaban la semiconfluencia, las células eran despegadas de la superficie del frasco por medio de un breve tiempo de exposición a la solución PBS-EDTA 2 mM y sembradas en el soporte y la concentración más adecuados según la experiencia a realizar. En todas las experiencias se testó la viabilidad celular mediante la tinción con azul tripan (Gibco BRL), excluyendo el cultivo si la viabilidad era menor del 95-98%. Para los diferentes experimentos se utilizaron siempre los cultivos teniendo en cuenta el número de veces que se habían subcultivado desde su descongelación, de tal forma que sólo se utilizaron las células en el segundo o tercer subcultivo.

IV. 1. 2. FÁRMACOS

En todas las experiencias, las disoluciones de los fármacos empleados fueron preparadas en el momento de realizar el estudio.

IV. 1. 2. 1. Acroleína (AC)

La acroleína (Sigma-Aldrich Chemical Co.) es un metabolito activo de la ciclofosfamida (CY, agente alquilante no activo *in vitro*) que reacciona con el GSH, disminuyendo sus niveles intracelulares (Norton, 1997). Este producto se presenta en forma líquida y fue almacenado a 4°C. Las diluciones se realizaron en medio de cultivo.

IV. 1. 2. 2. L-butionina-[S,R]-sulfoximina

La L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO, Sigma-Aldrich Chemical Co.) es un inhibidor específico de la enzima γ -GCS, disminuyendo de este modo los niveles de GSH (Bailey, 1998). Este producto fue almacenado en viales polvo de 5 g a 4°C. Las diluciones se realizaron en medio de cultivo.

IV. 1. 2. 3. Ácido Transretinoico (ATRA)

El ATRA (Sigma-Aldrich Chemical Co.) es un derivado natural de la vitamina A, inductor de la diferenciación celular e inhibidor de la proliferación –detiene el ciclo celular en fase G₁–.

Este producto se presenta en polvo, que se almacena en oscuridad a –20°C. La porción necesaria del producto para formar una solución madre se disuelve en etanol absoluto; a partir de esta solución se van obteniendo las diluciones necesarias para los diferentes tratamientos disueltas en medio de cultivo. La solución madre se almacena también a –20°C, protegida de la luz y tiene una duración máxima de un mes.

IV. 1. 2. 4. Acivicina

La acivicina (ácido γ -Amino-3-cloro-4,5-dihidro-5-isoxazoleacético, Sigma-Aldrich Chemical Co.) es un inhibidor no competitivo e irreversible de la enzima GGT. Este producto se presenta en polvo, que se reconstituye en ácido clorhídrico 1 N para la formación de la solución madre, la cual se alicuota convenientemente en viales y se guarda a –20°C. Las diluciones posteriores para los diferentes experimentos se realizaron directamente en medio de cultivo.

IV. 1. 3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

IV. 1. 3. 1. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MIOGENINA

Para determinar el grado de diferenciación celular, se realizó el marcaje con miogenina, marcador de diferenciación muscular.

a.- Cultivo celular: las células fueron sembradas en camarillas cuádruples de cultivo sobre portaobjetos (NUNC), a una densidad de 4×10^3 células por camarilla en medio de cultivo (1 ml/pocillo) suplementado con el porcentaje de suero adecuado a cada tipo celular.

b.- Aplicación de los tratamientos: Las células fueron tratadas con ATRA 10^{-6} M durante 72 horas, momento en el cual se llevó a cabo la inmunodetección de la miogenina.

c.- Inmunodetección de la miogenina: las células fueron fijadas en formaldehído al 3% durante 15 minutos y posteriormente permeabilizadas con Triton x100 al 0.3% durante 5 minutos. Para la inmunohistoquímica, se aplicó un anticuerpo monoclonal anti-miogenina de rata (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Germany) durante 30 minutos a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se lavaron los pocillos con PBS y se incubaron con el estimulador de la señal "Image-iT signal enhancer" (Invitrogen, California, USA), –disminuye además el ruido de fondo–, durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Después de lavar con PBS se aplicó el anticuerpo secundario, IgG de cabra antiratón marcado con fluoresceína isotiocianato (Alexa Fluor SFX kit Invitrogen).

d.- Análisis de resultados: Los marcajes fueron analizados por microscopía confocal (Olympus Fluoiew FV500). La excitación de la fluoresceína se consiguió utilizando un láser de argón a 488 nm y la emisión específica fue seleccionada en la región de 458-514 nm, utilizando los filtros apropiados.

IV. 1. 3. 2. DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

a.- Siembra de las células tumorales: para llevar a cabo la determinación de la proliferación celular, las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos, a una densidad de 10^4 células por pocillo en medio de cultivo (1 ml/pocillo) suplementado con la concentración adecuada de SBF dependiendo de cada tipo celular.

b.- Aplicación de los tratamientos: las células sembradas se dejaron adherir y acondicionar durante 24 horas, tras lo cual se adicionaron los tratamientos correspondientes según las características de cada estudio. Finalizado el tiempo de incubación de cada fármaco, se procedió a su retirada y sustitución por medio de cultivo fresco. Las células se mantuvieron en este medio hasta el fin del experimento.

c.- Medidas de proliferación celular: la proliferación celular fue determinada a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la adición de los tratamientos. Para ello, una vez eliminado el medio de cultivo de los pocillos, se adicionó la solución PBS-EDTA 2 mM y se dispusieron a 37°C durante 5 minutos. Una vez despegada la población celular por completo, se realizó un recuento directo al microscopio mediante la utilización de un hemocitómetro Burkler (Boeko, Germany).

IV. 1. 3. 3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE GLUTATIÓN DE LAS CÉLULAS TUMORALES.

a.- Análisis del contenido intracelular de GSH mediante citometría de flujo.

Tratamientos a las células: las células fueron sembradas en frascos de 25 ó 75 cm^2 , según el tiempo adecuado de tratamiento con el fármaco. Una vez adheridas y adaptadas al medio se añadieron los diferentes tratamientos, manteniéndose estos durante el tiempo previamente definido.

Preparación de las suspensiones celulares: una vez tratadas, las células fueron despegadas del frasco, dispuestas en tubos de fondo cónico (Costar) y centrifugadas a 250 g. Eliminado el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en DMEM y ajustada la suspensión a una concentración de 10^6 cels./ml.

Marcaje del GSH con Monoclorobimano: a cada ml de la suspensión celular anteriormente señalada, se añadió monoclorobimano (mBCI, Molecular Probes, Eugene, OR) hasta alcanzar una concentración de $20 \mu\text{M}$. Este fluorocromo se conjuga con el glutatión intracelular, en una reacción que requiere la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa (GST), siendo el marcaje altamente específico (Kamencic 2000).

Análisis del marcaje por citometría de flujo: la intensidad de fluorescencia por unidad celular se determinó utilizando un citómetro de flujo EPICS ELITE (Coulter, Hialeheat, Florida) con las siguiente longitudes de onda: λ excitación = 360 nm; λ emisión = 460 nm. Se realizó el análisis por triplicado de un mínimo de 10.000 células por cada muestra.

b.- Análisis del contenido intracelular de GSH por el método de Hissin (1976).

En este método se utiliza el fluorocromo O-ftaldehído (1,2-bencenodicarboxialdehído, OPT; Sigma-Aldrich Chemical Co.) como marcador del glutatión intracelular. El OPT reacciona con la amina primaria del tiol dando lugar a un producto que emite fluorescencia (Puri, 1988). En el momento de la valoración se prepararon disoluciones de 10 mg/ml de metanol.

Los niveles de GSH según este método se expresan en nmol de GSH/mg de proteína celular según el siguiente procedimiento:

Siembra de las células tumorales, aplicación de los tratamientos y fijación de las placas: las células tumorales fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una

densidad de 10^4 células por pocillo. Transcurridas 24 horas desde la siembra, se añadieron los diferentes tratamientos mantenidos durante el tiempo de exposición elegido para cada fármaco. Una vez terminado el tratamiento, las células fueron lavadas 2 veces con PBS, se eliminó completamente el líquido de los pocillos, se congelaron las placas mediante inmersión en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20°C hasta proceder al marcaje y cuantificación de los niveles de GSH.

Marcaje del GSH con el fluorocromo: en el momento de la valoración se añadió a cada pocillo 150 μl de una *solución de homogenización* (TCA 5% y EDTA 2 mM), tras una breve sonicación de la placa (10 segundos) para la ruptura de la membrana celular, se centrifugó a 1300 g durante 30 min a 4°C . De cada pocillo se recogieron 2 muestras de 50 μl y se dispusieron en una placa de 96 pocillos; posteriormente, se añadió a cada pocillo una *solución de incubación* (175 μl de PBS 0.1 M con EDTA 5 mM (pH=8), 15 μl de NaOH 1 M y 10 μl de solución OPT (10 mg/ml de metanol)). Las placas fueron incubadas durante 30 min en oscuridad.

En cada ensayo se obtuvo una curva patrón de GSH (Sigma-Aldrich Chemical Co.) a partir de la *solución madre* 10 mM, tras lo cual se realizaron diluciones sucesivas en *solución de homogenización*.

Cuantificación de la fluorescencia y determinación de los nmoles de GSH: la cuantificación se llevó a cabo con un Fluorímetro de barrido de placa (Fluoriscan Ascent, Labsystem). Los filtros utilizados para las medidas fueron: λ excitación = 360 nm y λ emisión = 450 nm, obteniendo los resultados en nmol de GSH una vez interpolados los valores de fluorescencia en la curva patrón.

c.- Valoración de la proteína celular

La valoración de la proteína celular se realizó mediante el método descrito por Lowry y cols. (1951). Este método se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{++} y el nitrógeno de los enlaces peptídicos de las proteínas

(reacción de Biuret). Para intensificar el color formado en esta reacción y aumentar la sensibilidad, se hace reaccionar posteriormente con el reactivo de Folin-Ciocalteus (Merck), que al ser reducido por los residuos de aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano da un color azulado.

Preparación de las placas para cuantificación de proteína: la valoración de proteína se llevó a cabo en las mismas placas donde se realizó anteriormente la determinación de GSH. Una vez fue recogida de estas placas la solución de homogeneización requerida para el análisis del GSH, se eliminó el sobrenadante por completo y se añadió a cada pocillo 150 μ l de NaOH 0.5 N.

Formación del complejo coloreado: se añadieron 375 μ l de la solución de carbonato sódico (Panreac) al 4% en agua destilada, tartrato de sodio y potasio (Panreac) al 4% en agua destilada y sulfato de cobre (Panreac) al 2% en agua destilada, mezclado en las proporciones 100:1:1. Transcurridos 10 min., se añadieron 75 μ l de la solución del reactivo Folin-Ciocalteus (Merck) en proporción 1:2 en agua destilada. Del contenido de estos pocillos se transfirieron 2 muestras (200 μ l cada una) a una placa de 96 pocillos. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min en oscuridad.

Determinación de la absorbancia: pasado el tiempo de incubación, se procedió a la medida del color producido en la reacción utilizando un lector automático de microplacas (Elx800, Bio-Tek Instruments®) midiendo la absorbancia a 490 nm. La curva patrón se realizó a partir de la solución madre de albúmina sérica bovina (BSA, del inglés bovine seric albumin; Sigma-Aldrich Chemical Co.) a una concentración de 1mg/ml en NaOH 0.5 N y diluciones sucesivas que permitieron realizar una curva patrón con cantidades de proteína conocida. Los resultados obtenidos fueron expresados en μ g de proteína.

IV. 1. 3. 4. DETECCIÓN DE LA APOPTOSIS EN LAS CÉLULAS TUMORALES

Para la determinación del porcentaje de células que se encuentran llevando a cabo un proceso de apoptosis temprana se utilizó el sistema "Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit" (Oncogen).

a.- Preparación de las suspensiones celulares: para la realización del marcaje, las células fueron sembradas en frascos de 75 cm². Una vez realizados los tratamientos, el medio de cultivo fue transferido a tubos de fondo cónico (Costar). Este medio puede contener células que se encuentren llevando a cabo un proceso de muerte celular y que estén por ello suspendidas en el medio de cultivo, por lo que no fue desechado. Las células adheridas fueron despegadas e incorporadas a los tubos que contenían el sobrenadante de los cultivos. Una vez centrifugados los tubos a 1000 g durante 5 min y a temperatura ambiente, se ajustaron las suspensiones celulares a una concentración de 10⁶ cels./ml.

b.- Marcaje con Anexina V: De cada suspensión celular obtenida se transfirieron 0.5 ml a microtubos de centrífuga. Se añadieron 10 µl de un reactivo de unión y 1.25 µl de solución tamponada de Anexina-V (200 µg/ml) conjugada con Fluoresceína, ambos suministrados por el kit. Se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado este tiempo, los microtubos con la suspensión celular fueron centrifugados a 1000 g durante 5 min., se desecharon los sobrenadantes y se resuspendieron las células en 0.5 ml de tampón de unión enfriado en hielo al que se le añadieron 10 µl de Ioduro de Propidio (30 µg/ml), ambos componentes también suministrados por el kit. Las células se mantuvieron en hielo y en oscuridad hasta su análisis por citometría de flujo.

c.- Análisis mediante citometría de flujo: el análisis por citometría se llevó a cabo utilizando un láser de argón, sintonizado a una λ de excitación de 488 nm. Para ajustar las condiciones del citómetro fue necesario utilizar como referencia muestras conocidas con células en apoptosis y marcadas con anexina o con yoduro de propidio.

IV. 1. 3. 5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA γ -GLUTAMILTRANSPEPTIDASA (GGT)

La actividad de la enzima GGT fue determinada mediante una adaptación del método de Grisk y cols. (1993). Este método se basa en la capacidad hidrolítica y transpeptidasa de la enzima. Para ello, se utiliza la molécula γ -glutamil-p-nitroanilina, como sustrato de la actividad hidrolítica de la enzima, y la molécula glicilglicina como aceptor de la porción γ -glutamilo escindida por la GGT. La liberación de la molécula p-nitroanilina produce color, cuya intensidad va aumentando a medida que transcurre el tiempo de reacción de la enzima sobre el sustrato. El incremento de color del medio puede determinarse midiendo la absorbancia a 405 nm durante periodos de tiempos cortos.

a.- Preparación del sustrato: el sustrato utilizado consiste en una solución que incluye γ -glutamil-p-nitroanilina 4,4 mM, glicilglicina 40 mM, $MgCl_2$ 6 veces hidratado 11 mM y Tris-clorhídrico 0.4 M a pH 8.5. Para su preparación, se forma una solución con el Tris-HCl que se ajusta a un pH de 8.5. Esta solución se calienta hasta llegar a 50 °C. A esta temperatura, se disuelven el resto de componentes y se deja enfriar hasta la temperatura ambiente. En dicho calentamiento del tampón, resulta importante no superar los 60 °C para evitar la inactivación del resto de componentes.

b.- Preparación de las suspensiones celulares: las células fueron sembradas en frascos de 25 o 75 cm² de superficie dependiendo del tiempo requerido de incubación con los diferentes tratamientos. Transcurrido este tiempo, las células fueron despegadas del frasco, centrifugadas y resuspendidas en el volumen necesario de PBS para llegar a tener una concentración de 10⁶ cels./100 μ l.

c.- Medidas de absorbancia: se utilizaron placas de 24 pocillos, disponiendo en cada pocillo 100 μ l de la suspensión celular y 850 μ l de sustrato. En cada placa se reservaron varios pocillos en los que se añadió sustrato sin glicilglicina, para su

utilización como *blancos* del experimento. A continuación, y de forma inmediata, se midió la absorbancia de los diferentes pocillos a 405 nm utilizando un lector automático de microplacas (Elx800, Bio-Tek Instruments®), esta medida correspondió al tiempo 0 de la reacción. A partir de ese momento, se realizaron medidas cada 5 min. hasta llegar a un tiempo final de 30 min.

d.- Expresión de los resultados: la actividad de la enzima GGT se expresó en mU de enzima/mg proteína, para lo cual se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\frac{\text{mU}}{\text{ml}} = \frac{\Delta E / \Delta t}{9,9} \times \frac{1000 V_t (\text{ml})}{V_{\text{problema}} (\text{ml})}$$

siendo:

ΔE : la pendiente de la recta obtenida por el incremento de la absorbancia con relación al tiempo.

Δt : incremento del tiempo (5 min)

V_t : Volumen total (0.95 ml)

V_{problema} : Volumen problema (0.1 ml)

9,9: coeficiente de extinción de la p-nitroanilina

$$\text{Actividad GGT} = \frac{\text{mU} / \text{ml}}{\text{mg prot.} / \text{ml}}$$

La proteína total fue valorada por el método de Lowry como se describió anteriormente para la determinación de los niveles de GSH.

IV. 1. 3. 6. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS REACTIVOS DEL OXÍGENO

Para el marcaje de los metabolitos reactivos del oxígeno se utilizó la sonda Diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA , Molecular Probes). Esta molécula difunde a través de la membrana celular y es hidrolizada por las esterasas celulares pasando a formar el compuesto 2,7-diclorofluoresceína, que permanece en el interior de la célula de forma no fluorescente. Posteriores oxidaciones intracelulares que se producen durante el metabolismo forman Diclorofluoresceína (DCF), el cual es altamente fluorescente.

El H_2DCFDA se utiliza para la determinación de metabolitos reactivos del oxígeno comúnmente producidos durante el metabolismo oxidativo de las células como son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical peroxilo y el anión peroxinitrito.

a.- Marcaje con la sonda H_2DCFDA : las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de 2×10^4 células por pocillo. Una vez transcurrido el tiempo elegido para cada tratamiento, se lavó dos veces cada pocillo con PBS a $4^\circ C$. En este momento se realizaron medidas de autofluorescencia en el fluorímetro de barrido de placa (CytoFluor 2350 system) a una λ excitación = 485 nm y λ emisión = 538 nm. Realizadas estas medidas, se adicionó la sonda a una concentración 4 mM, y en un volumen total de 1 ml/pocillo. Las placas fueron incubadas a $37^\circ C$ durante 30 min.

b.- Medición de la fluorescencia: transcurrido el tiempo de incubación con la sonda, las placas fueron introducidas de nuevo en el fluorímetro de barrido de placa, utilizando las mismas λ que las especificadas en el apartado anterior.

c.- Expresión de resultados: una vez sustraídos a los valores de fluorescencia los de la autofluorescencia obtenida de cada pocillo, los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de fluorescencia.

IV. 2. EXPERIMENTACIÓN *In Vivo*

IV. 2. 1. ANIMALES

La experimentación *in vivo* fue realizada en ratas singénicas hembras de la especie WISTAR (WAG, laboratorios Iffa-Credo, L'Arbreole, Francia). En todas las experiencias se utilizaron ratas de 10 - 12 semanas de edad, que fueron estabuladas en grupos de 5 animales por jaula y mantenidas en condiciones óptimas de higiene, con alimentación y agua *ad libitum*.

En el manejo de los animales, dada la utilización de técnicas que incluyen la inoculación de células tumorales y la administración de drogas, las cuales, pueden influir en la severidad del procedimiento experimental, se siguieron las recomendaciones de la United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) para la utilización de animales de experimentación del cáncer, enfocado al cuidado y bienestar de los mismos (UKCCCR, 1998). Así mismo, se han seguido las directrices de la Directiva del Consejo de Europa 2003/65/CE sobre la protección de los animales de experimentación promulgada en España por el Real Decreto 1201/2005.

IV. 2. 2. FÁRMACOS

IV. 2. 2. 1. Ciclofosfamida

En los estudios *in vivo* se utilizó el agente alquilante Ciclofosfamida (CY, Genoxal®, Funk), fármaco que para ser activo precisa de su metabolización previa por las enzimas microsomales hepáticos. Este citostático tiene un amplio espectro antineoplásico y gran poder inmunosupresor. El producto se presenta liofilizado en viales y fue almacenado a 4°C, procediendo a su disolución en suero fisiológico (Laboratorios Mein, S.A.) en el momento de la administración a los animales por vía intraperitoneal (i.p.) [Figura 17].

IV. 2. 2. 2. L-butionina - [S,R]-sulfoximina (BSO)

Las disoluciones del BSO fueron preparadas de forma inmediata previa a la administración i.p. en el animal, utilizando para ello suero fisiológico esteril.

IV. 2. 2. 3. Ácido Transretinoico

Para los estudios *in vivo* el ATRA se disolvió en aceite de girasol comercial. Dada la sensibilidad del ATRA a la luz, dicha disolución fue preparada en oscuridad de forma inmediata previa a su administración i.p. al animal.



Fig 17. Proceso de inoculación intraperitoneal de los fármacos en ratas singénicas de la especie WISTAR.

IV. 2. 3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

IV. 2. 3. 1. INOCULACIÓN DE LAS CÉLULAS TUMORALES

a.- Preparación de las suspensiones celulares: las células tumorales S4MH y F21 fueron cultivadas en frascos de 150 cm² de superficie; una vez alcanzada la semiconfluencia, las células fueron despegadas del soporte según los procedimientos descritos en el experimentación *in vitro*. Una vez centrifugadas a una velocidad de 250 g, se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en la solución salina equilibrada de hanks (HBSS, del inglés Hank's Balanced Salt Solution, Gibco BRL) hasta alcanzar una concentración de 10⁷ células por ml.

b.- Inoculación en el animal: en cada experimentación *in vivo* fueron utilizados 10 animales por grupo experimental. Una vez ajustada la concentración de la suspensión celular (10⁷ células/ml) y utilizando una jeringa tipo insulina de 1 ml (Becton Dickinson), se inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho del animal 0.1 ml de dicha suspensión. De esta manera en cada animal fueron inoculadas 10⁶ células.

Para llevar a cabo dicha inoculación, los animales fueron anestesiados levemente mediante la inhalación de vapores de eter etílico (Probus).

IV. 2. 3. 2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD TUMORIGÉNICA DE LAS CÉLULAS S4MH Y F21.

IV. 2. 3. 2. 1. Determinación de la capacidad tumorigénica de las células tratadas *in vitro* con BSO y ATRA solos y en combinación.

a.- Tratamiento *in vitro* de los cultivos celulares: las células fueron sembradas en frascos de 150 cm² de superficie. Una vez adheridas a la superficie del frasco, se añadieron los diversos tratamientos. Transcurrido el tiempo de exposición a los fármacos se prepararon las suspensiones celulares para su inoculación al animal.

b.- Inoculación de las células tumorales en el animal: siguiendo el procedimiento previamente descrito.

c.- Seguimiento del desarrollo tumoral: se llevaron a cabo medidas seriadas (cada tres días) de las dimensiones del tumor, en longitud y en anchura, mediante la utilización de un calímetro. Estas medidas se iniciaron el día 12 y finalizaron el día 30 postinoculación tumoral.

d.- Expresión de los datos obtenidos: con las dimensiones obtenidas de los tumores y asumiendo que el valor de densidad es igual a la unidad, se calculó el peso tumoral a partir de la fórmula (Vanhoefer, 1997):

$$\text{Peso tumoral (g)} = 1/2 (L \times A^2)$$

donde L es la longitud en cm del tumor y A corresponde a su anchura.

El efecto de los tratamientos sobre la capacidad tumorigénica de las células tumorales se evaluó aplicando el ratio T/C en los diferentes tiempos de medida. Este índice relaciona el peso tumoral (g) desarrollado en los animales inoculados con las células tratadas (T) con los que han sido inoculados con las células tumorales sin tratar (C).

IV. 2. 3. 2. 2. Determinación del efecto sobre la capacidad tumorigénica del tratamiento in vivo de los animales con CY, BSO y ATRA, solos y en combinación.

a.- Preparación de las células e inoculación en los animales: según los procedimientos descritos previamente

b.- Administración de los fármacos a los animales: los diferentes fármacos fueron administrados de forma i.p. en las ratas WAG. La aplicación de estos fármacos se llevó a cabo una vez que los tumores alcanzaron un peso de 50-150 mg, lo cual se produce el día 12 a partir de la inoculación de las células tumorales. Cada fármaco es administrado según sus pautas específicas.

c.- **Seguimiento del desarrollo tumoral:** los tumores producidos se midieron de la misma forma y frecuencia que en el apartado anterior para obtener los pesos tumorales mediante la aplicación de la fórmula previamente descrita.

$$\text{Peso tumoral (g)} = 1/2 (L \times A^2)$$

d.- **Expresión de los resultados:** Para la evaluación del efecto que producen los diferentes tratamientos sobre la capacidad tumorigénica de las células tumorales F21 y S4MH, se consideraron los siguientes parámetros:

Volumen relativo de tumor (VRT): representa el volumen de tumor alcanzado en cada animal y se calcula según la fórmula (Vanhoefer, 1997):

$$\text{VRT} = V_x/V_i,$$

donde V_x representa el volumen del tumor en un momento determinado y V_i el volumen de ese mismo tumor al inicio de las medidas (día 12).

Ratio Tratamiento/Control (T/C): Establece la relación entre el volumen relativo de tumor del grupo tratado y el del control en un determinado día de tratamiento. Se calcula de la siguiente forma (Vanhoefer, 1997):

$$\text{T/C (\%)} = [\text{VRT tratado} / \text{VRT control}] \times 100$$

Tiempo de duplicación (TD): indica el tiempo, en días, en el cual el tumor ha alcanzado el doble de su volumen inicial.

Factor de retardo del crecimiento (FRC): indica el efecto de retardo de crecimiento del tumor que produce el agente antitumoral. Este parámetro se calcula a partir de la siguiente fórmula (Van Moorsel, 1999):

$$FRC = (TD_T - TD_C) / TD_C$$

donde TD_T es el tiempo de duplicación de los tumores tratados y TD_C el tiempo de duplicación de los controles.

IV. 2. 3. 3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD METASTÁTICA DE LAS CÉLULAS TUMORALES EN ANIMALES TRATADOS CON CY, BSO Y ATRA SOLOS Y COMBINADOS.

Las células tumorales de rhabdomyosarcoma de rata inician su proceso metastático con la invasión de los ganglios linfáticos regionales. Dado que la zona de inoculación de las células es el flanco derecho del animal, la invasión inicial se produce en la cadena ganglionar inguinal de la rata.

En este modelo, para evaluar la capacidad metastática de las células tumorales, una vez llegado el último día del experimento (día 27 postinoculación de las células), los animales fueron sacrificados mediante inhalación de vapores de éter, y se procedió a la extirpación quirúrgica de los ganglios inguinales de cada animal. Una vez extraídos se pesaron, expresando los resultados en gramos.

IV. 2. 3. 4. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD PRODUCIDA POR LOS TRATAMIENTOS IN VIVO

Evolución ponderal de los animales

Los animales fueron pesados cada tres días desde el inicio de la administración de los fármacos hasta el fin del experimento.

Las modificaciones del peso del animal (MPA) se relativizaron al día 1 del inicio del tratamiento según la fórmula (Prezioso, 1992):

$$\text{M.P.A.} = (\text{Peso día } X_i \times 100) / \text{media peso día } 1^\circ$$

donde X_i corresponde al peso de cada animal en un día determinado, y el día primero al día en el que se iniciaron los tratamientos (día 12 postinoculación tumoral).

Evaluación de la toxicidad hematológica

La evaluación de los parámetros hematológicos se llevó a cabo al día siguiente de finalizado el tratamiento (día 27 a partir de la inoculación celular). Para ello, se procedió a la extracción de sangre a 5 animales elegidos aleatoriamente de cada grupo experimental. La extracción sanguínea se llevó a cabo con los animales anestesiados, mediante inhalación de vapores de éter, y dispuestos en decúbito supino; tras la limpieza de la región torácica con alcohol etílico, se realizó una punción intracardíaca utilizando una jeringa de 1 ml tipo insulina de 27 G (Becton Dickinson) y se extrajeron 200 μl de sangre/animal, depositada en tubos Microtainer® con EDTA. Tras la extracción los animales volvieron a las condiciones estándar de estabulación no observando ningún efecto secundario derivado de la extracción sanguínea.

Para la determinación de los parámetros analíticos, se llevó a cabo un recuento de leucocitos, eritrocitos, hemoglobina, hematocrito y plaquetas. Estos análisis fueron realizados mediante la utilización de un contador Coulter Counter® para lo cual se utilizó Isotón® como diluyente sanguíneo y Zap-oglobin® como agente hemolizante y reactivo de ciano-hemoglobina para el recuento leucocitario y la determinación de hemoglobina.

IV. 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los ensayos *in vitro* fueron repetidos, al menos, tres veces, y en cada uno de ellos, los tratamientos fueron realizados por cuadruplicado. Los experimentos *in vivo* fueron realizados por duplicado.

Para el análisis estadístico de los resultados se ha utilizado el programa informático GraphPad Software (Prism™ 4), a excepción de los resultados de citometría de flujo que fueron procesados empleando el programa informático WinMDi 2.8.

Media aritmética y desviación estándar

La *media aritmética* (\bar{x}) es el valor medio ponderado de una serie de datos y se obtiene sumando los valores observados (x_i) y dividiendo entre el número total de observaciones (N),

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N}$$

La *desviación estándar* (D.E.) es un indicador del grado de homogeneidad y refleja la dispersión de los datos estudiados para las distintas variables. Este estadístico se define como la raíz cuadrada de la *varianza* (S^2).

De esta manera, el valor de la S^2 se define como el promedio de los cuadrados de las desviaciones que las observaciones tienen respecto a su *media* y se expresa,

$$S^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N}$$

por lo que el cálculo de la *D.E.* se determina mediante la fórmula,

$$D.E. = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

Nivel de significación

Los resultados de un experimento requieren un tratamiento estadístico que permita orientar acerca de si la hipótesis de investigación debe ser rechazada o no, para lo cual se deberá establecer convencionalmente un determinado nivel de significación que permita diferenciar resultados estadísticamente significativos de aquellos que no lo son.

El *nivel de confianza* utilizado en los experimentos es del 95%, es decir, las valoraciones son estadísticamente significativas cuando la *probabilidad* (p) debida al azar es menor que 0.05.

Comparación de medias: prueba *t* de Student

La prueba de *t Student* es un método de análisis estadístico que compara las medias de dos categorías cuantitativas dentro de una variable dependiente, o las medias de dos grupos diferentes. Es una prueba paramétrica, es decir, que sirve para comparar variables numéricas de *distribución normal*.

La prueba *t Student* establece el valor del estadístico *t*. Según sea dicho valor *t*, corresponderá un valor de significación estadística determinado.

Análisis de la varianza

El *análisis de la varianza* (ANOVA) es una prueba estadística en que la comparación entre grupos se realiza a través de la *varianza* de la variable numérica y , en cada grupo de la variable categórica x . El objetivo de la varianza es comprobar si las diferencias entre las *medias* de distintos grupos son o no significativos.

La cifra estadística obtenida con el ANOVA es la razón *F de Snedecor*, determinada mediante la siguiente relación:

$$F = \frac{S_{E^2}}{S_{D^2}} \longrightarrow F_{t-1, N-t}$$

donde

$$S_{E^2} = \frac{\sum_{i=1}^t n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{t-1}$$

y

$$S_{D^2} = \frac{\sum \sum (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{N-t}$$

Así, para un *nivel de significación* α , si $F > F_{t-1, N-t}$ las *medias* de los grupos no son iguales, indicando, por lo tanto, que existen diferencias significativas entre los niveles.

V. RESULTADOS

V. 1. RESULTADOS *IN VITRO*

V. 1. 1. ESTUDIO DEL GRADO DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS S4MH Y F21.

En condiciones basales, las células S4MH mostraron una morfología típica de células indiferenciadas, redondeadas, de tamaño pequeño y con una distribución aleatoria en la superficie de cultivo. Además, apenas se detectó marcaje cuando se llevó a cabo la inmunodetección con miogenina (marcador de diferenciación muscular).

En el caso de las células F21, se observó una morfología típica de origen muscular, es decir, alargada en forma de huso y formando agrupaciones en la superficie de cultivo. En este caso, el marcaje con miogenina pudo observarse en la mayor parte de la población celular [Figura 18].

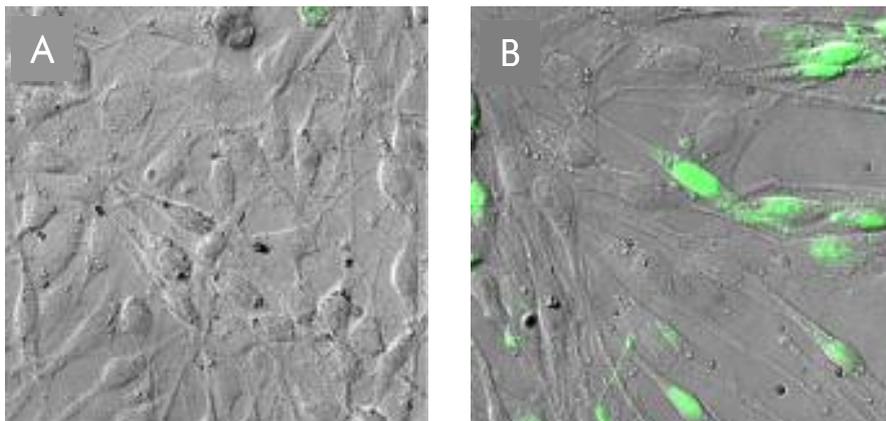


Figura 18. Análisis de microscopía confocal de la morfología y la inmunolocalización del marcaje con miogenina en las células S4MH (A) y F21 (B) controles.

V. 1. 2. EFECTO PRODUCIDO POR EL ATRA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS S4MH Y F21.

Ambos tipos celulares fueron tratados con ATRA 10^{-8} y 10^{-6} M durante 72 horas, momento en el cual se llevó a cabo la inmunodetección de la miogenina.

En ambos tipos celulares, el tratamiento con ATRA aumentó la expresión de la miogenina, si bien, en las células S4MH se pudo observar un incremento proporcionalmente mayor de dicha expresión que en las células F21 [Figura 19].

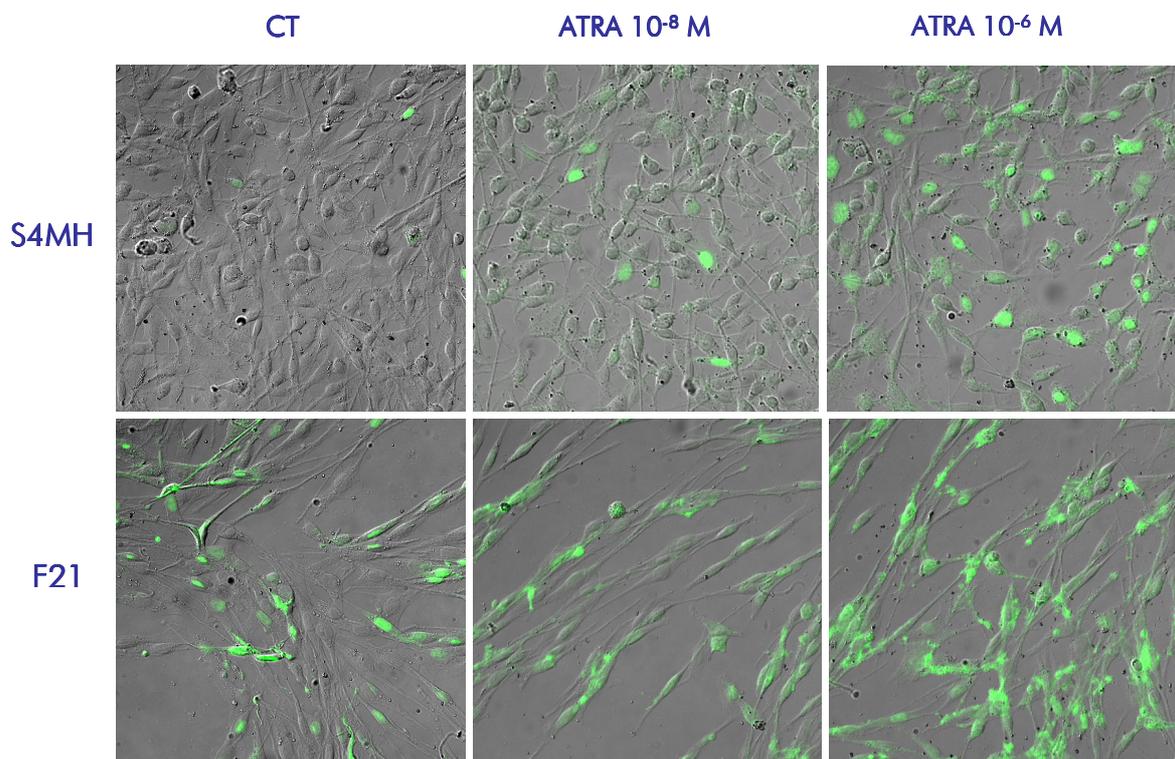


Figura 19. Análisis de microscopía confocal de la morfología y la inmunolocalización del marcaje con miogenina de las células S4MH y F21 tratadas con ATRA.

V. 1. 3. - NIVELES DE GSH Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS F21 Y S4MH

V. 1. 3. 1. Niveles de GSH y Proliferación de las células S4MH y F21 controles

En primer lugar estudiamos los niveles intracelulares de GSH de las células S4MH y F21 controles. Se observó que aunque ambos tipos de células parten de los mismos niveles, transcurridas 6 horas de cultivo, en las células S4MH se incrementó hasta 1.8 veces el contenido de GSH con respecto a las F21 ($p < 0.05$).

Por otro lado, la tasa proliferativa de las células S4MH fue significativamente superior a la de las células F21, llegando a ser el doble a las 72 horas [Figura 20].

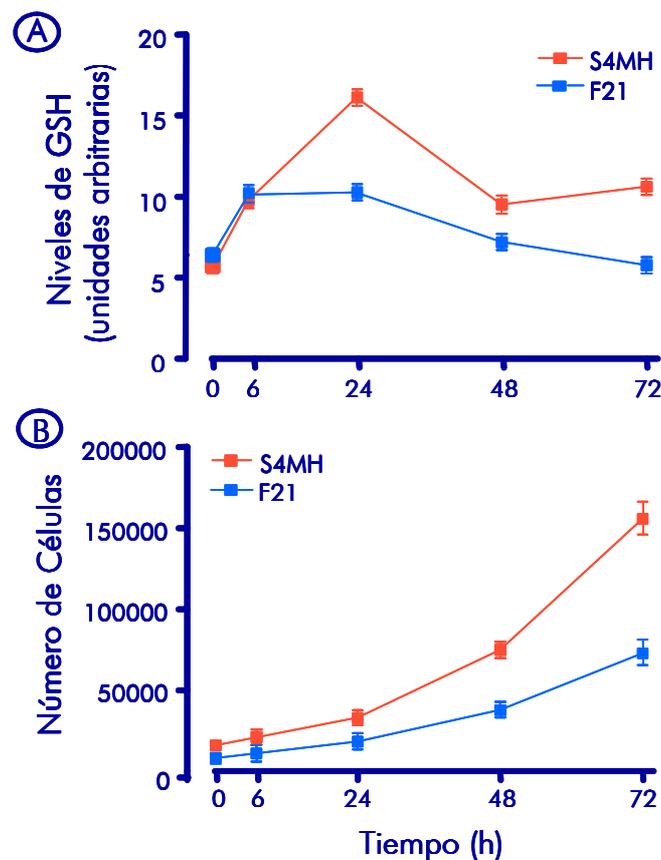


Figura 20. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 controles.

V. 1. 3. 2. Estudio del efecto del BSO, ATRA y acivicina solos y en combinación, sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21.

V. 1. 3. 2. 1. Efecto del BSO sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21.

En las células S4MH, el tratamiento con BSO (ver anexo I) disminuyó los niveles de GSH de forma dosis-dependiente. Así, tras la exposición a 100 y 500 μM de BSO durante 6 horas, se produjo una disminución máxima de 34 y 66% respectivamente, en comparación al control a las 48 horas ($p < 0.05$), si bien, se pudo observar una recuperación de dichos niveles a las 72 horas (81% respecto al control). Sin embargo, en las células F21 sólo se produjo una disminución de los niveles de GSH con la concentración de 500 μM a las 48 horas (disminución de un 39% con respecto al control) ($p < 0.05$). Cuando se utilizó la concentración de 100 μM no se observaron diferencias significativas a las 24 y 48 horas, si bien, se produjo un aumento de un 33% de los niveles de GSH a las 72 horas ($p < 0.002$).

Asimismo, la proliferación de las células S4MH disminuyó de forma dosis-dependiente con las dos concentraciones de BSO empleadas (100 y 500 μM). Esta reducción llegó a ser de 3.5 y 17.3 veces a las 72 horas, respectivamente ($p < 0.01$). Sin embargo, en las células F21, tan solo la concentración de 500 μM redujo significativamente la proliferación a las 24 y 48 horas (1.8 y 1.4 veces, respectivamente), observándose una recuperación del número de células a las 72 horas. Cuando se utilizó la concentración de 100 μM no se produjeron diferencias significativas con respecto al control a las 24 y 48 horas, pero se observó un aumento de 1.5 veces en la tasa proliferativa de las células F21, con respecto al control de 72 horas de cultivo [Figura 21 y 22].

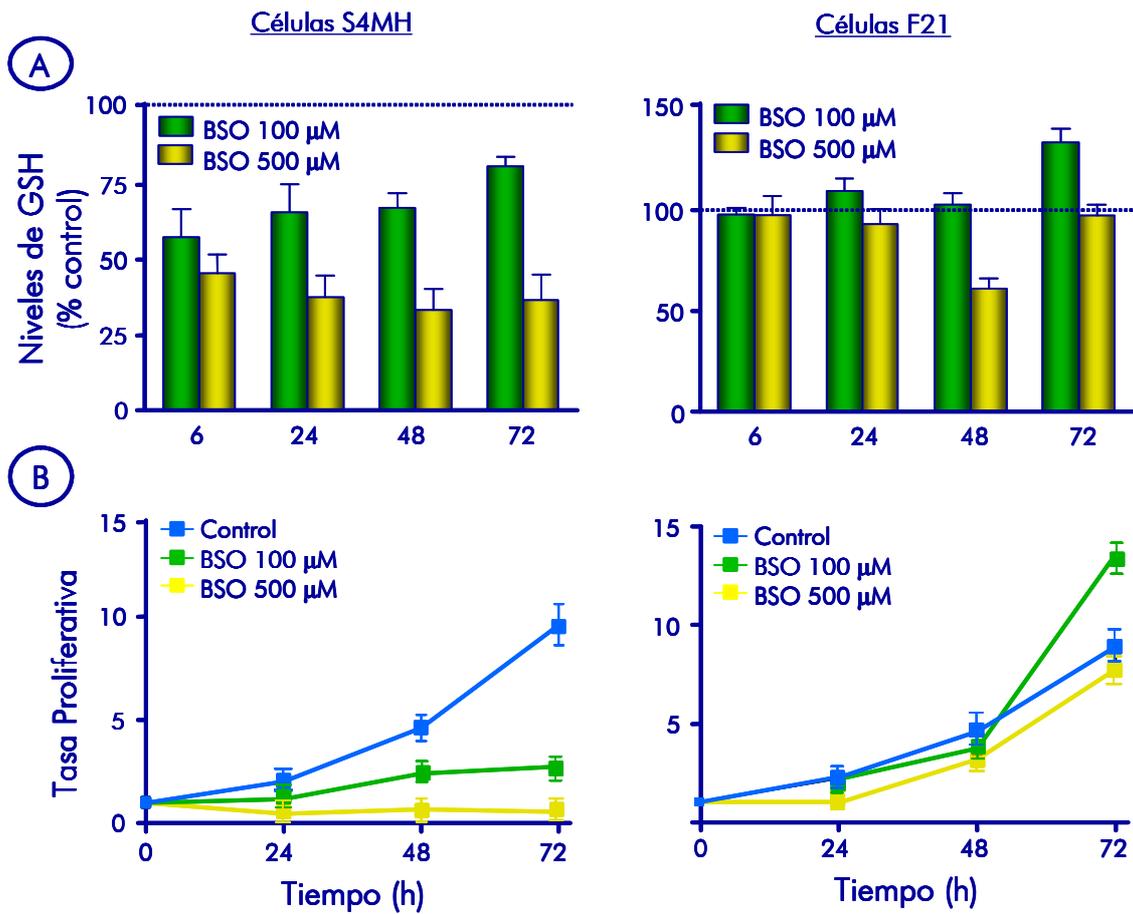


Figura 21. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 tratadas con BSO (100 y 500 μM).

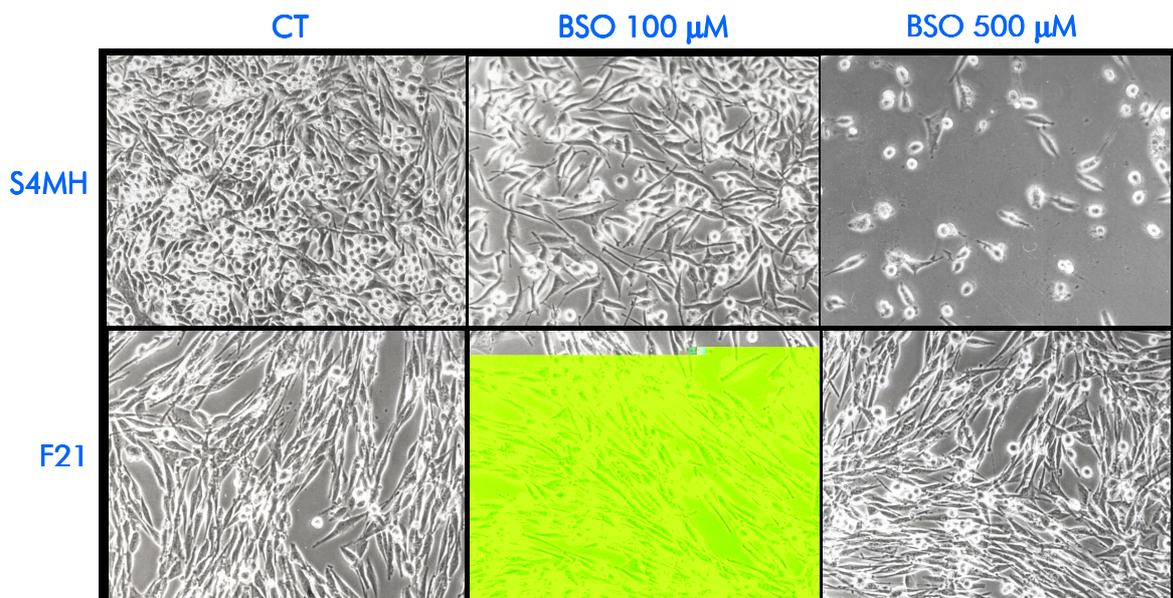


Figura 22. Efecto del tratamiento con BSO (100 y 500 μM) en las células S4MH y F21.

V. 1. 3. 2. 2. Efecto del ATRA sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21.

En las células S4MH, el tratamiento continuo con 10^{-6} M de ATRA disminuyó significativamente los niveles de GSH con respecto al control; sin embargo, no se observaron diferencias cuando se utilizó la concentración menor de 10^{-8} M. En las células F21, el tratamiento con ATRA (10^{-8} y 10^{-6} M) incrementó un 51% los niveles de GSH respecto al control, a las 24 horas de tratamiento ($p < 0.01$).

En cuanto a la proliferación, el tratamiento de las células S4MH con ATRA (10^{-8} y 10^{-6} M) induce una disminución significativa de la tasa proliferativa respecto al control, que llega a ser de 1.9 y 2.1 veces, respectivamente a las 48 horas. En el caso de las células F21, mientras la concentración 10^{-8} M produjo un incremento de la proliferación (1.2 veces con respecto al control a las 72 horas, $p < 0.01$), la concentración 10^{-6} M disminuyó significativamente su tasa proliferativa, siendo 1.4 veces inferior al control a las 72 horas de tratamiento [Figura 23 y 24].

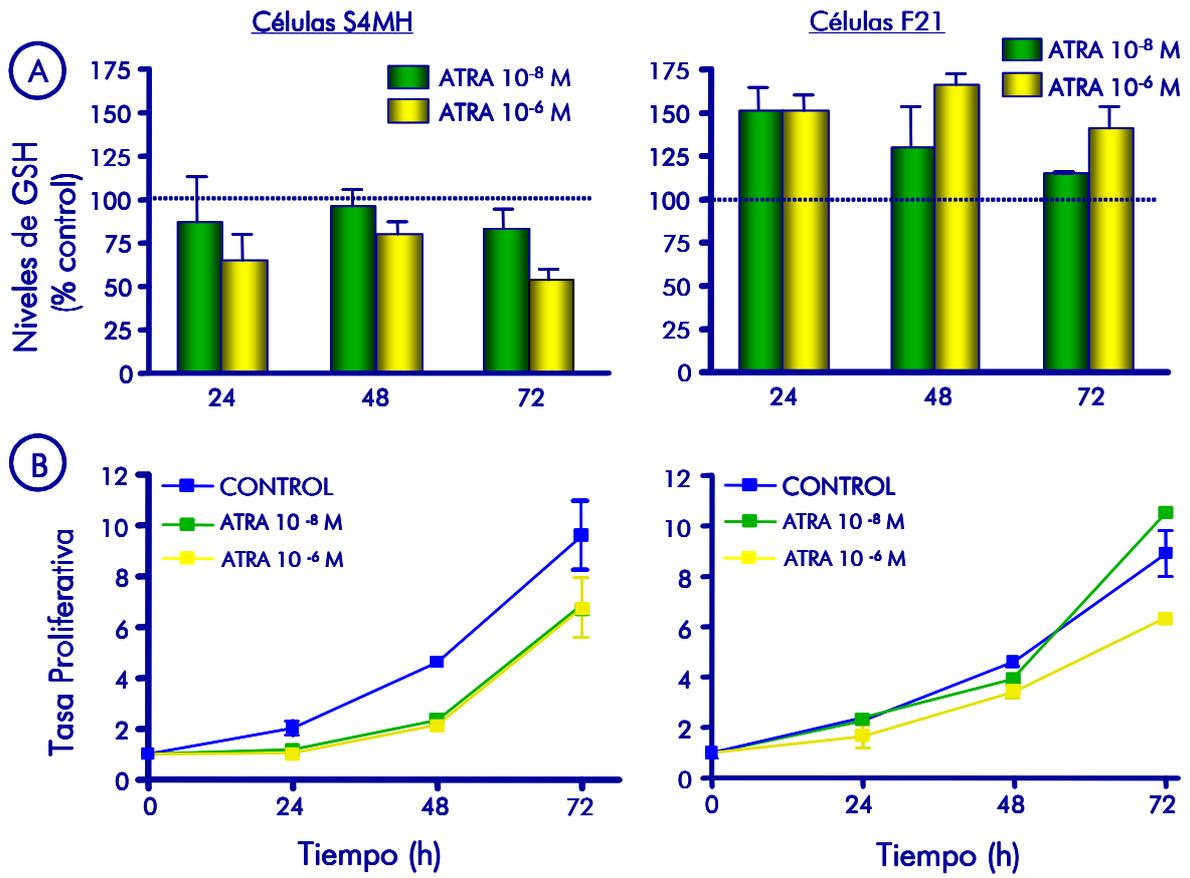


Figura 23. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 tratadas con ATRA (10⁻⁸ y 10⁻⁶ M).

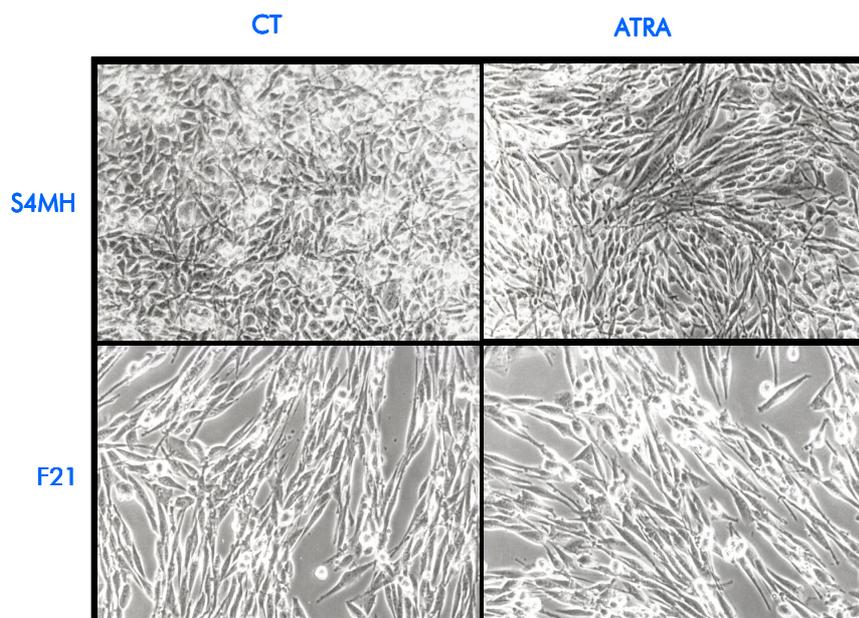


Figura 24. Efecto del tratamiento con ATRA en las células S4MH y F21.

V. 1. 3. 2. 3. Efecto de la acivicina sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21.

Con el fin de observar el efecto que produce la inhibición irreversible de la enzima GGT sobre los niveles de GSH y proliferación celular, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de Acivicina durante 10 horas.

El tratamiento con acivicina produjo una disminución tanto de los niveles de GSH como de la proliferación en ambas células de forma dosis-dependiente. Sin embargo, este efecto fue más acusado en el caso de las células F21. Si bien la concentración de 1 μM de acivicina no modificó los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH, en las células F21 disminuyó un 30% los niveles de GSH y 1.6 veces la tasa proliferativa con respecto al control [Figura 25].

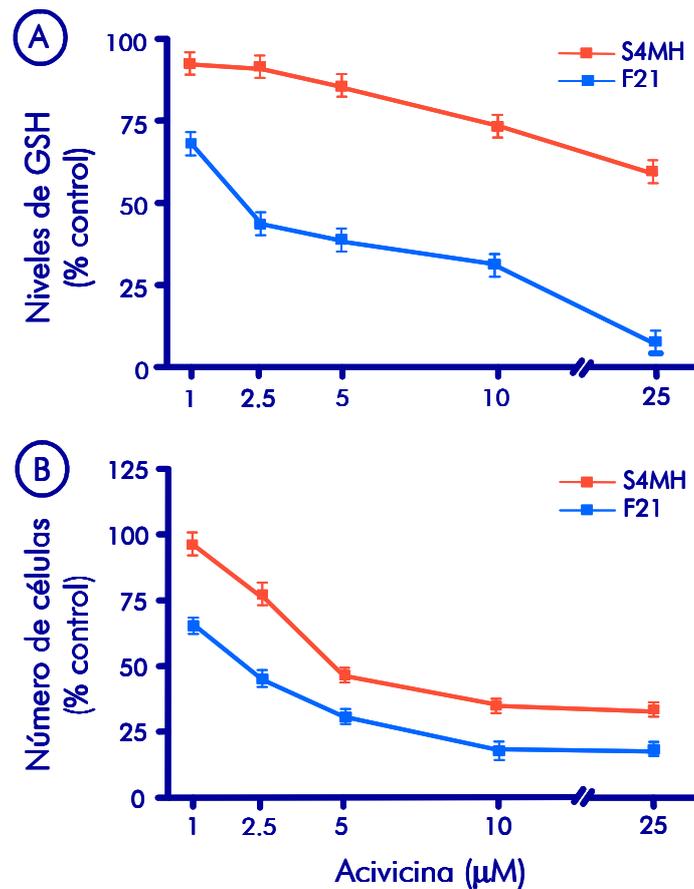


Figura 25. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 tratadas con acivicina.

V. 1. 3. 2. 4. Efecto del tratamiento combinado de acivicina+BSO sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21.

En primer lugar, las células fueron expuestas a acivicina (1 μM) durante 10 horas. Transcurrido este tiempo se llevó a cabo el tratamiento con BSO (100 μM) durante 6 horas.

En relación a los niveles de GSH, en las células S4MH, la exposición previa a acivicina no produjo diferencias con respecto al tratamiento con BSO sólo. En el caso de las células F21, se produjo una disminución de un 38% de los niveles de GSH (similar a la observada cuando las células son tratadas con acivicina sola). Asimismo, el tratamiento combinado elimina el incremento de los niveles de GSH observado a las 72 horas cuando las células son tratadas solo con BSO.

Respecto a la proliferación, el tratamiento combinado disminuyó 1.6 veces la tasa proliferativa de las células S4MH a las 48 horas con respecto al control. Dicho tratamiento disminuyó la proliferación con respecto al tratamiento con acivicina sola pero no modificó la tasa proliferativa producida por el BSO solo. Por otro lado, el tratamiento conjunto de acivicina+BSO en las células F21 disminuyó 2 veces su tasa proliferativa con respecto al control. Esta disminución fue superior a la producida cuando las células fueron tratadas con acivicina o BSO de forma independiente [Figura 26].

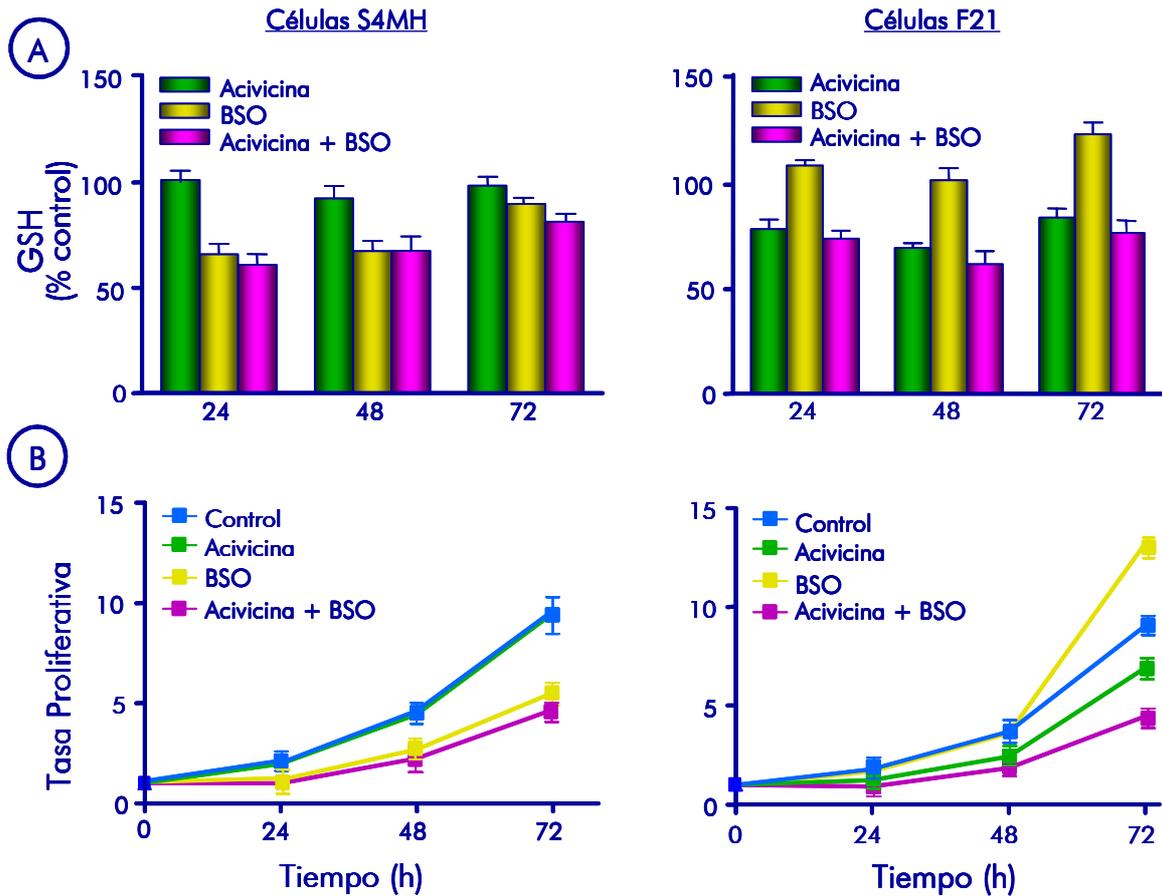


Figura 26. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 tratadas con acivicina+BSO.

V. 1. 3. 2. 5. Efecto del tratamiento combinado de BSO+ATRA sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21.

Las células fueron tratadas en primer lugar con BSO (100 μM) durante 6 horas, momento en el que se retiró el tratamiento y se añadió ATRA (10^{-8} M), que se mantuvo de forma continua hasta el final de la experiencia.

La combinación de BSO+ATRA disminuyó los niveles de GSH de las células S4MH con respecto al control (reducción del 43% a las 48 horas). Esta disminución es similar a la producida por el BSO sólo. En el caso de las células F21, el tratamiento combinado no produjo diferencias significativas con respecto al control, aunque si se observó una disminución significativa de los niveles de GSH con

respecto a los tratamientos de BSO y ATRA utilizados de forma independiente (reducción de 2.4 y 1.8 veces, respectivamente).

En relación al efecto sobre la proliferación celular, el tratamiento combinado produjo una disminución significativa de la tasa proliferativa en ambas líneas celulares, si bien, el efecto fue más acusado en las células S4MH que en las células F21 (disminución de 2.4 y 2 veces a las 48 horas con respecto al control, respectivamente). Sin embargo, en las células F21 se recuperan los niveles del control a las 72 h [Figura 27].

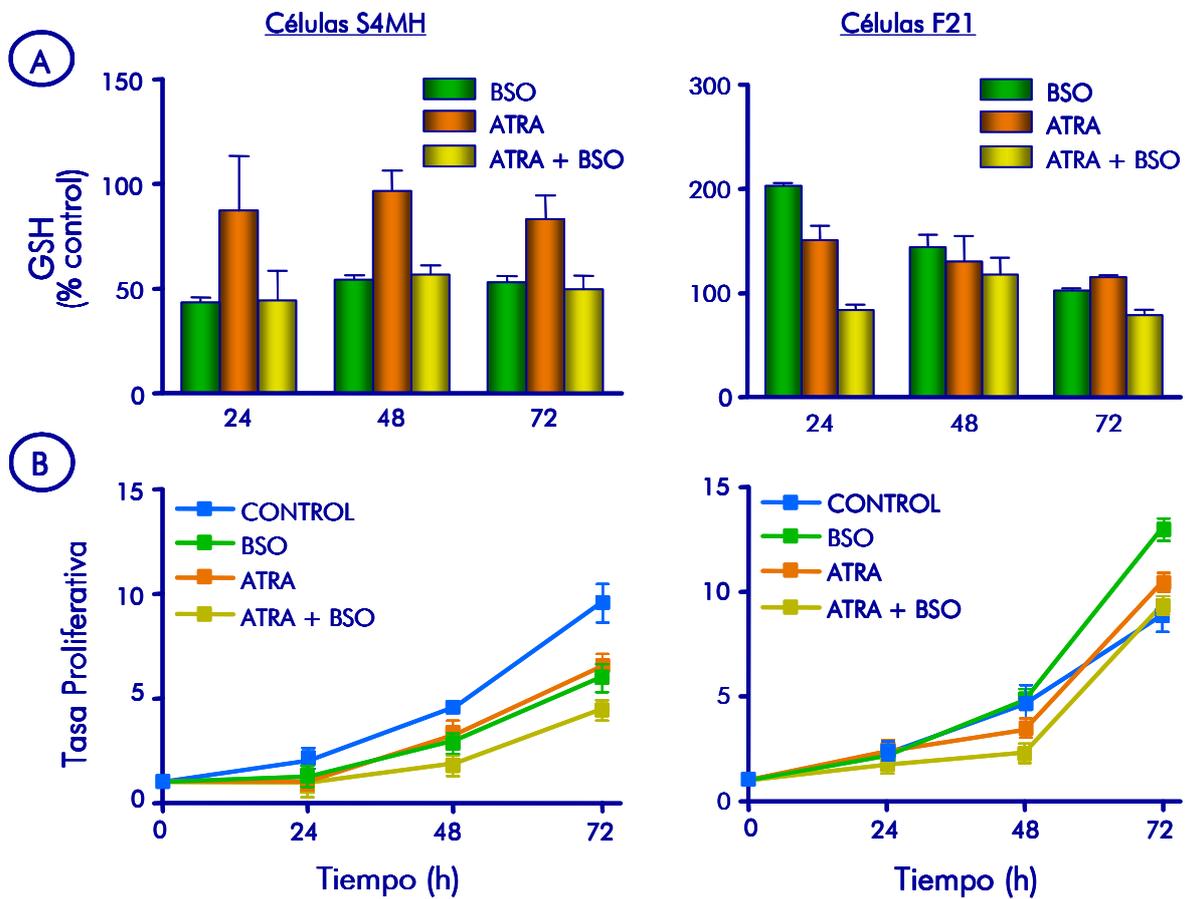


Figura 27. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 tratadas con BSO+ATRA.

V. 1. 3. 3. Estudio del efecto producido por la acroleína (AC) sola y en combinación con ATRA y BSO, sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21.

V. 1. 3. 3. 1. Efecto de la AC sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21.

Con el fin de determinar la concentración más adecuada de AC para los siguientes experimentos, se estudió la proliferación celular en un rango de 0.002 a 0.032 μM de AC y un tiempo de exposición de una hora. Se produjo en todos los casos una disminución dosis-dependiente de la proliferación, si bien las células tratadas con la concentración más alta presentaban perfiles tóxicos.

Se determinó la concentración 0.002 μM como la más adecuada para los siguientes experimentos. En cuanto a los niveles de GSH, se produjo una disminución máxima de los mismos a las 24 horas, que fue de un 63% y 59% en las células S4MH y F21, respectivamente, con relación al control. El tratamiento con AC también produjo una disminución de la tasa proliferativa en ambos tipos de células, si bien las S4MH se vieron más afectadas por el tratamiento (disminución de 2,4 y 1.3 veces en las células S4MH y F21, respectivamente a las 48 horas de cultivo). Sin embargo, aunque se observó una disminución significativa de los niveles de GSH y de la proliferación celular con respecto al control, las células conservaban una buena morfología, eran capaces de seguir proliferando y llegaban a recuperarse según transcurría el tiempo de cultivo una vez retirado el tratamiento [Figura 28].

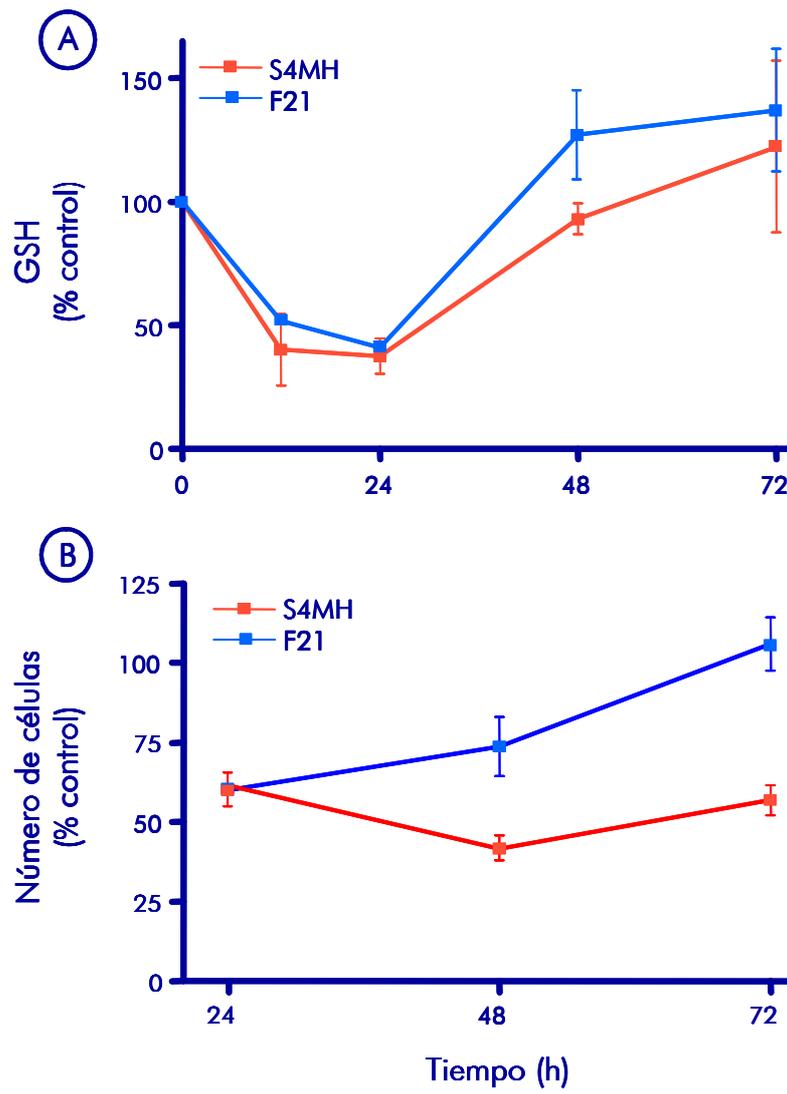


Figura 28. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM).

V. 1. 3. 3. 2. Efecto del tratamiento combinado de AC+BSO sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21.

Para llevar a cabo el tratamiento combinado, las células fueron expuestas inicialmente al BSO 100 μM durante 6 horas. Una vez retirado el BSO del medio de cultivo, las células fueron tratadas con AC 0.002 μM durante una hora.

Respecto a los niveles de GSH, tanto en las células S4MH como en las F21 se produce una disminución significativa de los niveles de GSH con respecto al control. En relación al tratamiento con AC sola, la combinación BSO+AC produjo una disminución de los niveles de GSH ya a las 12 horas de cultivo, tanto en las células S4MH como en las F21 (disminución de 5 y 2 veces respectivamente). Sin embargo estos niveles se recuperaron según transcurrió el tiempo de cultivo; esta recuperación se produjo antes en las células F21 (a las 24 horas) que en las células S4MH (a las 48 horas).

En ambos tipos celulares el tratamiento combinado produce una disminución significativa de la proliferación celular con respecto al control, aunque en las células F21 se observó una recuperación de dicha proliferación a las 72 horas de cultivo. Sin embargo, cuando se compara con el tratamiento con AC sólo, el tratamiento combinado disminuye significativamente la proliferación de las células S4MH (disminución de 1.8 veces a las 48 horas), mientras que en las F21 no se observan diferencias significativas [Figura 29].

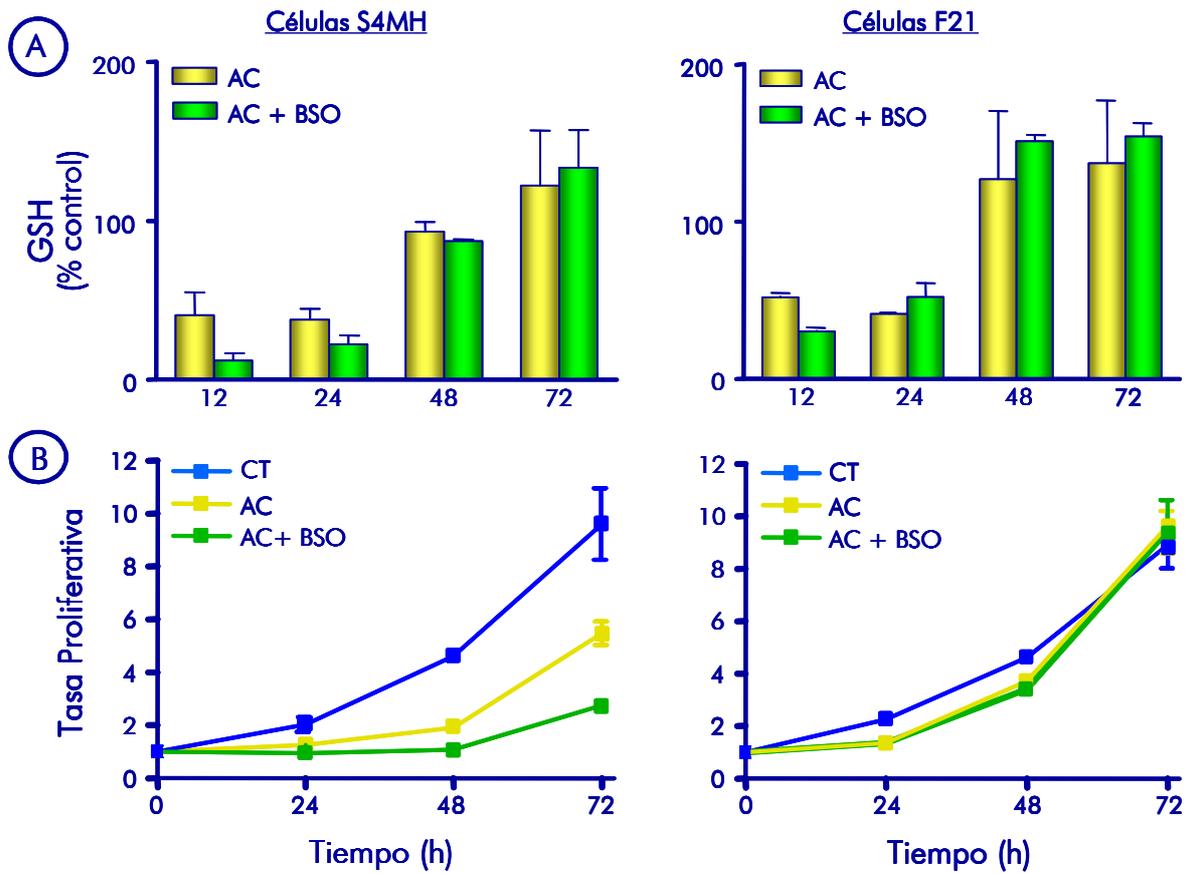


Figura 29. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μ M)+BSO (100 μ M).

V. 1. 3. 3. 3. Efecto del tratamiento combinado de AC+ATRA sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21.

En este caso, en primer lugar, las células fueron tratadas durante 1 hora con AC 0.002 μ M y una vez retirado el tratamiento, se añadió ATRA 10^{-8} M, hasta el fin del experimento.

Los niveles de GSH disminuyeron significativamente respecto al control tanto en las células S4MH como en las F21 (reducción de un 69 y 56%, respectivamente, a las 12 horas con respecto al control), si bien en los últimos tiempos de medida se observó una recuperación completa de los niveles de GSH. No se observaron diferencias significativas si comparamos el tratamiento combinado con respecto a la AC sola en ambos tipos celulares.

En las células S4MH, el tratamiento combinado disminuyó su tasa proliferativa si lo comparamos tanto con el control como con la AC sola (3.2 y 1.3 veces a las 48 horas respectivamente). Sin embargo, en las células F21 este tratamiento no modificó la proliferación en ninguno de los casos [Figura 30].

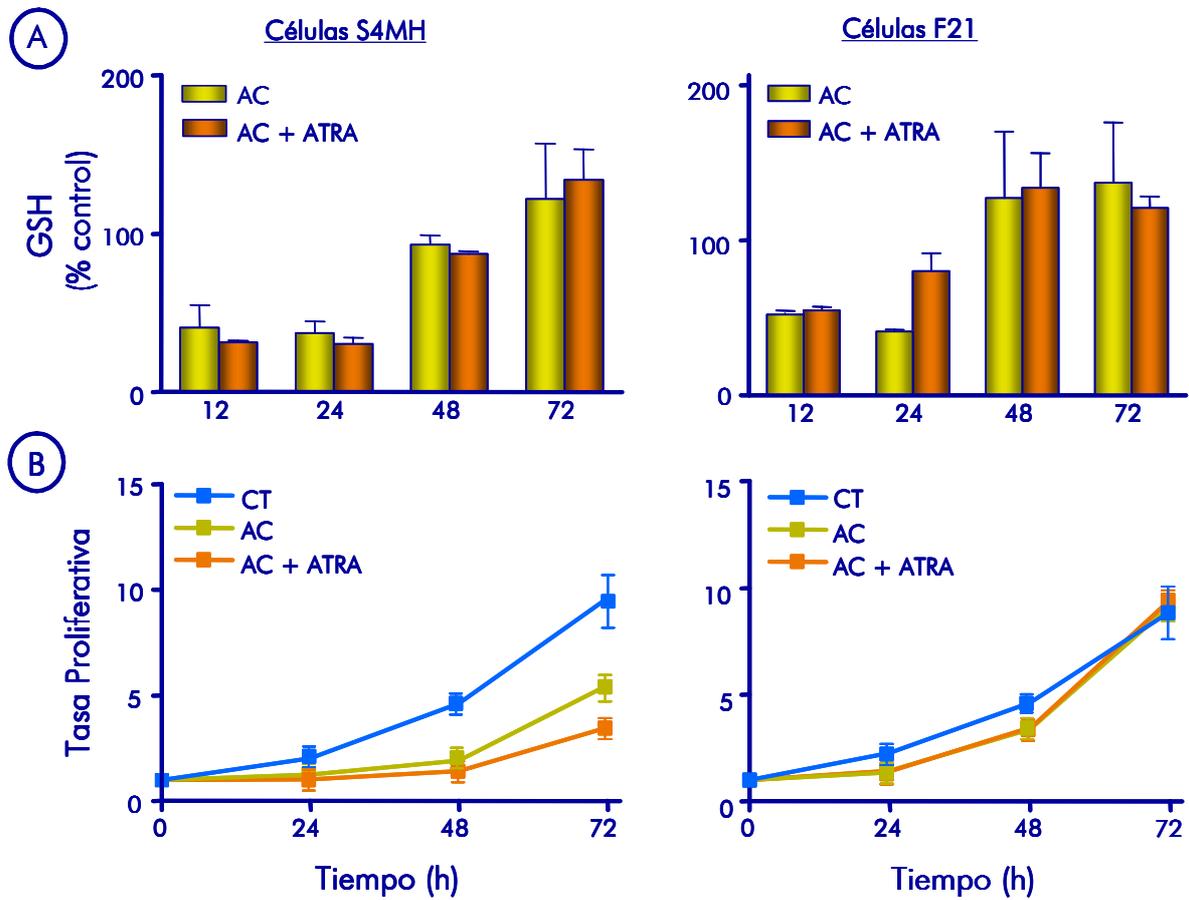


Figura 30. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 tratadas con AC ($0.002 \mu\text{M}$) + ATRA (10^{-8}M).

V. 1. 3. 3. 4. Efecto del tratamiento combinado de AC+BSO+ATRA sobre los niveles de GSH y proliferación de las células S4MH y F21.

Para realizar el tratamiento combinado, las células fueron expuestas en primer lugar al BSO (100 μM) durante 6 horas; una vez retirado el tratamiento se adicionó AC (0.002 μM) durante 1 hora y, finalmente, tras eliminar este fármaco, las células fueron tratadas con ATRA (10^{-8} M) de forma continuada hasta el final de la experiencia.

Respecto a los niveles de GSH, en las células S4MH, la triple combinación disminuye significativamente los niveles de GSH con respecto al control (disminución de 3.8 veces a las 24 horas), pero no con respecto a la AC sola ni a los tratamientos combinados AC+BSO y AC+ATRA. En las células F21, la triple combinación produjo una disminución significativa de los niveles de GSH con respecto al control (disminución de 2.1 veces a las 24 horas) y con respecto al doble tratamiento AC+BSO (disminución de 1.3 veces a las 48 horas), pero no se observaron diferencias con respecto al tratamiento combinado AC+ATRA ni con la AC sola.

En las células S4MH, el triple tratamiento produjo una disminución significativa de la proliferación celular con respecto al control (5.4 veces), a la AC sola (2.3 veces), AC+BSO (1.5 veces) y AC+ATRA (2 veces). Asimismo, en las células F21, la tasa proliferativa disminuyó 2 veces con respecto al control, 1.5 veces con respecto a la AC sola, 1.6 veces con respecto al tratamiento CY+BSO y 1.5 con respecto al CY+ATRA [Figura 31].

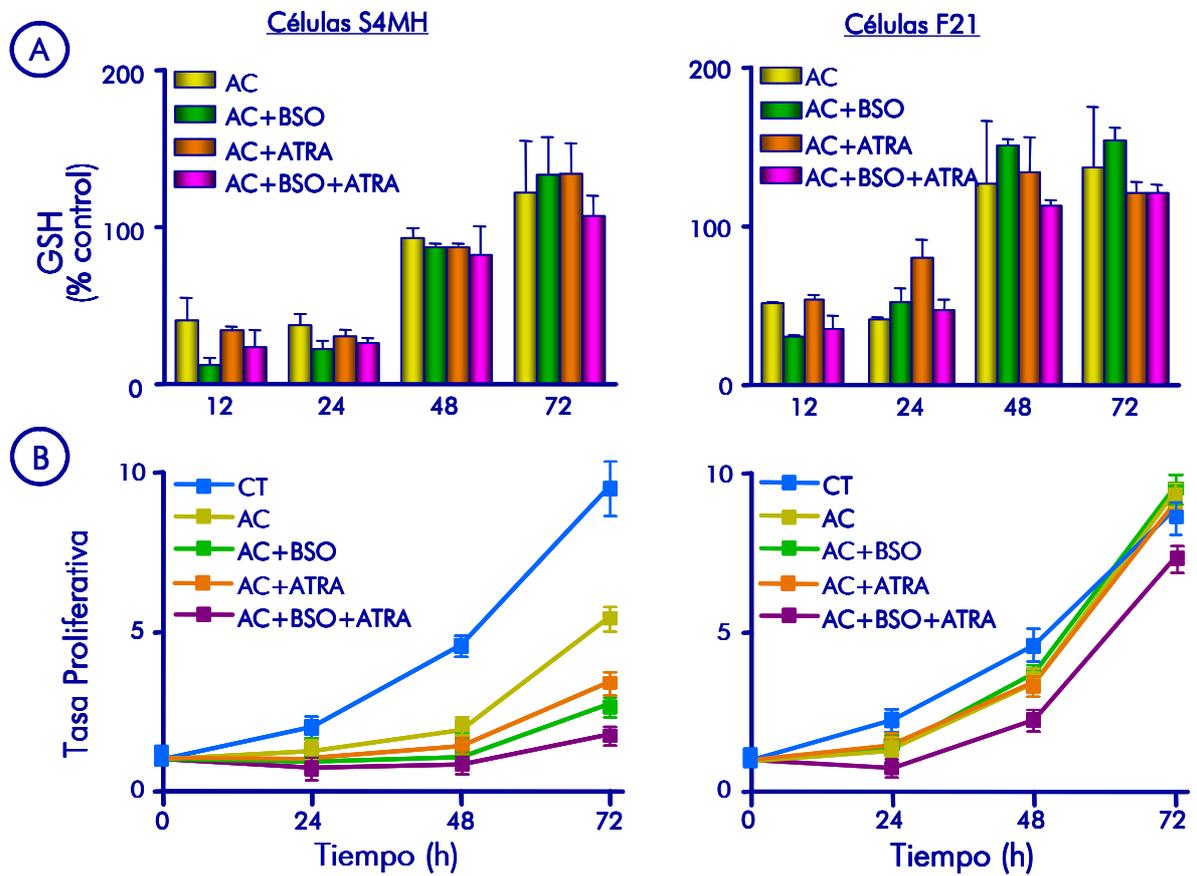


Figura 31. Niveles de GSH (A) y proliferación (B) de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM) + BSO (100 μM) + ATRA (10^{-8} M).

V. 1. 4. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA γ -GLUTAMILTRANSPEPTIDASA (GGT)

V. 1. 4. 1. Actividad GGT de las células S4MH y F21 controles

En la líneas celulares utilizadas, se observó que los niveles basales de actividad GGT en las células F21 son 2.3 veces superiores a las de las células S4MH [Figura 32].

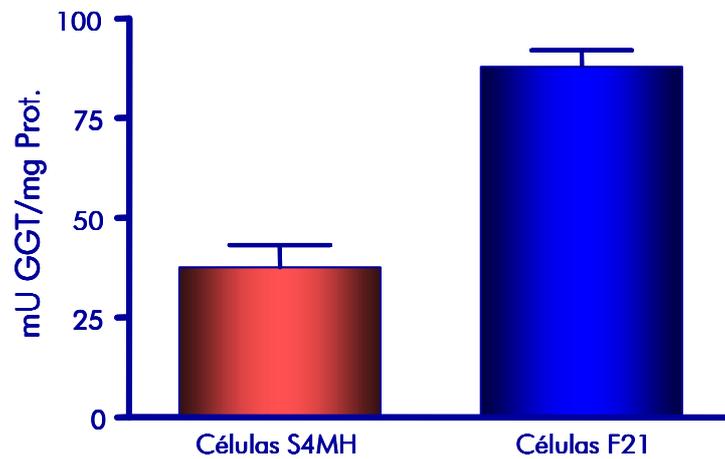


Figura 32. Actividad GGT (mU GGT/mg Proteína) de las células S4MH y F21.

V. 1. 4. 2. Estudio del efecto del BSO, ATRA y acivicina sobre la actividad de la enzima GGT en las células S4MH y F21.

V. 1. 4. 2. 1. Estudio del efecto de la acivicina sobre la actividad de la enzima GGT en las células S4MH y F21.

Las células fueron expuestas a concentraciones crecientes de acivicina (inhibidor irreversible de la enzima GGT) durante 10 horas, momento en el cual se determinó la actividad GGT.

La acivicina disminuye la actividad GGT de forma dosis-dependiente en ambos tipos de células. Sin embargo se observó que la acivicina afectó en mayor medida a la actividad enzimática de las células F21 que a las S4MH. Así, con la concentración de 1 μM de acivicina –utilizada para los siguientes tratamientos combinados– pudimos observar que en las células S4MH la actividad GGT disminuyó 1.5 veces con respecto al control, mientras que en las células F21 esta disminución llegó a ser de 2.2 veces [Figura 33].

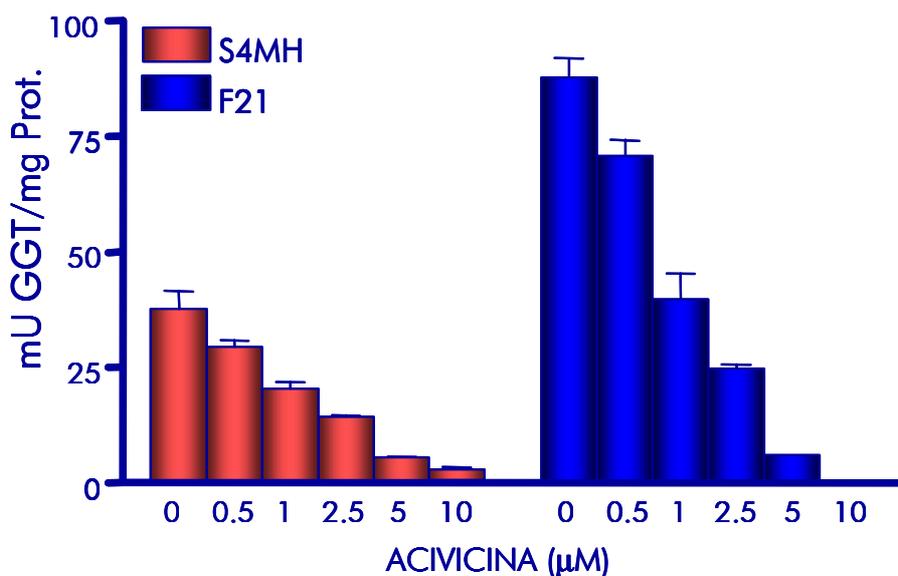


Figura 33. Actividad GGT (mU GGT/mg proteína) de las células S4MH y F21 tratadas con acivicina (0.5-10 μM).

V. 1. 4. 2. 2. Estudio del efecto del BSO sobre la actividad de la enzima GGT en las células S4MH y F21.

Las células fueron tratadas durante 6 horas con BSO (100 y 500 μM); una vez finalizado el tratamiento, se determinó la actividad GGT.

En las células S4MH, el tratamiento con BSO (100 y 500 μM) disminuyó la actividad de la enzima 2.2 y 3.7 veces respectivamente, con relación al control.

Sin embargo, en las células F21 se produjo un incremento significativo de la actividad GGT, que llega a ser 1.4 y 1.3 veces superior con las concentraciones de 100 y 500 μM de BSO, respectivamente, en comparación con el control [Figura 34].

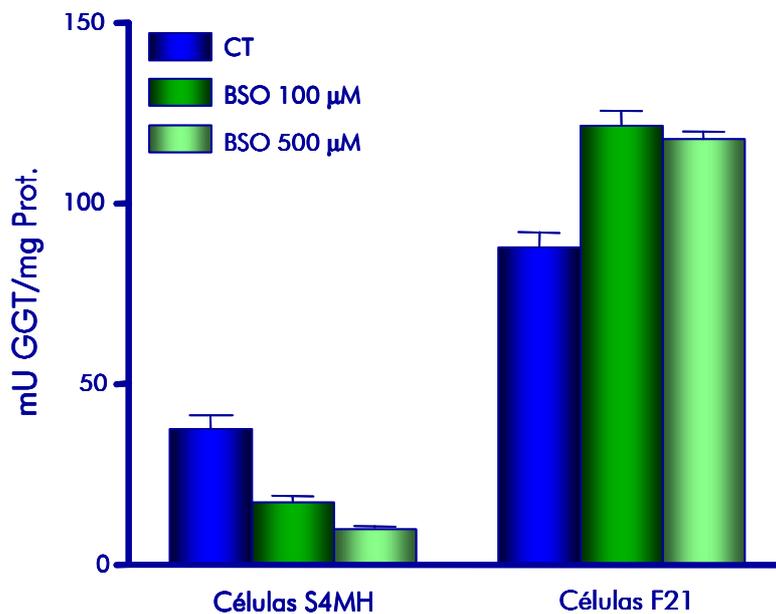


Figura 34. Actividad GGT (mU GGT/mg proteína) de las células S4MH y F21 tratadas con BSO (100 Y 500 μM).

V. 1. 4. 2. 4. Estudio del efecto de la combinación BSO+ATRA sobre la actividad de la enzima GGT en las células S4MH y F21.

Las células fueron tratadas inicialmente con 100 μM de BSO durante 6 horas; una vez retirado el BSO del medio de cultivo, las células se expusieron a ATRA (10^{-8} M) durante 6 horas. Pasado este tiempo se llevó a cabo la determinación de la actividad GGT.

En las células S4MH, el tratamiento combinado produjo una disminución de la actividad GGT de 2 veces con respecto al control, pero no se observaron diferencias con respecto a los tratamientos aislados con ATRA o BSO.

En las células F21, el tratamiento combinado no modificó significativamente la actividad GGT con respecto al control, sin embargo produjo una disminución significativa con respecto al tratamiento con BSO (1.4 veces) o ATRA (2.3 veces) administrados de forma independiente [Figura 36].

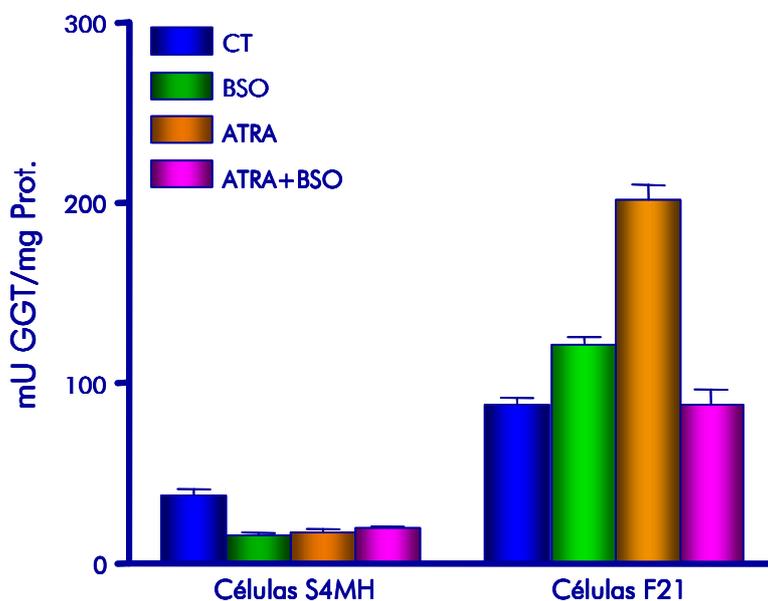


Figura 36. Actividad GGT (mU GGT/mg proteína) de las células S4MH y F21 tratadas con ATRA (10^{-8} M)+BSO (100 μM).

V. 1. 4. 3. Estudio del efecto producido por la AC sola y en combinación con ATRA y BSO, sobre la actividad de la enzima GGT en las células S4MH y F21.

V. 1. 4. 3. 1. Estudio del efecto de la AC sobre la actividad de la enzima GGT en las células S4MH y F21.

Tras la exposición de las células durante 1 hora a AC (0.002 μM), se determinó la actividad GGT.

En las células S4MH, el tratamiento con AC disminuyó 1.9 veces la actividad GGT, con respecto al control. Sin embargo, en las células F21, se produjo un aumento de 1.8 veces de dicha actividad, con respecto al control [Figura 37].

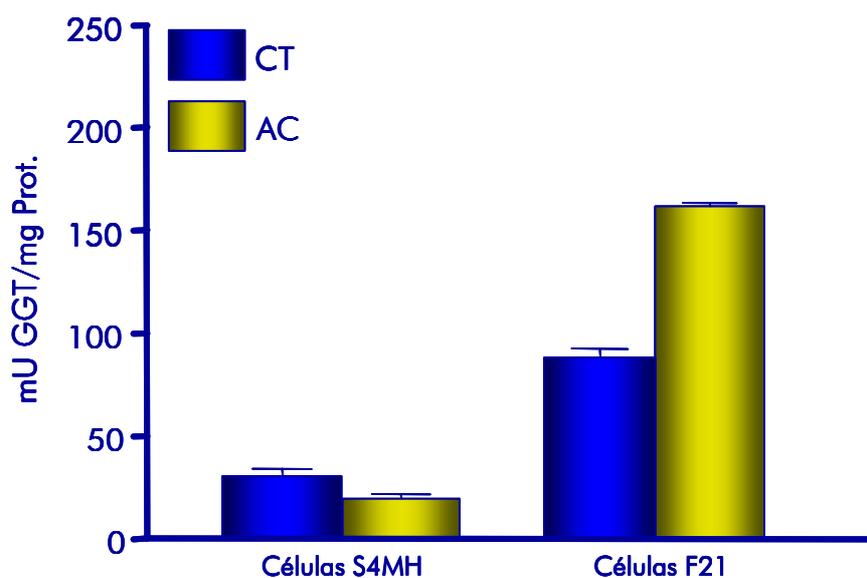


Figura 37. Actividad GGT (mU GGT/mg Proteína) de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)

V. 1. 4. 3. 2. Estudio del efecto combinado AC+BSO sobre la actividad de la enzima GGT en las células S4MH y F21.

Los cultivos fueron tratados, en primer lugar, con BSO (100 μM) durante 6 horas. Una vez retirado el BSO del medio, las células fueron expuestas a AC (0.002 μM) durante 1 hora.

En las células S4MH, el tratamiento combinado disminuyó 2 veces la actividad GGT con respecto al control ($p < 0.01$). Si bien esta disminución de la actividad GGT fue mayor que la producida por el tratamiento con AC sola, no existen diferencias significativas entre los tratamientos con AC y la combinación AC+BSO.

En las células F21, el tratamiento con AC+BSO aumentó 2.1 veces la actividad GGT con respecto al control. En este caso, también se produjo un aumento significativo de la actividad GGT con respecto al tratamiento con AC sola ($p < 0.05$) [Figura 38].

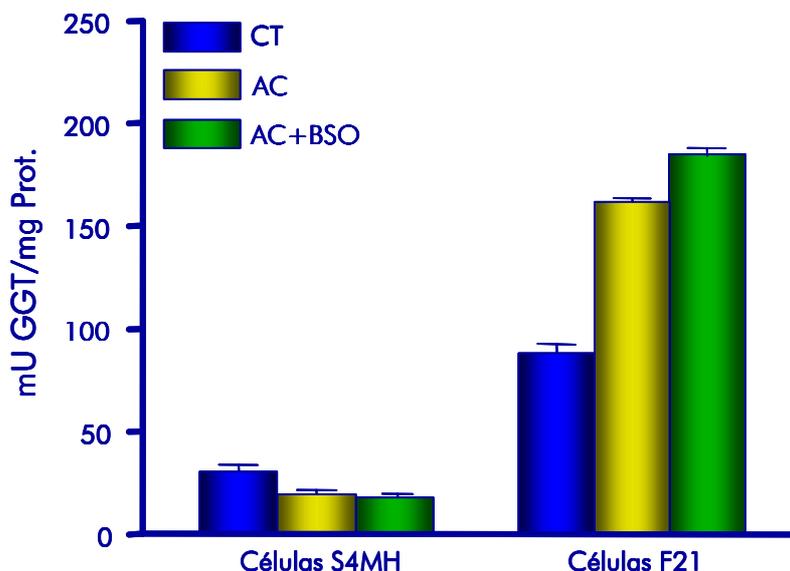


Figura 38. Actividad GGT (mU GGT/mg Proteína) de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)+BSO (100 μM).

V. 1. 4. 3. 3. Estudio del efecto combinado AC+ATRA sobre la actividad de la enzima GGT en las células S4MH y F21.

Los cultivos fueron tratadas con AC (0.002 μ M) durante una hora; una vez retirado el tratamiento, las células fueron expuestas a ATRA 10^{-8} M durante 6 horas.

En las células S4MH, el tratamiento combinado disminuyó 2.2 veces la actividad GGT con respecto al control ($p < 0.01$). No se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento combinado AC+ATRA y el de AC aislada.

En las células F21, el tratamiento combinado aumentó 2 veces la actividad GGT con respecto al control ($p < 0.01$), pero tampoco se encontraron diferencias significativas con respecto al tratamiento con AC sola [Figura 39].

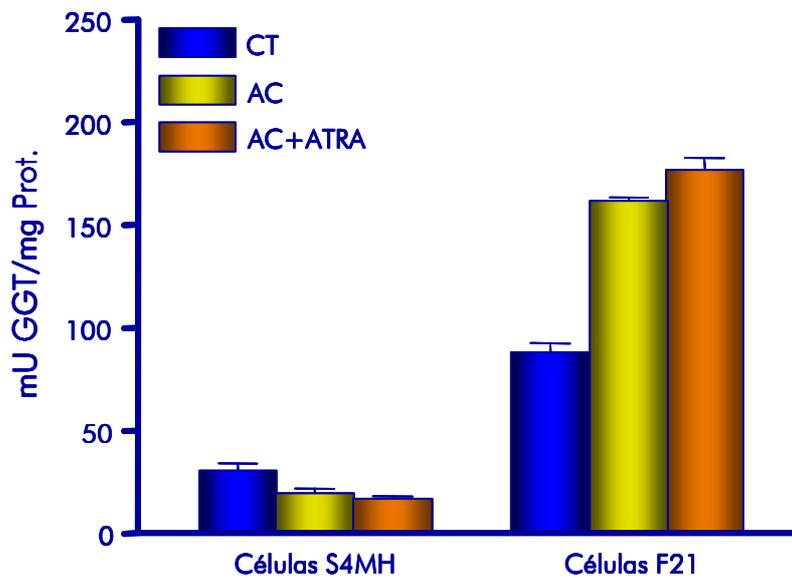


Figura 39. Actividad GGT (mU GGT/mg Proteína) de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μ M)+ATRA (10^{-8} M).

V. 1. 4. 3. 4. Estudio del efecto combinado AC+BSO+ATRA sobre la actividad de la enzima GGT en las células S4MH y F21.

Las células fueron tratadas inicialmente con BSO (100 μ M) durante 6 horas; una vez retirado el tratamiento se añadió AC (0.002 μ M) durante 1 hora y finalmente, tras eliminar la AC, las células fueron expuestas a ATRA (10⁻⁸ M) durante 6 horas. Una vez finalizado el tratamiento, se llevó a cabo la determinación de la actividad GGT.

En el caso de las células S4MH, la triple combinación disminuyó 3 veces la actividad GGT, con respecto al control. El efecto de la combinación AC+BSO+ATRA supone una disminución significativa de la actividad con respecto al tratamiento con AC sola y con las dobles combinaciones (AC+BSO y AC+ATRA) que llegó a ser de 1.6, 1.5 y 1.4 veces, respectivamente.

En las células F21, la triple combinación produjo un aumento de la actividad GGT de 2.3 veces con respecto al control ($p < 0.01$). Este tratamiento, así mismo, incrementó 1.3 veces dicha actividad con respecto al tratamiento con AC sola ($p < 0.01$), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con respecto a los tratamientos de AC+BSO y AC+ATRA [Figura 40].

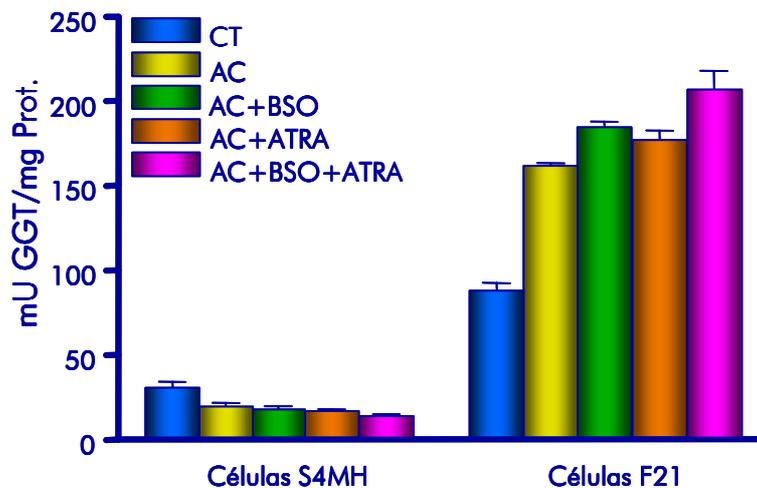


Figura 40. Actividad GGT (mU GGT/mg proteína) de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μ M)+BSO (100 μ M)+ATRA (10⁻⁸ M).

V. 1. 5. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS REACTIVOS DEL OXÍGENO (MROs) EN LAS CÉLULAS S4MH Y F21.

V. 1. 5. 1. MROs de las células S4MH y F21 controles

En primer lugar, se compararon los niveles basales de MROs entre las células S4MH y F21. Dichos niveles son 1.3 veces superiores en las células S4MH que en las células F21 ($P < 0.01$) [Figura 41].

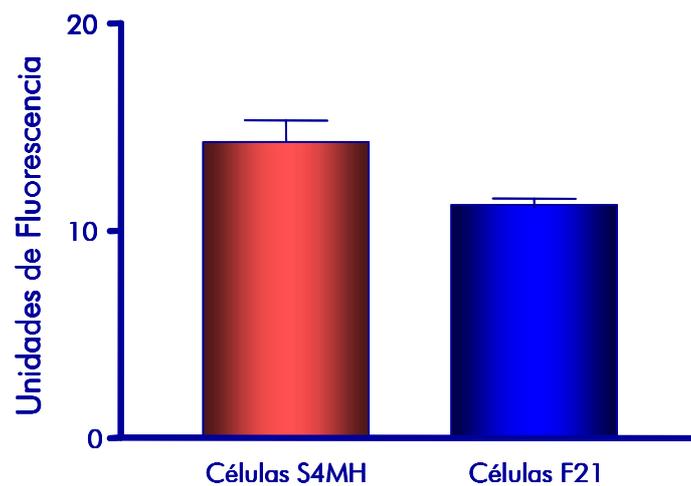


Figura 41. MROs de las células S4MH y F21 controles.

V. 1. 5. 2. Estudio del efecto del BSO, ATRA y acivicina solos y en combinación, sobre la producción de MROs en las células S4MH y F21.

V. 1. 5. 2. 1. Estudio del efecto del BSO sobre la producción de MROs en las células S4MH y F21.

El tratamiento durante 6 horas con BSO incrementó de forma dosis-dependiente la producción de MROs en las células S4MH, llegando ésta a ser 2.7 y 4 veces superior al control con las concentraciones de 100 μM y 500 μM , respectivamente.

Sin embargo, en las células F21 se produjeron efectos diferentes dependiendo de la concentración utilizada. Cuando las células se trataron con la concentración 100 μM , los niveles de MROs disminuyeron 1.6 veces, con respecto al control. Por el contrario, cuando se utilizó la concentración de 500 μM se produjo un incremento de 1.7 veces en el nivel de MROs [Figura 42].

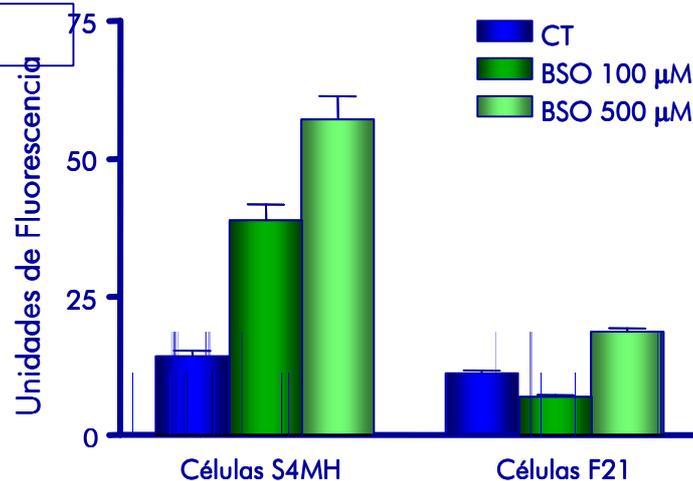


Figura 42. Niveles de MROs de las células S4MH y F21 tratadas con BSO (100 y 500 μM).

V. 1. 5. 2. 2. Estudio del efecto del ATRA sobre la producción de MROs en las células S4MH y F21.

El tratamiento durante 6 horas con ATRA 10^{-8} M produjo un incremento de la producción de MROs tanto en las células S4MH como en las F21 que llegó a ser de 2.2 y 2.8 veces, respectivamente, comparadas con el control [Figura 43].

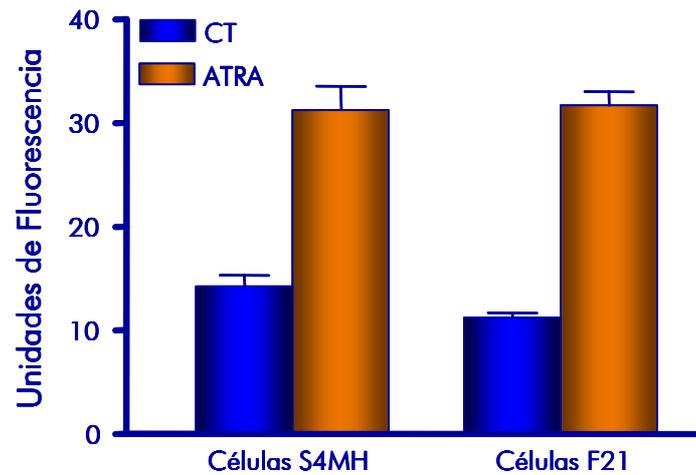


Figura 43. Niveles de MROs de las células S4MH y F21 tratadas con ATRA (10^{-8} M).

V. 1. 5. 2. 3. Estudio del efecto de la acivicina y BSO sobre la producción de MROs en las células S4MH y F21.

En las células S4MH, el tratamiento con acivicina (1 μM) no modificó la producción de MROs. Sin embargo el tratamiento combinado de acivicina (1 μM) y BSO (100 μM) produjo un incremento de 2.9 de los niveles de MROs con respecto al control, si bien no se observaron diferencias entre el tratamiento combinado (acivicina+BSO) y el tratamiento con BSO solo.

En el caso de las células F21, el tratamiento con acivicina incrementó 1.3 veces los niveles de MROs con respecto al control. El tratamiento combinado (acivicina+BSO) produjo un incremento de 1.4 veces con respecto al control, no existiendo diferencias significativas entre el tratamiento combinado y el tratamiento con acivicina sola [Figura 44].

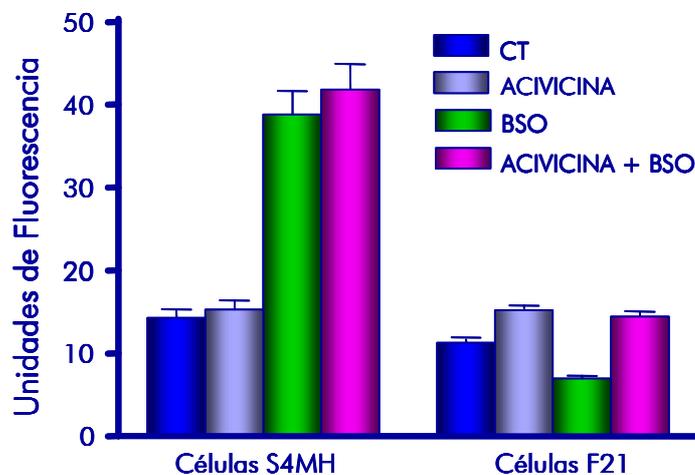


Figura 44. Niveles de MROs de las células S4MH y F21 tratadas con acivicina (1 μM) y BSO (100 μM).

V. 1. 5. 2. 4. Estudio del efecto de la combinación BSO+ATRA sobre la producción de MROs en las células S4MH y F21.

El tratamiento combinado de BSO (100 μM)+ATRA (10^{-8} M) produjo un incremento de la producción de MROs con respecto al control a las 12 horas, tanto en las células S4MH como en las F21 (aumento de 6.5 y 7.4 veces, respectivamente, $p < 0.0001$) [Figura 45].

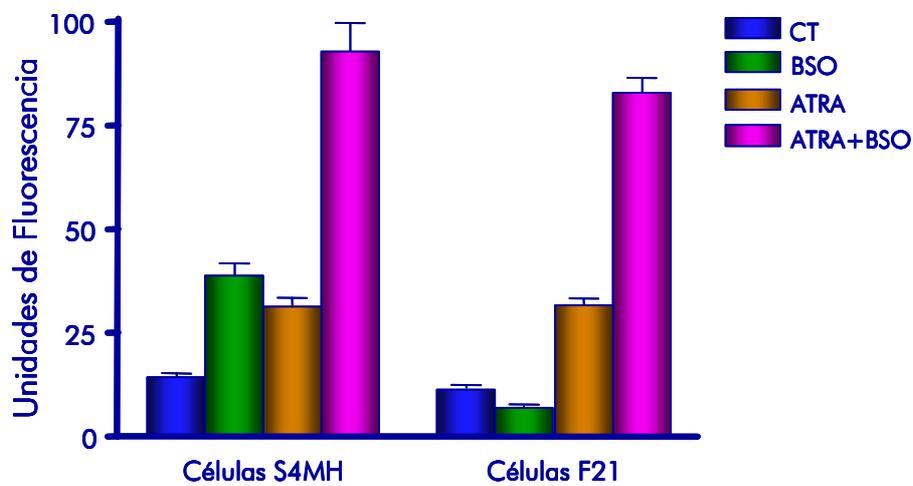


Figura 45. Niveles de MROs de las células S4MH y F21 tratadas con BSO (100 μM) + ATRA (10^{-8} M).

V. 1. 5. 3. Estudio del efecto producido por la AC sola y en combinación con ATRA y BSO, sobre la producción de MROs en las células S4MH y F21.

V. 1. 5. 3. 1. Estudio del efecto de la AC sobre la producción de MROs en las células S4MH y F21.

El tratamiento con AC (0.002 μ M) aumentó la producción de MROs 3.3 veces con respecto al control en las células S4MH ($p < 0.0001$). Sin embargo, el mismo tratamiento disminuyó 1.2 veces los niveles de MROS con respecto al control en las células F21 ($p < 0.05$) [Figura 46].

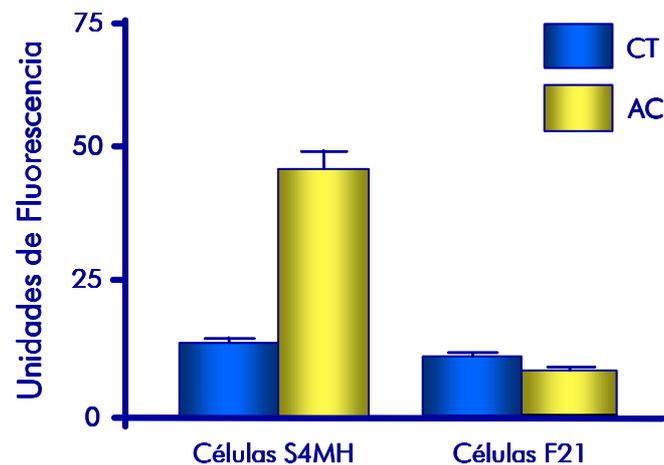


Figura 46. Niveles de MROs de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μ M).

V. 1. 5. 3. 2. Estudio del efecto combinado AC+BSO sobre la producción de MROs en las células S4MH y F21.

El tratamiento combinado de AC (0.002 μM)+BSO (100 μM) produjo un incremento en el nivel de MROs con relación a los controles en ambos tipos celulares. Sin embargo, dicho incremento fue significativamente superior en las células S4MH (12.3 veces) ($p<0.0001$) que en las células F21 (1.2 veces, $p<0.01$).

En ambos tipos celulares el tratamiento de AC+BSO indujo un incremento en la producción de MROs con respecto al tratamiento con la AC sola [Figura 47].

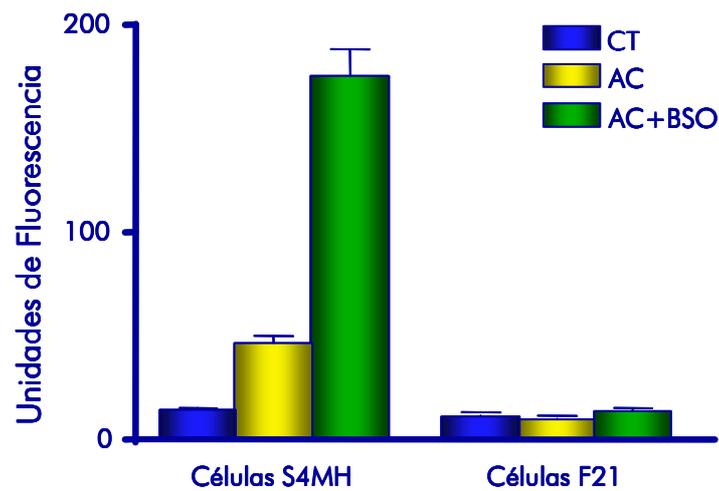


Figura 47. Niveles de MROs de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)+BSO (100 μM).

V. 1. 5. 3. 3. Estudio del efecto combinado AC+ATRA sobre la producción de MROs en las células S4MH y F21.

En las células S4MH, el tratamiento combinado AC+ATRA disminuyó 1.2 veces la producción de MROs con respecto al control ($P=0.05$) y 3.7 veces respecto al tratamiento con AC ($p<0.01$). En las células F21, por el contrario, se produjo un incremento de 1.4 veces en dichos niveles en comparación al control y 1.5 veces respecto al tratamiento con AC sola ($P<0.01$) [Figura 48].

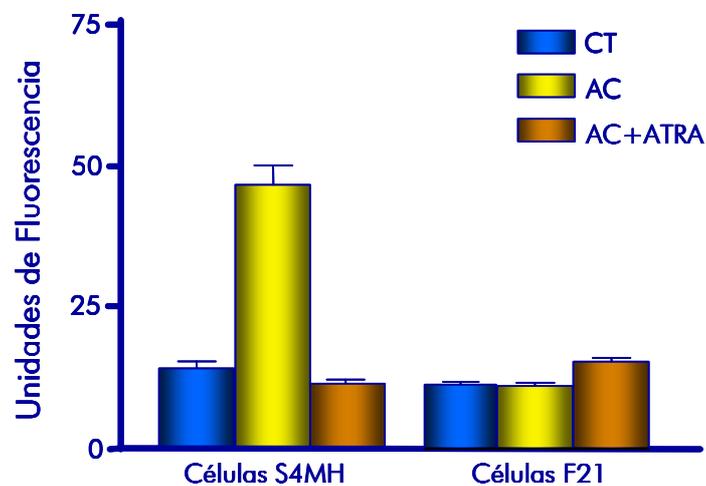


Figura 48. Niveles de MROs de las células S4MH y F21 tratadas con AC ($0.002 \mu\text{M}$)+ATRA (10^{-8} M).

V. 1. 5. 3. 4. Estudio del efecto combinado AC+BSO+ATRA sobre la producción de MROs en las células S4MH y F21.

La triple combinación AC+BSO+ATRA produjo un incremento en la producción de MROs en las células S4MH y F21 que fue de 1.5 y 1.9 veces respectivamente, con relación al control. Con respecto al resto de tratamientos, en el caso de las células S4MH, el triple tratamiento produjo una disminución en el nivel de MROs con respecto a la AC sola (2.2 veces) y al doble tratamiento AC+BSO (8.2 veces), pero un incremento con respecto al doble tratamiento AC+ATRA (1.7 veces). En las células F21, se produjo un incremento en la producción de MROs no sólo con respecto a la AC sola (2.1 veces), sino también con respecto a los dobles tratamientos AC+BSO y AC+ATRA (1.5 y 1.4 veces, respectivamente) [Figura 49].

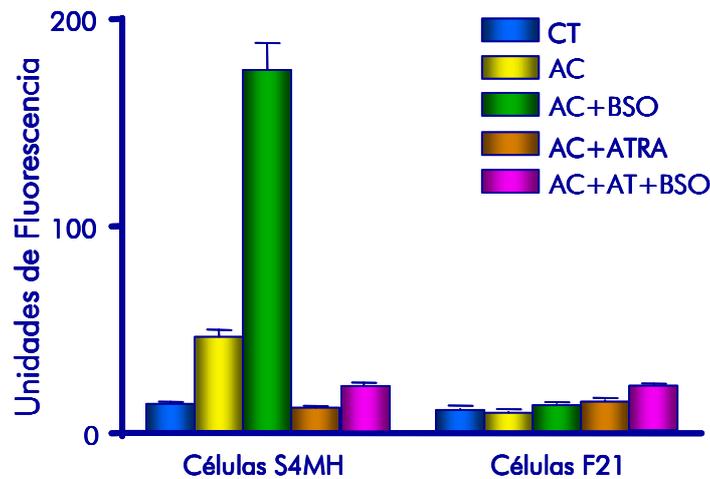


Figura 49. Niveles de MROs de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μ M)+BSO (100 μ M)+ATRA (10^{-8} M).

V. 1. 6. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS EN LAS CÉLULAS S4MH Y F21.

En todos los casos, el porcentaje de células apoptóticas en los cultivos se determinó a las 48 horas de iniciados los diferentes tratamientos.

V. 1. 6. 1. Apoptosis en las células S4MH y F21 controles.

En condiciones óptimas de cultivo, tanto las células S4MH como las F21 mostraron un porcentaje de células apoptóticas del 5%.

V. 1. 6. 2. Estudio del efecto del BSO, ATRA y acivicina solos y en combinación, sobre la apoptosis en las células S4MH y F21.

V. 1. 6. 2. 1. Estudio del efecto del BSO sobre la apoptosis en las células S4MH y F21.

En las células S4MH, el tratamiento con 100 y 500 μM de BSO aumentó el porcentaje de células apoptóticas hasta un 25% y 55%, respectivamente.

En las células F21, el tratamiento con 100 μM de BSO no modificó el porcentaje de células apoptóticas respecto al control. Sin embargo, el tratamiento con 500 μM de BSO produjo un incremento de 1.6 veces de este porcentaje con respecto al control [Figura 50].

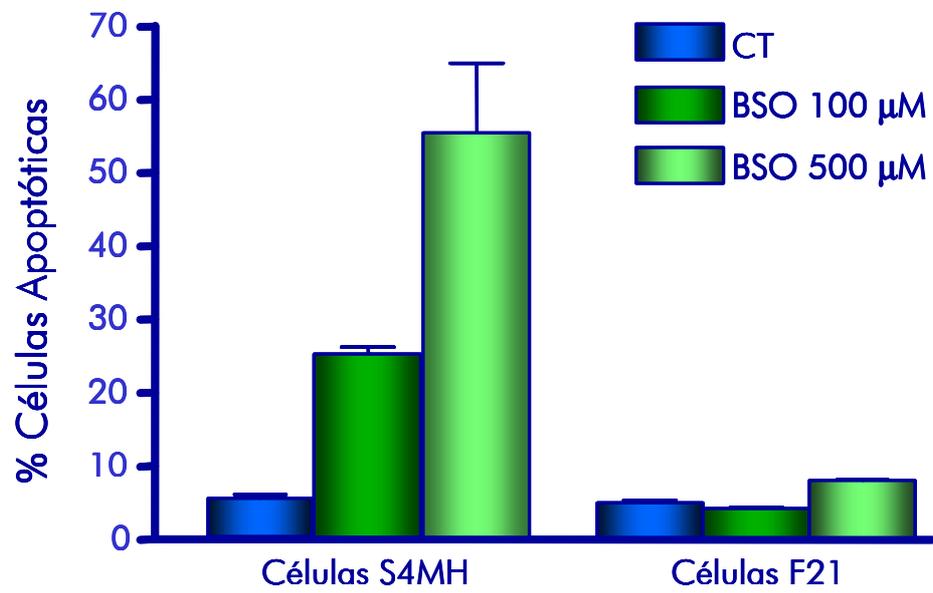


Figura 50. Apoptosis de las células S4MH y F21 tratadas con BSO (100 μM y 500 μM)

V. 1. 6. 2. 2. Estudio del efecto del ATRA sobre la apoptosis en las células S4MH y F21.

El tratamiento con 10^{-8} M de ATRA no modificó la apoptosis de las células S4MH; sin embargo, la concentración superior de 10^{-6} M incrementó 2.3 veces el porcentaje de células apoptóticas con respecto al control.

En las células F21, el tratamiento con 10^{-8} y 10^{-6} M de ATRA no modificó significativamente el porcentaje de células apoptóticas [Figura 51].

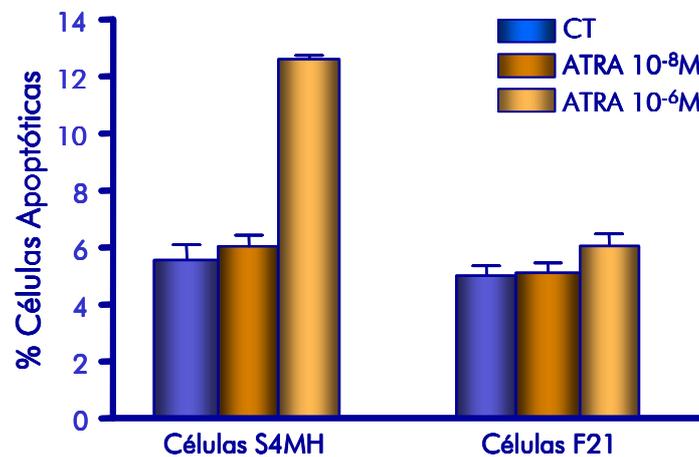


Figura 51. Apoptosis de las células S4MH y F21 tratadas con ATRA (10^{-8} M y 10^{-6} M)

V. 1. 6. 2. 3. Estudio del efecto de la acivicina sobre la apoptosis en las células S4MH y F21.

Tanto en las células S4MH como en las F21, el tratamiento con acivicina produjo un aumento de la apoptosis de forma dosis-dependiente. Además, se pudo observar que el tratamiento con acivicina, afectó de forma más significativa a las células F21 que a las S4MH. Con la concentración más baja de 1 μM , las células F21 aumentaron 3.3 veces el porcentaje de células apoptóticas, mientras que las S4MH no modificaron dicho porcentaje con el tratamiento [Figura 51].

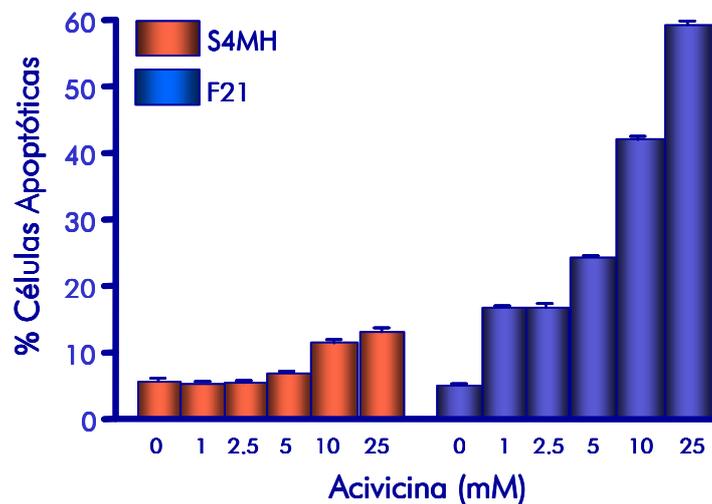


Figura 52. Apoptosis de las células S4MH y F21 tratadas con Acivicina (1-25 μM)

V. 1. 6. 2. 4. Estudio del efecto de la acivicina +BSO sobre la apoptosis en las células S4MH y F21.

En las células S4MH, el tratamiento combinado acivicina (1 μM)+BSO (100 μM) aumentó 4.5 veces la apoptosis con respecto al control (25% de células apoptóticas) pero no modificó el efecto producido por el tratamiento con BSO solo.

En las células F21, el tratamiento combinado aumentó 3.4 veces el número de células apoptóticas con respecto al control y dicho efecto proapoptótico fue similar al producido por la acivicina sola (16% y 17% de células apoptóticas, respectivamente) [Figura 53].

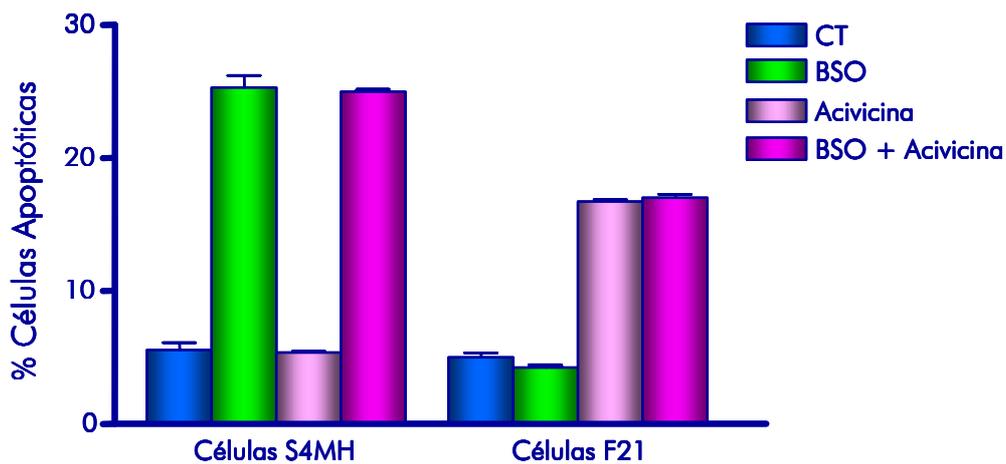


Figura 53. Apoptosis Porcentaje células apoptóticas de las células S4MH y F21 tratadas con acivicina (1 μM)+BSO (100 μM)

V. 1. 6. 2. 5. Estudio del efecto de la combinación BSO+ATRA sobre la apoptosis en las células S4MH y F21.

En las células S4MH, el tratamiento con BSO (100 μ M)+ATRA (10^{-8} M) aumentó el porcentaje de células apoptóticas con respecto al control y al tratamiento con ATRA solo (aumento de 5 y 4.4 veces respectivamente) pero no produjo modificaciones con respecto al tratamiento de BSO solo.

En las células F21, el doble tratamiento BSO+ATRA también aumentó la apoptosis celular con respecto al control, y a los tratamientos con BSO y ATRA solos (1.4, 1.6 y 1.4 veces respectivamente) [Figura 54].

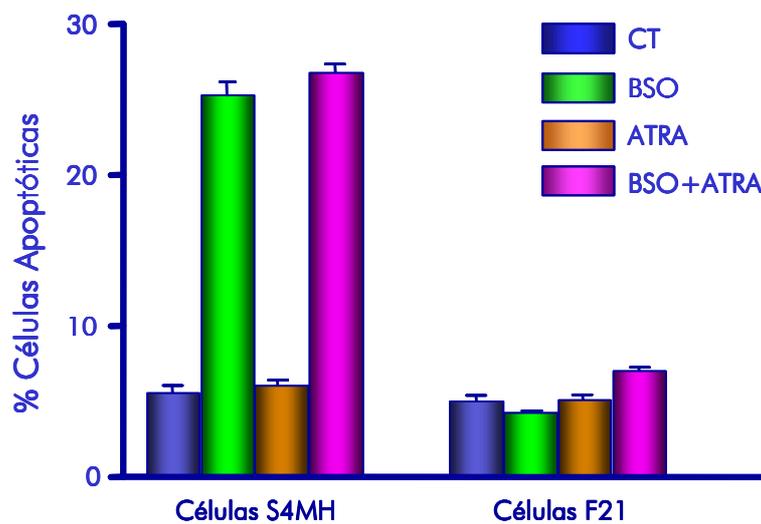


Figura 54. Apoptosis de las células S4MH y F21 tratadas con BSO (100 μ M)+ATRA (10^{-8} M)

V. 1. 6. 3. Estudio del efecto producido por la AC sola y en combinación con ATRA Y BSO, sobre la apoptosis en las células S4MH y F21.

V. 1. 6. 3. 1. Estudio del efecto de la AC sobre la apoptosis en las células S4MH y F21.

El tratamiento con AC ($0.002 \mu\text{M}$) no modificó significativamente el porcentaje de células apoptóticas tanto en las células S4MH como en las F21, siendo de 7.3% y 6%, respectivamente [Figura 55].

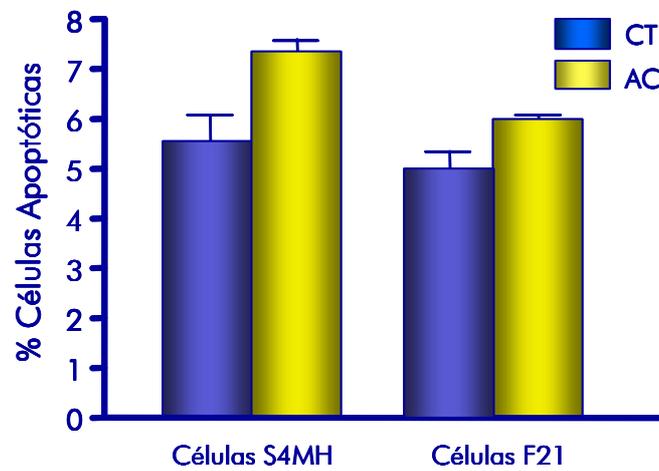


Figura 55. Apoptosis de las células S4MH y F21 tratadas con AC ($0.002 \mu\text{M}$).

V. 1. 6. 3. 2. Estudio del efecto combinado AC+BSO sobre la apoptosis en las células S4MH y F21.

El tratamiento combinado AC (0.002 μM)+BSO (100 μM) incrementó la apoptosis en las células S4MH con respecto al control y a la AC sola (incremento de 6 y 4.3 veces, respectivamente) ($P < 0.01$).

Así mismo, en las células F21, la adición de BSO al tratamiento con AC incrementó el porcentaje de células apoptóticas con respecto al control y al tratamiento con AC sola (1.4 y 1.2 veces, respectivamente, $P < 0.05$) [Figura 56].

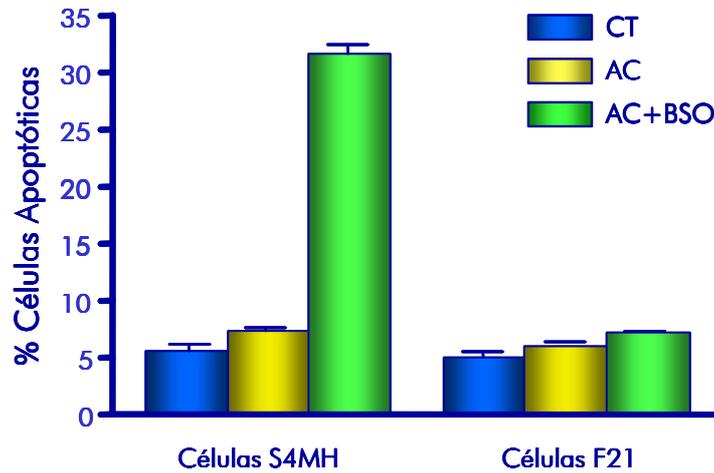


Figura 56. Apoptosis de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)+BSO (100 μM).

V. 1. 6. 3. 3. Estudio del efecto combinado AC+ATRA sobre la apoptosis en las células S4MH y F21.

En las células S4MH, el tratamiento combinado de AC (0.002 μM) + ATRA (10^{-6} M) aumentó la apoptosis celular respecto al control y con respecto al tratamiento con AC sola, siendo dicho incremento de 1.9 y 1.5 veces, respectivamente.

En el caso de las células F21, el tratamiento AC+ATRA, produjo un incremento de 1.9 y 1.6 veces en el porcentaje de células apoptóticas con respecto al control y a la AC sola, respectivamente [Figura 57].

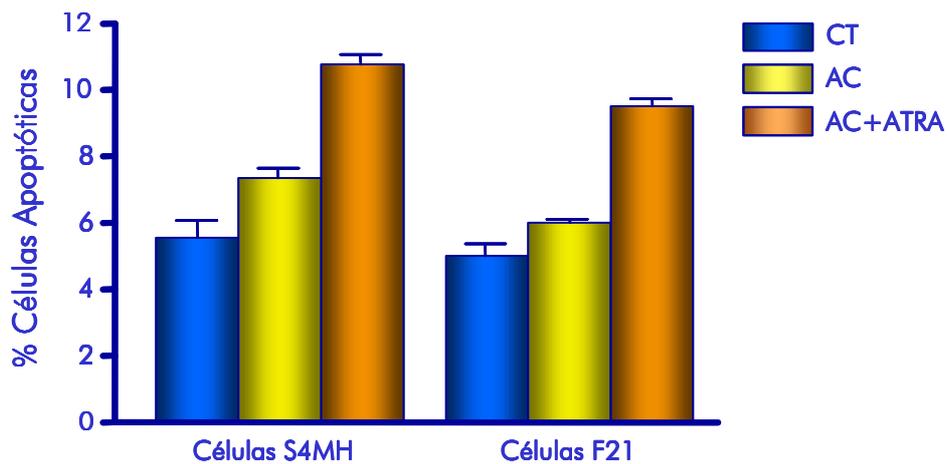


Figura 57. Apoptosis de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM) + ATRA (10^{-8} M).

V. 1. 6. 3. 4. Estudio del efecto combinado AC+BSO+ATRA sobre la apoptosis en las células S4MH y F21.

La triple combinación produjo en las células S4MH, un aumento significativo del número de células apoptóticas con respecto tanto al control (9 veces) como a la AC sola (7 veces) y a las dobles combinaciones de fármacos AC+BSO y AC+ATRA (1.6 y 4.8 veces respectivamente)

Así mismo, dicho tratamiento también produjo el mismo efecto en las células F21, pero de menor intensidad. Se produjo un aumento en el porcentaje de células apoptóticas de 2.5 veces con respecto al control, 2 veces con respecto a la AC sola y 1.7 y 1.3 veces con respecto a las dobles combinaciones AC+BSO y AC+ATRA, respectivamente [Figura 58].

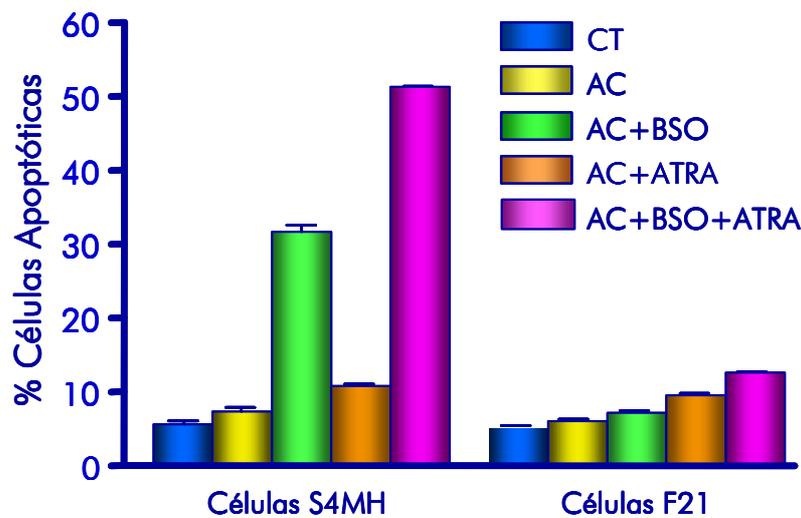


Figura 58. Porcentaje células apoptóticas de las células S4MH y F21 tratadas con AC (0.002 μM)+BSO (100 μM)+ATRA (10^{-8} M)

V. 2. RESULTADOS *IN VIVO*

V. 2. 1. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD TUMORIGÉNICA DE LAS CÉLULAS S4MH Y F21

Para conocer la diferente capacidad tumorigénica de las líneas S4MH y F21, se determinó la evolución del peso de los tumores inducidos en las ratas mediante la inyección subcutánea de ambos tipos celulares. Todas las ratas desarrollaron tumores en el lugar de la inoculación. Como muestra la figura 59, en el día 26 postinoculación el peso de los tumores inducidos por las células S4MH es 6 veces superior al producido por las células F21 (4.5 ± 0.9 g y 0.7 ± 0.1 g, respectivamente).

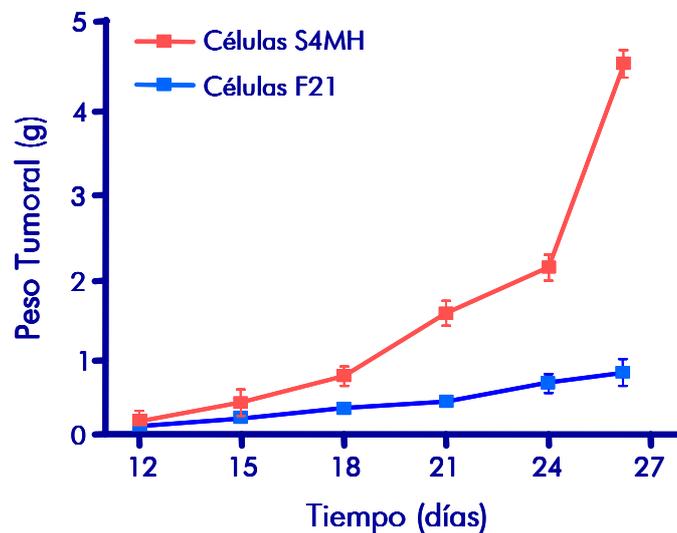


Figura 59. Evolución del peso de los tumores inducidos por las células S4MH y F21.

Para observar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la capacidad tumorigénica de las células S4MH y F21, se realizaron las siguientes experiencias:

1.- Estudio de la capacidad tumorigénica de las células previamente tratadas *in vitro* con BSO y ATRA.

2.- Estudio del efecto del tratamiento *in vivo* con BSO y ATRA, administrados de forma aislada y en combinación con ciclofosfamida (CY), sobre el desarrollo del tumor y las metástasis de las células S4MH y F21.

V. 2. 2. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS *IN VITRO* A LAS CÉLULAS S4MH Y F21 SOBRE SU CAPACIDAD TUMORIGÉNICA

V. 2. 2. 1. Capacidad tumorigénica de las células S4MH y F21 tratadas *in vitro* con BSO.

Las células fueron tratadas *in vitro* con 100 y 500 μM de BSO durante 6 horas e inoculadas en los animales transcurridas 18 horas desde la retirada del fármaco, determinándose secuencialmente el peso tumoral inducido hasta el día 26 postinoculación.

El tratamiento con BSO redujo la capacidad tumorigénica de las células S4MH [Ratio Tratamiento/Control (T/C) 57%; $p < 0.05$], con independencia de la concentración del fármaco utilizada (100 y 500 μM).

En el caso de las células F21, el tratamiento con 100 μM de BSO produjo un aumento del 200% de la capacidad tumorigénica con respecto a la del grupo control. De este modo, mientras el peso tumoral medio del grupo control fue de 0.75 ± 0.1 g, el del grupo tratado alcanzó un peso medio de 1.44 ± 0.3 g. Sin embargo, el tratamiento con 500 μM de BSO disminuyó el potencial tumorigénico de las células F21 en la misma medida que en las células S4MH (T/C del 57%) [Figura 60].

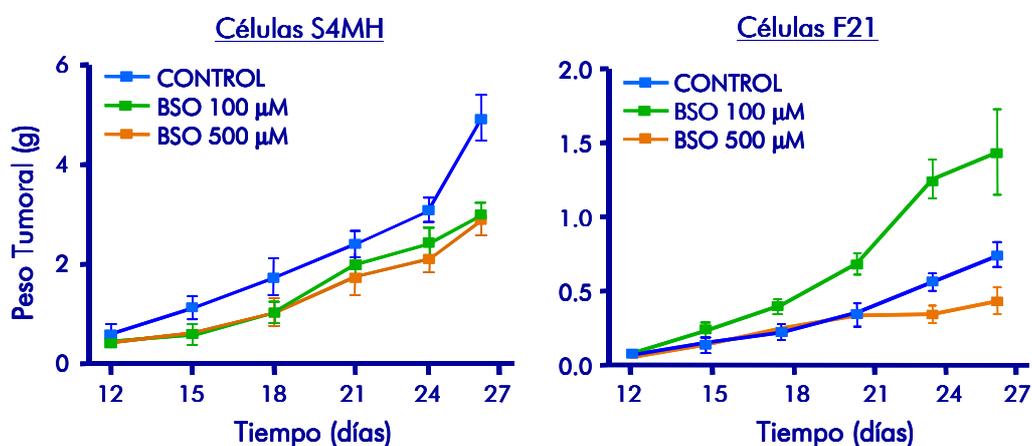


Figura 60. Capacidad tumorigénica de las células S4MH y F21 tratadas con BSO (100 y 500 μM).

V. 2. 2. 2. Capacidad tumorigénica de las células S4MH Y F21 tratadas *in vitro* con ATRA.

Las células S4MH y F21 fueron inoculadas en los animales tras 72 h de tratamiento con 10^{-8} y 10^{-6} M de ATRA; se valoró la modificación de la capacidad tumorigénica inducida por dicho tratamiento hasta el día 26 postinoculación.

Ninguna de las concentraciones de ATRA utilizadas modificó la capacidad tumorigénica de las células S4MH con respecto al control.

Por el contrario, en las células F21, el tratamiento previo con 10^{-8} M de ATRA aumentó un 260% su capacidad tumorigénica. Así, mientras el peso tumoral medio del grupo control fue de 0.6 ± 0.1 g el día 26 postinoculación, en el grupo tratado el peso medio fue de 1.5 ± 0.5 g. Sin embargo, el tratamiento previo de las células con 10^{-6} M de ATRA no modificó la capacidad tumorigénica de las células F21 [Figura 61].

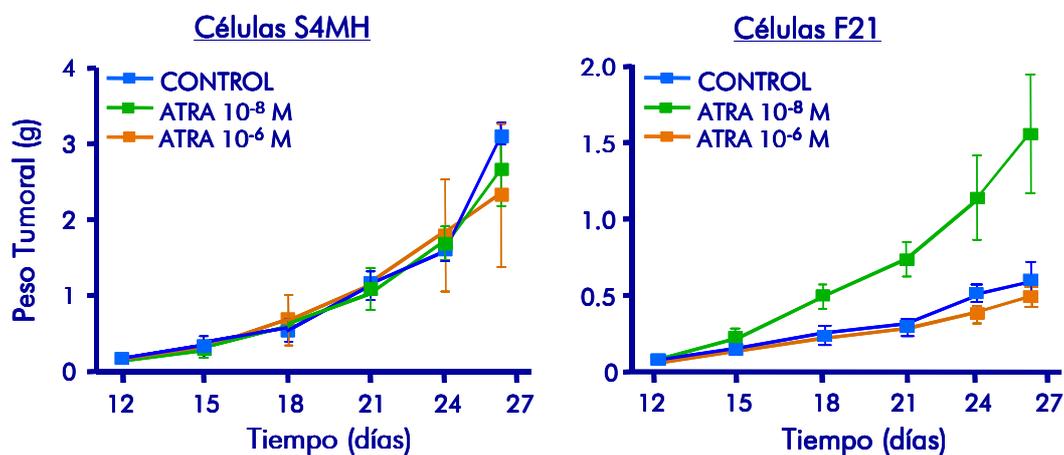


Figura 61. Capacidad tumorigénica de las células S4MH y F21 control y tratadas con ATRA (10^{-8} y 10^{-6} M).

V. 2. 3. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS *IN VIVO* CON CY, BSO Y ATRA SOBRE LA ENFERMEDAD TUMORAL DE LAS CÉLULAS S4MH Y F21.

V. 2. 3. 1. Efecto del tratamiento con ciclofosfamida (CY) sobre el desarrollo del tumor y las metástasis ganglionares de las células S4MH Y F21. Valoración de la toxicidad.

La CY fue administrada de forma i.p. los días 4^o y 9^o del ciclo de tratamiento (días 15 y 20 de evolución tumoral) (ver anexo II).

V. 2. 3. 1. 1. Efecto de la CY sobre la evolución tumoral y metastática de las células S4MH y F21.

El tratamiento *in vivo* con CY produjo una disminución dosis-dependiente del tamaño tumoral en ambas líneas celulares. Sin embargo, esta disminución fue más acusada en el caso de las células S4MH (T/C 31% y 18% con las concentraciones de 50 y 75 mg/kg respectivamente) que en las células F21 (T/C 69% y 54%, respectivamente). De hecho, mientras el factor de retardo del crecimiento (FRC) de las células S4MH tratadas con 50 y 75 mg/kg de CY fue de 2.2 y 4.4, respectivamente, en el caso de las células F21 fue tan solo de 0.45 y 0.86 respectivamente.

El tratamiento con CY, independientemente de la dosis empleada, también redujo el desarrollo metastático, expresado mediante las modificaciones del peso ganglionar total (PGT). Esta disminución, evidenciada por la reducción del PGT, fue más importante en las células S4MH (85% con respecto al control con la concentración de 50 mg/kg) que en las células F21 (33%) [Tabla 3].

Tabla 3. Desarrollo tumoral y metastático de las células S4MH y F21 tras el tratamiento con CY (50 y 75 mg/kg).

Tratamiento	Células S4MH				Células F21			
	Capacidad Tumorigénica		Capacidad Metastática		Capacidad Tumorigénica		Capacidad Metastática	
	VRT ^a	T/C(%) ^b	FRC ^c	PGT ^d	VRT	T/C (%)	FRC	PGT
CT	27.41	---	---	3.87 ± 0.69	6.2	---	---	0.015 ± 0.0002
CY 50 mg/kg	8.67*	31	2.17	0.57 ± 0.05*	4.28*	69	0.45	0.01 ± 0.002*
CY 75 mg/kg	5.05*	18	4.44	0.42 ± 0.06*	3.33*	54	0.86	0.009 ± 0.002*

^a Volumen relativo de tumor, ^b Tratado/Control, ^c Factor de Retardo del Crecimiento, ^d Peso Ganglionar Total
* p<0.05 respecto al grupo control

V. 2. 3. 1. 2. Evaluación de la toxicidad asociada a los tratamientos

Para determinar la dosis de CY que produce una toxicidad tolerable en los animales, se utilizaron 2 dosis (50 y 75 mg/kg).

V. 2. 3. 1. 2. 1. Estudio de parámetros hematológicos

La administración de ambas dosis de CY utilizadas produjo una disminución significativa de todos los valores hematológicos analizados. Esta disminución fue mucho más acusada en el caso de los leucocitos (reducción de 1.9 y 4.5 veces con las dosis de 50 y 75 mg/kg, respectivamente) que en los valores de la serie roja [Tabla 4].

Tabla 4. Parámetros sanguíneos de los animales tratados con CY

Tratamiento	PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS			
	Leucocitos (x10 ³ /ml)	Hematíes (x10 ⁶ /ml)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)
Control	13.71 ± 0.36	7.61 ± 0.19	14.9 ± 0.4	43.93 ± 0.51
CY 50 mg/kg	7.26* ± 1.74	6.79* ± 0.06	13.68* ± 0.01	39.26* ± 0.9
CY 75 mg/kg	3.03* ± 0.3	6.29* ± 0.42	12.27* ± 0.65	35.56* ± 2.45

* p<0.05 respecto al grupo control

V. 2. 3. 1. 2. 2. Modificación del Peso del Animal (MPA)

El tratamiento con ambas dosis de CY produjo una disminución del peso de los animales con respecto al control ($p < 0.005$). El efecto de la administración de 50 mg/kg de CY se observó a partir del día 18 de evolución (pérdida máxima de 5%), mientras que con la dosis de 75 mg/kg dicha pérdida de peso se evidenció desde el inicio del tratamiento (día 15 de evolución tumoral), con una pérdida máxima del 6% [Figura 62].

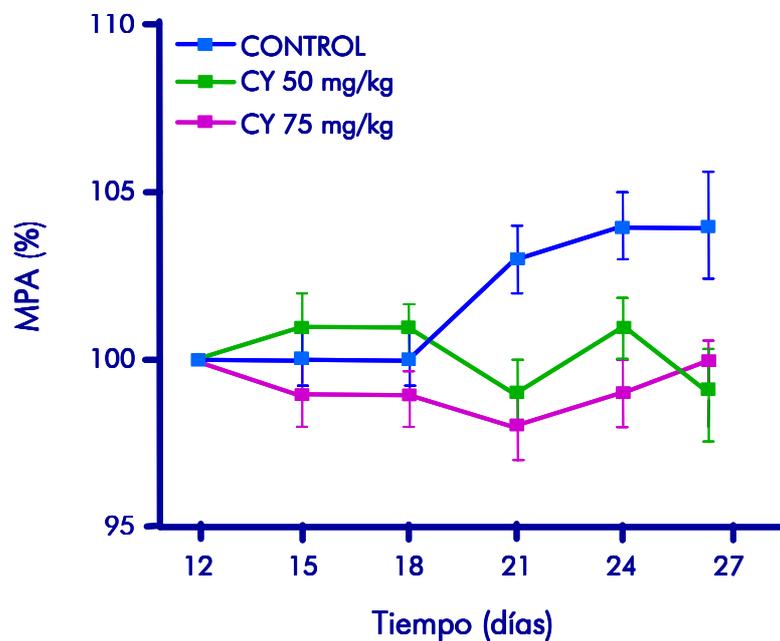


Figura 62. Modificación del Peso Animal (MPA) de los animales tratados con 50 y 75 mg/kg de CY.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en relación al desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares, así como de la valoración de la toxicidad con las dosis de CY utilizadas, se decidió utilizar la dosis de 50 mg/kg de CY para su combinación terapéutica con los otros fármacos.

V. 2. 3. 2. Efecto del tratamiento con BSO: influencia sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21. Valoración de la toxicidad.

El tratamiento con BSO (50 o 100 mg/kg) se administró por vía i.p., de forma continua durante 15 días, desde el día 12 al 26 postinoculación tumoral.

V. 2. 3. 2. 1. Efecto del BSO sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis inducidos por las células S4MH y F21.

En cuanto al desarrollo tumoral, el BSO disminuyó de forma dosis dependiente la tumorigénesis en las células S4MH (T/C 44% y 37% con la dosis de 50 y 100 mg/kg, respectivamente), siendo el FRC de 1.3 y 1.7 con las concentraciones de 50 y 100 mg/kg, respectivamente. Sin embargo, en las células F21, mientras con la dosis superior de 100 mg/kg no se observaron diferencias significativas con respecto al control (T/C 101%), la dosis inferior de 50 mg/kg produjo un aumento del tamaño tumoral (T/C 207%) con respecto al control.

En relación a la capacidad metastática, el tratamiento con BSO produjo el mismo efecto. Así, en el caso de las células S4MH se observó una disminución dosis-dependiente de la afectación ganglionar (26 y 48% con las concentraciones de 50 y 100 mg/kg, respectivamente). En cambio, en las células F21, la dosis superior no produjo variaciones con respecto al control, mientras que la dosis inferior de BSO la aumentó un 53% [Tabla 5].

Tabla 5. Desarrollo tumoral y afectación ganglionar de las células S4MH y F21 tratadas con BSO (50 y 100 mg/kg).

Tratamiento	Células S4MH				Células F21			
	Capacidad Tumorigénica		Capacidad Metastática		Capacidad Tumorigénica		Capacidad Metastática	
	VRT ^a	T/C(%) ^b	FRC ^c	PGT ^d	VRT	T/C (%)	FRC	PGT
CT	27.41	---	---	3.87 ± 0.69	6.2	---	---	0.015 ± 0.0002
BSO 50 mg/kg	11.94*	44	1.3	2.85 ± 0.005*	12.87*	207	---	0.023 ± 0.003*
BSO 100 mg/kg	10.15*	37	1.7	2.01 ± 0.18*	6.28	101	---	0.015 ± 0.005

a Volumen relativo de tumor, **b** Tratado/Control, **c** Factor de Retardo del Crecimiento, **d** Peso Ganglionar Total
* p<0.05 respecto al grupo control

V. 2. 3. 2. 2. Estudio de la toxicidad asociada a los tratamientos

V. 2. 3. 2. 2. 1. Valoración de parámetros hematológicos

El tratamiento con BSO (50 mg/kg y 100 mg/kg) no produjo modificaciones significativas con respecto al control en ninguno de los parámetros hematológicos analizados [Tabla 6].

Tabla 6. Parámetros sanguíneos de los animales tratados con BSO

Tratamiento	PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS			
	Leucocitos (x10 ³ /ml)	Hematíes (x10 ⁶ /ml)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)
Control	13.71 ± 0.36	7.61 ± 0.19	14.9 ± 0.4	43.93 ± 0.51
BSO 50 mg/kg	14.23 ± 1.4	7.34 ± 0.63	14.25 ± 0.62	42.43 ± 2.74
BSO 100 mg/kg	12.67 ± 1.51	7.69 ± 0.21	14.35 ± 0.49	43.25 ± 1.5

V. 2. 3. 2. 2. Modificación del Peso del Animal (MPA)

El tratamiento con BSO (50 y 100 mg/kg) no modificó de forma significativa el peso de los animales tratados en relación al grupo control [Figura 63].

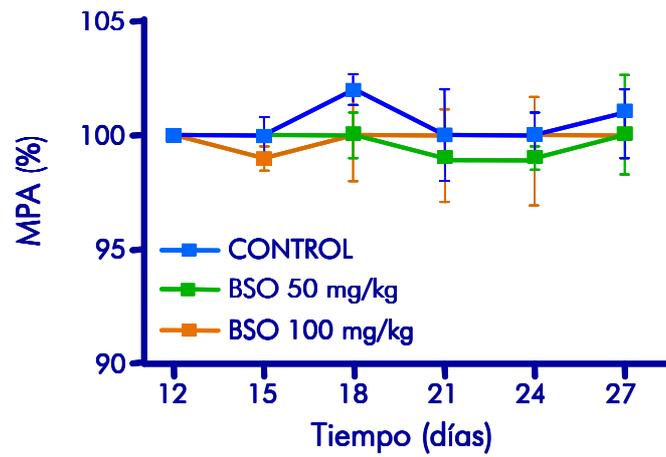


Figura 63. Modificación del Peso del Animal (MPA) tras el tratamiento con BSO (50 y 100 mg/kg).

V. 2. 3. 3. Efecto producido por el ATRA sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21. Valoración de la toxicidad.

Los animales fueron tratados con 5 mg/kg de ATRA de forma i. p. durante 15 días (días 12 al 26 postinoculación tumoral).

V. 2. 3. 3. 1. Efecto del ATRA sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21.

El tratamiento con ATRA produjo efectos contrarios sobre el desarrollo tumoral en las células S4MH y F21. Así, mientras se redujo a más de la mitad el tamaño tumoral (T/C 46%) en las células S4MH, con el consiguiente retardo en el crecimiento tumoral (FRC 1.2), en las células F21 el tratamiento duplicó el tamaño del tumor (T/C 200%).

De manera similar, el tratamiento con ATRA disminuyó la diseminación ganglionar un 80% con respecto al control. Por el contrario, en las células F21 dicho tratamiento indujo un incremento del 193% en la afectación ganglionar [Tabla 7].

Tabla 7. Capacidad tumorigénica y metastática de las células S4MH y F21 tratadas con ATRA (5 mg/kg).

Tratamiento	Células S4MH				Células F21			
	Capacidad Tumorigénica		Capacidad Metastática		Capacidad Tumorigénica		Capacidad Metastática	
	VRT ^a	T/C(%) ^b	FRC ^c	PGT ^d	VRT	T/C (%)	FRC	PGT
CT	27.41	---	---	3.87 ± 0.69	6.2	---	---	0.015 ± 0.0002
ATRA	12.63*	46	1.18	0.8 ± 0.11*	12.37*	200	---	0.029 ± 0.003*

^a Volumen relativo de tumor, ^b Tratado/Control, ^c Factor de Retardo del Crecimiento, ^d Peso Ganglionar Total

* p<0.05 respecto al grupo control

V. 2. 3. 3. 2. Estudio de la toxicidad asociada a los tratamientos

V. 2. 3. 3. 2. 1. Valoración de parámetros hematológicos

No se apreciaron diferencias significativas en los parámetros hematológicos analizados al comparar los valores obtenidos en los animales control con los tratados con ATRA [Tabla 8].

Tabla 8. Parámetros sanguíneos de los animales tratados con ATRA

PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS				
Tratamiento	Leucocitos ($\times 10^3/\text{ml}$)	Hematíes ($\times 10^6/\text{ml}$)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)
Control	13.71 ± 0.36	7.61 ± 0.19	14.9 ± 0.4	43.93 ± 0.51
ATRA	12.67 ± 1.51	7.69 ± 0.21	14.35 ± 0.49	43.25 ± 1.5

V. 2. 3. 3. 2. 2. Modificación del Peso del Animal (MPA)

La administración de ATRA no modificó significativamente el peso de los animales tratados con respecto a los valores obtenidos en el grupo control [Figura 64].

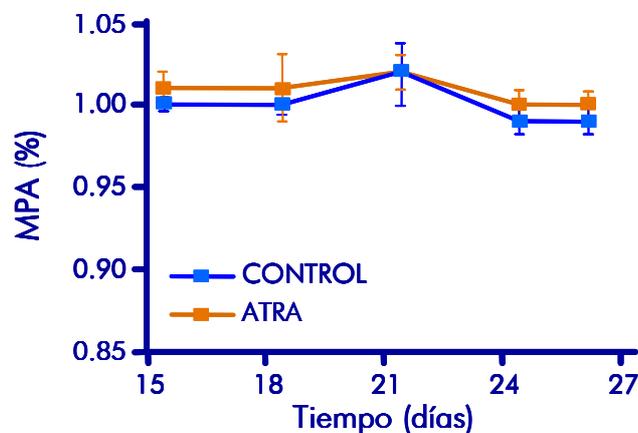


Figura 64. Modificación del Peso de los Animales (MPA) tratados con ATRA (5 mg/kg) y su comparación con los animales control.

V. 2. 3. 4. Efecto producido por el tratamiento combinado BSO+ATRA sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21. Valoración de la toxicidad.

Los animales recibieron un tratamiento diario continuo (desde el día 12 hasta el día 26 postinoculación tumoral) con BSO (50 mg/kg) y ATRA (5 mg/kg).

V. 2. 3. 4. 1. Efecto de la combinación de BSO+ATRA sobre el desarrollo tumoral y las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21.

El tratamiento combinado de BSO+ATRA produjo una disminución del crecimiento de los tumores en ambas líneas celulares. Esta reducción fue más acusada en las células S4MH que en las F21, siendo el índice T/C 37% y 79% y el FRC 1.7 y 0.3, respectivamente para cada una de las líneas celulares.

La combinación de ambos fármacos produjo una disminución del 45% de la afectación ganglionar de las células S4MH con respecto al control. En el caso de las células F21, este tratamiento combinado no produjo modificaciones en el PGT con respecto al control. De este modo se pudo observar que en las células F21 la combinación BSO+ATRA revirtió el efecto estimulador del desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares inducido por la administración aislada de ambos agentes [Tabla 9].

Tabla 9. Desarrollo tumoral y afectación ganglionar de las células S4MH y F21 tratadas con BSO (50 mg/kg)+ATRA (5 mg/kg).

Tratamiento	Células S4MH				Células F21			
	Capacidad Tumorigénica		Capacidad Metastática		Capacidad Tumorigénica		Capacidad Metastática	
	VRT ^a	T/C(%) ^b	FRC ^c	PGT ^d	VRT	T/C (%)	FRC	PGT
CT	27.41	---	---	3.87 ± 0.69	6.2	---	---	0.015 ± 0.0002
BSO	11.94*	44	1.3	2.85 ± 0.005*	12.87*	207	---	0.023 ± 0.003*
ATRA	12.63*	46	1.18	0.8 ± 0.11*	12.37*	200	---	0.29 ± 0.003*
BSO + ATRA	10.15*†	37	1.7	2.13 ± 0.57*	4.92†	79	0.26	0.016 ± 0.004†

a Volumen relativo de tumor, b Tratado/Control, c Factor de Retardo del Crecimiento, d Peso Ganglionar Total

* p<0.05 respecto al grupo control

† p<0.05 con respecto a los tratamientos con BSO o ATRA solos

V. 2. 3. 4. 2. Estudio de la toxicidad asociada a los tratamientos

V. 2. 3. 4. 2. 1. Valoración de parámetros hematológicos

Como se puede observar en la tabla 8, el tratamiento con BSO+ATRA no produjo modificaciones significativas en ninguno de los valores hematológicos analizados [Tabla 10].

Tabla 10. Parámetros sanguíneos de los animales tratados con BSO+ATRA

Tratamiento	PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS			
	Leucocitos (x10 ³ /ml)	Hematíes (x10 ⁶ /ml)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)
Control	13.71 ± 0.36	7.61 ± 0.19	14.9 ± 0.4	43.93 ± 0.51
BSO	14.23 ± 1.4	7.34 ± 0.63	14.25 ± 0.62	42.43 ± 2.74
ATRA	12.67 ± 1.51	7.69 ± 0.21	14.35 ± 0.49	43.25 ± 1.5
BSO + ATRA	13.65 ± 2.49	7.32 ± 0.42	13.5 ± 0.8	41.2 ± 2.45

V. 2. 3. 4. 2. 2. Modificación del Peso del Animal (MPA)

El tratamiento combinado BSO+ATRA no modificó significativamente el peso de los animales tratados con respecto a los del grupo control [Figura 65].

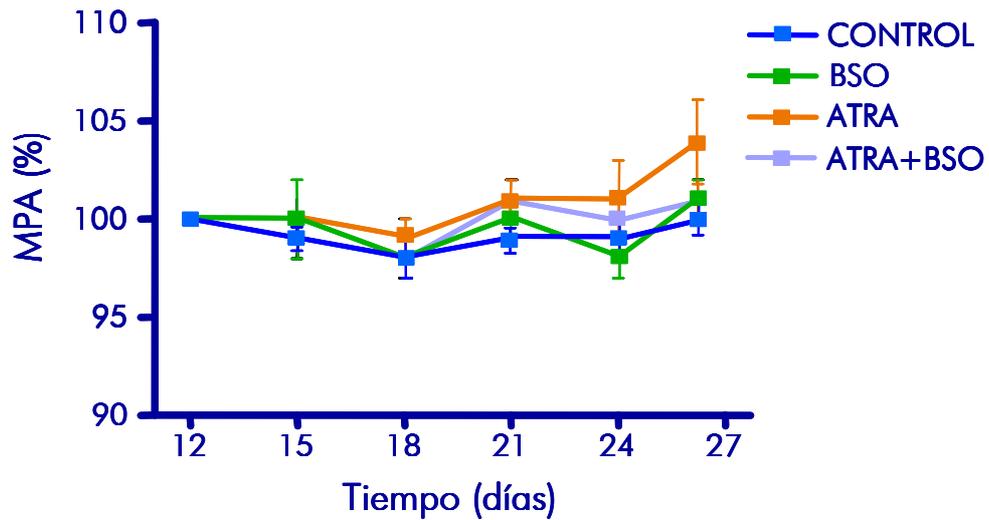


Figura 65. Variación del MPA de los animales tratados con BSO (50 mg/kg)+ATRA (5 mg/kg).

V. 2. 3. 5. Efecto producido por la combinación de CY+BSO sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21. Valoración de la toxicidad.

Para realizar el tratamiento combinado, la CY (50 mg/kg) se administró i.p. los días 4º y 9º del ciclo de tratamiento (días 15 y 20 de evolución tumoral) y el BSO (50 mg/kg) se administró i.p. de forma continua durante 15 días a partir del día 12 de evolución tumoral. En los días en los que llevó a cabo la administración de los dos fármacos, se administró en primer lugar la CY y una hora después el BSO (50 mg/kg).

V. 2. 3. 5. 1. Efecto de la combinación de CY+BSO sobre el desarrollo tumoral y la afectación ganglionar de las células S4MH y F21.

El tratamiento combinado de CY+BSO inhibió el desarrollo tumoral tanto en la línea S4MH (T/C 25%) como en la F21 (T/C 34%) dando lugar a un FRC de 3.1 y 1.9, respectivamente. La adición de BSO al tratamiento con CY aumentó el efecto inhibitor del desarrollo tumoral respecto al tratamiento con CY sola (reducción del tamaño tumoral de 1.3 y 2 veces en las células S4MH y F21, respectivamente).

Asimismo, el tratamiento con CY+BSO disminuyó la capacidad metastática un 97% y 27% en las células S4MH y F21, respectivamente, en comparación con los controles [tabla 11].

Tabla 11. Desarrollo tumoral y afectación ganglionar de las células S4MH y F21 tratadas con CY (50 mg/kg)+BSO (50 mg/kg).

Tratamiento	Células S4MH				Células F21			
	Capacidad Tumorigénica		Capacidad Metastática		Capacidad Tumorigénica		Capacidad Metastática	
	VRT ^a	T/C(%) ^b	FRC ^c	PGT ^d	VRT	T/C (%)	FRC	PGT
CT	27.41	---	---	3.87 ± 0.69	6.2	---	---	0.015 ± 0.0002
CY	8.67*	31	2.17	0.58 ± 0.05*	4.28*	69	0.45	0.01 ± 0.002*
BSO	11.94*	44	1.30	0.85 ± 0.005*	12.87*	207	---	0.023 ± 0.003*
CY + BSO	6.62*†	25	3.15	0.13 ± 0.09*	2.13*†	34	1.91	0.011 ± 0.001*

a Volumen relativo de tumor, **b** Tratado/Control, **c** Factor de Retardo del Crecimiento, **d** Peso Ganglionar Total

* p<0.05 respecto al grupo control

† p<0.05 respecto al grupo tratado con CY sola

V. 2. 3. 5. 2. Estudio de la toxicidad asociada a los tratamientos

V. 2. 3. 5. 2. 1. Valoración de parámetros hematológicos

El tratamiento combinado de CY+BSO disminuyó de forma significativa todos los valores de los parámetros sanguíneos analizados respecto al control, siendo esta reducción más acusada en la serie blanca (reducción de 2.2 veces en el número de leucocitos; p<0.05). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos en los animales tratados con CY sola y los de los animales tratados con CY+BSO [Tabla 12].

Tabla 12. Valores de parámetros hematológicos de los animales tratados con CY+BSO.

PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS				
Tratamiento	Leucocitos (x10 ³ /ml)	Hematíes (x10 ⁶ /ml)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)
Control	13.71 ± 0.36	7.61 ± 0.19	14.9 ± 0.4	43.93 ± 0.51
CY	7.26 ± 1.74*	6.79 ± 0.06*	13.68 ± 0.01*	39.26 ± 0.9*
BSO	14.23 ± 1.4	7.34 ± 0.63	14.25 ± 0.62	42.43 ± 2.74
CY + BSO	6.11 ± 0.36*	6.67 ± 0.08*	13.13 ± 0.07*	38.27 ± 0.15*

* p<0.05 respecto al grupo control

V. 2. 3. 5. 2. 2. Modificación del Peso del Animal (MPA)

El tratamiento combinado CY+BSO ocasionó una disminución significativa del peso de los animales (reducción máxima de un 5% el día 21 postinoculación) con respecto al grupo control. Sin embargo, al igual que ocurre en los valores hematológicos, el tratamiento CY+BSO no modificó significativamente el peso de los animales con respecto a la CY sola [Figura 66].

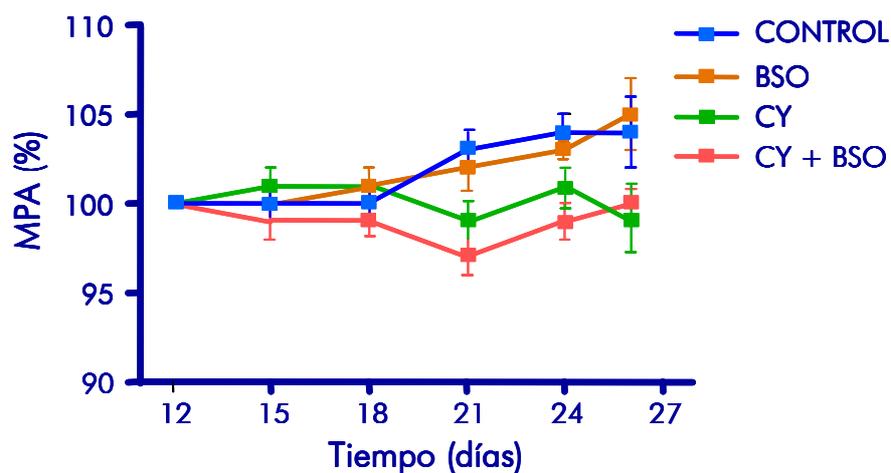


Figura 66. Variación del MPA de los animales tratados con CY (50 mg/kg)+BSO (50 mg/kg).

V. 2. 3. 6. Efecto producido por la combinación de CY+ATRA sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21. Valoración de la toxicidad.

Para llevar a cabo la combinación terapéutica, la CY (50 mg/kg) se administró i.p. los días 4º y 9º del ciclo de tratamiento (días 15 y 20 de evolución tumoral) y el ATRA (5 mg/kg) i.p. de forma continua partir del día 12 de evolución tumoral durante 15 días. Los días en los que se administraron los dos fármacos, se llevó a cabo en primer lugar la administración de la CY y una hora después, la del ATRA (5 mg/kg).

V. 2. 3. 6. 1. Efecto de la combinación de CY+ATRA sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21.

El tratamiento combinado CY+ATRA produjo una reducción del desarrollo tumoral tanto en las células S4MH como en las F21 (T/C 29% y 69%, respectivamente) en comparación al control. Este efecto fue mayor en las células S4MH (FRC 2.4) que en las células F21 (FRC 0.4). Sin embargo, en ambos casos la adición de ATRA no modificó significativamente el desarrollo de los tumores con respecto al tratamiento con CY sola.

La afectación ganglionar también se redujo en ambas líneas celulares cuando fueron tratadas con dicha combinación (reducción de 98% y 33% en las células S4MH y F21, respectivamente). Al comparar el efecto del tratamiento combinado con el de la CY sola, se observó que disminuyó 9 veces la capacidad metastática de las células S4MH ($p < 0.05$), no existiendo modificaciones en el caso de las células F21 [Tabla 13].

Tabla 13. Desarrollo tumoral y afectación ganglionar de las células S4MH y F21 tratadas con CY (50 mg/kg)+ATRA (5 mg/kg).

Tratamiento	Células S4MH				Células F21			
	Capacidad Tumorigénica		Capacidad Metastática		Capacidad Tumorigénica		Capacidad Metastática	
	VRT ^a	T/C(%) ^b	FRC ^c	PGT ^d	VRT	T/C (%)	FRC	PGT
CT	27.41	---	---	3.87 ± 0.69	6.2	---	---	0.015 ± 0.0002
CY	8.67*	31	2.17	0.576 ± 0.05*	4.28*	69	0.45	0.01 ± 0.002*
ATRA	12.63*	46	1.18	0.8 ± 0.11*	12.37*	200	---	0.29 ± 0.003*
CY + ATRA	8.03*	29	2.43	0.064 ± 0.009*	4.28*	69	0.45	0.01 ± 0.003*

^a Volumen relativo de tumor, ^b Tratado/Control, ^c Factor de Retardo del Crecimiento, ^d Peso Ganglionar Total
* p<0.05 respecto al grupo control

V. 2. 3. 6. 2. Estudio de la toxicidad asociada a los tratamientos

V. 2. 3. 6. 2. 1. Valoración de parámetros hematológicos

El tratamiento combinado CY+ATRA produjo una reducción significativa respecto al control, tanto en el número de leucocitos como en el resto de los valores de la serie roja estudiados, no existiendo diferencias significativas respecto al tratamiento con CY sola [Tabla 14].

Tabla 14. Valores de los parámetros sanguíneos de los animales tratados con CY+ATRA

Tratamiento	PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS			
	Leucocitos (x10 ³ /ml)	Hematíes (x10 ⁶ /ml)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)
Control	13.71 ± 0.36	7.61 ± 0.19	14.9 ± 0.4	43.93 ± 0.51
CY	7.26 ± 1.74*	6.79 ± 0.06*	13.68 ± 0.01*	39.26 ± 0.9*
ATRA	12.67 ± 1.51	7.69 ± 0.21	14.35 ± 0.49	43.25 ± 1.5
CY + ATRA	7.06 ± 0.46*	6.07 ± 0.37*	11.86 ± 0.85*	34.6 ± 2.08*

* p<0.05 respecto al grupo control

V. 2. 3. 6. 2. 2. Modificación del Peso del Animal (MPA)

El tratamiento CY+ATRA disminuyó significativamente el peso de los animales (reducción máxima de un 3% el día 26 postinoculación) con respecto al grupo control. Sin embargo, no existen diferencias significativas respecto al tratamiento con CY sola [Figura 67].

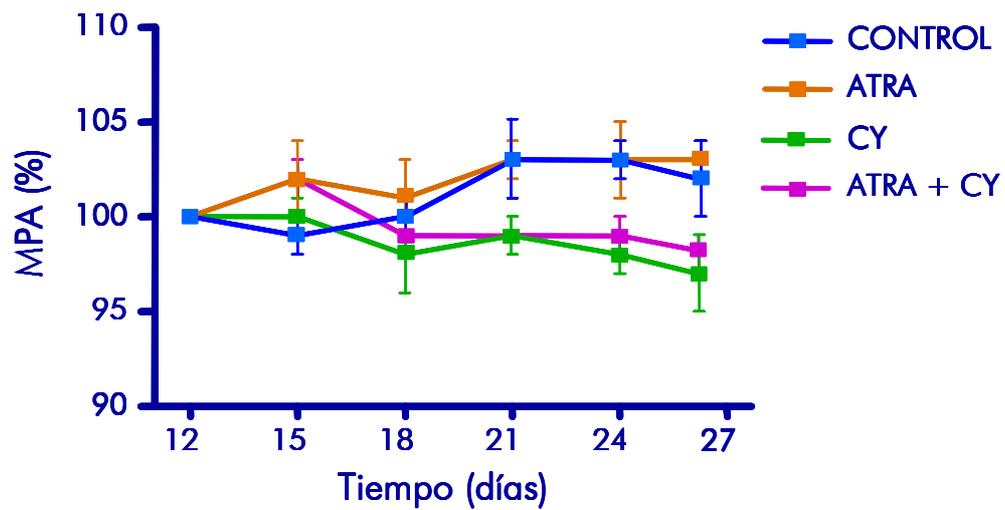


Figura 67. Variaciones del MPA de los animales tratados con CY (50 mg/kg)+ATRA (5 mg/kg).

V. 2. 3. 7. Efecto producido por la combinación de CY+BSO+ATRA sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21. Valoración de la toxicidad.

La triple combinación de BSO (50 mg/kg)+ATRA (5mg/kg)+CY (50 mg/kg) se administró i.p. durante 15 días de la siguiente manera: BSO y ATRA se administraron de forma diaria y continua durante 15 días, a partir del día 12 de evolución tumoral y la CY se administró sólo los días 4º y 9º del ciclo de tratamiento (días 15 y 20 de evolución tumoral).

En los días en los que coincidía la administración BSO+ATRA, se administró en primer lugar el BSO y transcurridas 8 horas se realizó la administración de ATRA. Cuando se realizó la triple combinación (CY+BSO+ATRA), se administró en primer lugar la CY, transcurrida una hora se administró el BSO y pasadas 8 horas se administró el ATRA.

V. 2. 3. 7. 1. Efecto de la combinación de CY+BSO+ATRA sobre el desarrollo tumoral y de las metástasis ganglionares de las células S4MH y F21.

La triple combinación de CY+BSO+ATRA produjo la máxima disminución del desarrollo tumoral con respecto a los demás tratamientos ($p < 0.05$), tanto en las células S4MH como en las F21, siendo los T/C del 10% y 25%, respectivamente, en comparación al control. El FRC indica el mayor beneficio terapéutico obtenido, con valores de 8.6 y 3.0 para las células S4MH y F21, respectivamente.

Esta combinación terapéutica también produjo la mayor disminución en la afectación ganglionar respecto al resto de los tratamientos ($p < 0.05$) en el caso de las células S4MH. Se observó una disminución del PGT de 99.7% y 33% en las células S4MH y F21, respectivamente, en comparación al control [Tabla 15].

Tabla 15. Desarrollo tumoral y afectación ganglionar de las células S4MH y F21 tratadas con CY (50 mg/kg)+BSO (50 mg/kg)+ATRA (5 mg/kg).

Tratamiento	Células S4MH				Células F21			
	Capacidad Tumorigénica		Capacidad Metastática		Capacidad Tumorigénica		Capacidad Metastática	
	VRT ^a	T/C(%) ^b	FRC ^c	PGT ^d	VRT	T/C (%)	FRC	PGT
CT	27.41	---	---	3.87 ± 0.69	6.2	---	---	0.015 ± 0.0002
CY	8.67*	31	2.17	0.576 ± 0.05*	4.28*	69	0.45	0.01 ± 0.002*
CY + BSO	6.62*	25	3.15	0.126 ± 0.09*	2.13*	34	1.91	0.011 ± 0.001*
CY + ATRA	8.03*	29	2.43	0.064 ± 0.009*	4.28*	69	0.45	0.01 ± 0.003*
CY + BSO + ATRA	2.86*†	10	8.62	0.012 ± 0.005*†	1.55*†	25	3.0	0.01 ± 0.001*

^a Volumen relativo de tumor, ^b Tratado/Control, ^c Factor de Retardo del Crecimiento, ^d Peso Ganglionar Total

* p<0.05 respecto al grupo control

† p<0.05 respecto al grupo tratado con CY sola y a las combinaciones CY+BSO y CY+ATRA

V. 2. 3. 7. 2. Estudio de la toxicidad asociada a los tratamientos

V. 2. 3. 7. 2. 1. Valoración de parámetros hematológicos

El triple tratamiento de CY+BSO+ATRA produjo una disminución generalizada de los valores en los parámetros hematológicos analizados con respecto al grupo control. Así, se produjo una reducción de 2.2 veces en el número de leucocitos, y variaciones en el recuento de hematíes, valor de la hemoglobina y del hematocrito (1.5, 1.5 y 1.6 veces menor, respectivamente), con relación al control. Sin embargo, este tratamiento no modificó los parámetros hematológicos ni con respecto al tratamiento con CY sola ni con respecto a los dobles tratamientos CY+BSO y CY+ATRA [Tabla 16].

Tabla 16. Valores de los parámetros sanguíneos de los animales tratados con CY+BSO+ATRA .

Tratamiento	PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS			
	Leucocitos (x10 ³ /ml)	Hematíes (x10 ⁶ /ml)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)
Control	13.71 ± 0.36	7.61 ± 0.19	14.9 ± 0.4	43.93 ± 0.51
CY	7.26 ± 1.74*	6.79 ± 0.06*	13.68 ± 0.01*	39.26 ± 0.9*
CY + BSO	6.11 ± 0.36*	6.67 ± 0.08*	13.13 ± 0.07*	38.27 ± 0.15*
CY + ATRA	7.06 ± 0.46*	6.07 ± 0.37*	11.86 ± 0.85*	34.6 ± 2.08*
CY + BSO + ATRA	6.07 ± 0.32*	4.91 ± 0.83*	9.75 ± 1.55*	28.1 ± 3.7*

* p<0.05 respecto al grupo control

V. 2. 3. 7. 2. 2. Modificación del Peso del Animal (MPA)

La triple combinación terapéutica produjo una disminución significativa del peso de los animales con respecto al grupo control. La pérdida máxima de peso fue de 7%, no existiendo diferencias respecto al tratamiento con CY sola [Figura 68].

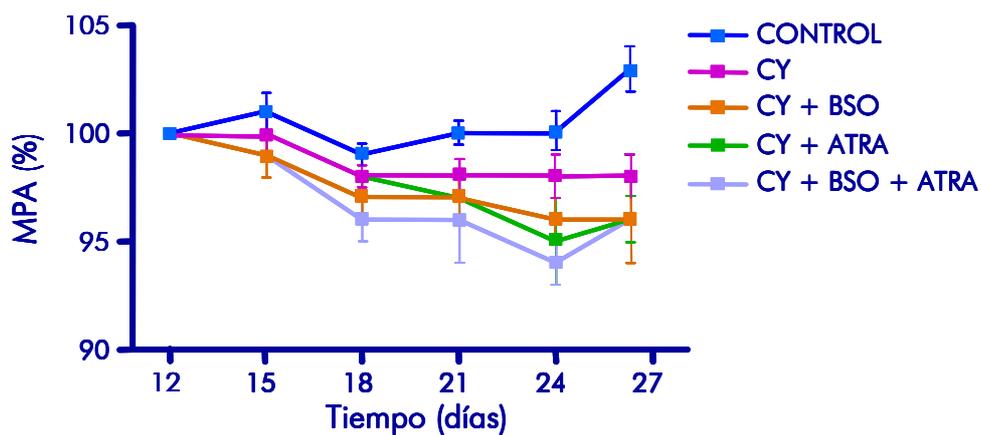


Figura 68. Variaciones del MPA de los animales tratados con CY (50 mg/kg)+BSO (50 mg/kg)+ATRA (5 mg/kg).

VI. DISCUSIÓN

Como se ha expuesto en la introducción, el RMS metastático es un tipo de cáncer muy agresivo y de difícil tratamiento. Aunque las terapias utilizadas han mejorado la eficacia en estos últimos años, gracias a los grupos de investigación cooperativa de los diferentes países, la probabilidad de supervivencia a los 5 años no supera el 25%. Por otro lado, en los otros grupos menos agresivos y con mejor pronóstico, puesto que el RMS afecta sobre todo a niños de corta edad, sería interesante la búsqueda de terapias complementarias que permitan disminuir las dosis tanto de quimio como de radioterapia, y así evitar las grandes secuelas que estos tratamientos producen a lo largo de su vida y, en el caso de la aplicación de técnicas quirúrgicas masivas, evitar la amputación de miembros.

Para poder mejorar estas expectativas, en los últimos años se están desarrollando trabajos que estudian terapias adyuvantes a la quimio y radioterapia que buscan nuevas dianas para el tratamiento de los sarcomas. Así, en la actualidad, se están estudiando diferentes estrategias como: la utilidad de la aplicación de trasplantes autólogos de células hematopoyéticas a pacientes sometidos a terapias de altas dosis (Ek ET, 2006; Hale GA, 2005); la posibilidad terapéutica del inhibidor del receptor del factor de crecimiento tipo insulínico (Scotlandi K, 2005); búsqueda de nuevos genes dianas sobreexpresados en el RMS (Bortoluzzi S, 2005) y la recuperación de la función del gen supresor de tumores p53, el cual está defectuoso en un porcentaje alto de sarcomas (Ganjavi H, 2005).

En nuestro caso, con el objetivo de profundizar en la búsqueda de nuevas terapias, hemos estudiado los efectos que produce la utilización de moduladores biológicos implicados en la regulación del comportamiento tumoral (como es la aplicación de retinoides y moduladores de GSH) en combinación con la quimioterapia clásica, en el tratamiento del RMS metastático. Para ello, hemos utilizado dos líneas celulares de RMS de rata procedentes de un mismo tumor inducido químicamente. Estas células tumorales tienen distinto grado de diferenciación y una capacidad proliferativa y metastática diferente. Mientras que la línea celular S4MH tiene un bajo grado de diferenciación, alta capacidad proliferativa y metastática, la línea celular F21, por el contrario, tiene un grado de

diferenciación moderado, una capacidad proliferativa dos veces inferior a la de las células S4MH y una capacidad metastática muy baja. Dichas diferencias entre ambas líneas celulares pueden ser objetivadas a través de la diferente expresión de miogenina, claramente evidenciable en el caso del tipo celular más diferenciado F21 y apenas inexistente en el caso de las células S4MH.

Otra diferencia importante entre ambas líneas celulares en su metabolismo de GSH. Así, si bien al inicio del cultivo ambos tipos celulares tienen niveles similares de GSH, a medida que transcurre el tiempo de cultivo, los niveles de GSH de la línea celular más proliferativa y menos diferenciada, disminuyen más rápidamente que los de la línea celular más diferenciada.

Los estudios que hemos llevado a cabo con este agente modulador para el tratamiento de las dos líneas de RMS metastático, muestran resultados diferentes dependiendo del tipo celular. El tratamiento *in vitro* con BSO produce en las células S4MH una disminución dosis-dependiente de los niveles de GSH, lo que dio lugar a una inhibición significativa de la proliferación celular, en consonancia con el efecto quimiosensibilizante del BSO descrito en la bibliografía (O'Dwyer PJ, 1996; Knoll N, 2005; Byun SS, 2006). Sin embargo, este mismo tratamiento aplicado a las células F21, produjo un efecto protumoral cuando se utilizó una concentración más moderada de BSO. Es decir, la concentración de 100 μM de BSO no produjo modificaciones en cuanto a los niveles de GSH en las primeras horas, pero se observó un incremento de estos niveles a las 72 horas de cultivo. Este efecto indujo la proliferación celular, observándose también un incremento de la tasa proliferativa a las 72 horas de cultivo. Cuando se utilizó la concentración superior de 500 μM , el comportamiento de las células F21 fue similar al de las células S4MH, si bien las células F21 tienen una capacidad de recuperación tanto de los niveles de GSH como de la proliferación superior a la de las células S4MH.

El tratamiento con BSO permitió también observar diferentes efectos sobre la morfología celular. Nuestro grupo había demostrado previamente, que el tratamiento inhibitorio de la síntesis del GSH debido al tratamiento con BSO, produce alteraciones en la disposición de la actina del citoesqueleto, lo que explica el fenotipo que adoptan las células S4MH tratadas con BSO (Calle Y, 2000). Sin embargo, la morfología de células F21 no se ve afectada por el BSO, manteniendo su característica forma de huso, típica de una célula miogénica diferenciada.

Estos diferentes efectos del BSO demostrados *in vitro*, se observaron también *in vivo*. Cuando se inocularon ambos tipos celulares pretratados con 100 μM de BSO, se duplicó la capacidad tumorigénica de las células F21 y, por el contrario, se observó una disminución de dicha capacidad en el caso de las células S4MH. El pretratamiento de las células con 500 μM de BSO tuvo similares efectos en ambos tipos de células. Asimismo, cuando el BSO fue administrado intraperitonealmente, se observó una disminución tanto de la capacidad tumorigénica como metastática

de las células S4MH, lo que se relaciona con la inhibición de la adhesión que produce la disminución de los niveles de GSH debido al tratamiento con BSO (Fiaschi T, 2006; Calle Y., 2000; Kletsas D, 1998). Por el contrario, se produjo un incremento significativo de estos dos parámetros en el caso de las células F21.

Estos hechos permiten observar que, en condiciones normales, aunque ambos tipos celulares parten de niveles similares de GSH y la línea S4MH más proliferativa es capaz de aumentar sus niveles de GSH con respecto a las células F21, éstas últimas son capaces de mantener e incluso aumentar sus niveles de GSH en respuesta a dosis moderadas de BSO, hecho que no ocurre en el caso de las células S4MH.

Estos resultados pueden ser explicados en base a las diferencias existentes en la actividad de la enzima GGT entre los dos tipos celulares. Esta enzima posee una gran relevancia en el suministro y recuperación de GSH en las células tumorales. Es capaz de reincorporar del medio extracelular metabolitos esenciales y limitantes para la síntesis de GSH intracelular, haciendo a las células más resistentes a las terapias antitumorales. De hecho, esta enzima, es considerada por varios autores como un marcador temprano de transformación neoplásica, y las células tumorales que lo expresan activamente se consideran poseedoras de un fenotipo resistente. La GGT se encuentra aumentada en varios tipos de tumores, entre los que se encuentran los RMS, lo que protege a las células tumorales en condiciones de estrés oxidativo (Pompella A, 2006). Hay referencias contradictorias en cuanto a la relación entre la capacidad de expresión de la enzima GGT y el grado de diferenciación celular (Hanigan MH, 1999; Groves RW, 1991). Nuestros resultados en cuanto a la diferente actividad observada entre las células S4MH y F21 se encuentra en consonancia con los estudios que relacionan directamente altos niveles de GGT con el grado de diferenciación (el Yaagoubi M, 1995; Prezioso JA, 1993; Durham JR, 1997).

El estudio de la actividad GGT de las células S4MH y F21, permitió observar que las células F21 tienen una actividad significativamente superior que las células S4MH. Además, la inhibición de la enzima γ -GCS producida por el BSO, incrementa la actividad GGT en las células F21 como respuesta al bloqueo de la vía principal de síntesis de GSH. De esta manera, las células F21 mediante la utilización de la enzima GGT, son capaces de realizar un "by-pass" de la vía catalizada por la enzima γ -GCS, mantener e incluso incrementar los niveles de GSH y la proliferación celular, ante la exposición a dosis moderadas de BSO. Hay estudios previos que también muestran un aumento de la actividad GGT tras el tratamiento con BSO (van Klaveren RJ, 1997). Sin embargo, la baja actividad de la GGT en las células S4MH, no les permite mantener los niveles de GSH cuando son tratadas con BSO, puesto que no pueden recuperar los metabolitos precursores del GSH del medio extracelular para su síntesis "de novo". El déficit de GSH y el estrés oxidativo producidos en las células S4MH tratadas con BSO, pueden ser las causas de la disminución, casi por completo, de la actividad de la enzima GGT y del aumento de la muerte celular por apoptosis observado en estas células. En este sentido, hay numerosos estudios que demuestran el papel que tiene la enzima GGT en el suministro de metabolitos extracelulares para la síntesis de GSH cuando las células se someten a un estrés oxidativo, así como en la prevención de la muerte celular por apoptosis (Graber R, 1995; del Bello B, 1999). De hecho, en nuestro caso, cuando las células F21 fueron tratadas con acivicina (inhibidor irreversible de la enzima GGT) previamente a la exposición al BSO, las células no fueron capaces de responder al tratamiento, es decir, no recuperaron los niveles de GSH, disminuyó sensiblemente su capacidad proliferativa, se indujo estrés oxidativo y, consecuentemente, aumentó la apoptosis celular.

Como se puede observar, las células F21, a pesar de poseer menor capacidad tumorigénica y metastática, gracias al perfil de expresión de la enzima GGT, son capaces de responder frente al tratamiento con BSO, aumentando su agresividad. Sin embargo, este mismo tratamiento es quimiosensibilizante en el caso de las células S4MH, pudiendo ser un candidato para su utilización como fármaco en el RMS metastático.

En base al diferente grado de diferenciación que presentan las células S4MH y F21, en este estudio nos planteamos conocer el efecto antitumoral que los retinoides pueden ejercer sobre el rhabdomyosarcoma y la influencia del grado de diferenciación en dicho efecto.

Los retinoides ejercen un efecto diferenciador sobre numerosos tipos de células tumorales. Inicialmente, los retinoides se han aplicado como terapia antitumoral en la leucemia promielocítica, con resultados sorprendentes en cuanto a remisión tumoral, en algunos casos completa. En la actualidad existen también ensayos clínicos de su aplicación para el tratamiento del cáncer de cervix (como radiosensibilizador), cáncer de próstata, mama, piel, pulmón, endometrio y neuroblastoma.

Estos derivados de la vitamina A se absorben en el tracto digestivo a nivel del intestino delgado, se acumulan en el hígado, se oxidan y se introducen por difusión pasiva en el medio intracelular en diferentes tejidos del organismo. Actúan principalmente a través de receptores nucleares dependientes de ligando (RAR, RXR), con los que se unen a secuencias específicas del ADN (RAREs), en regiones promotoras, modulando la expresión de gran cantidad de genes. Además, algunos autores sugieren la existencia de otros factores, además de la presencia de los receptores en las células, que determinan epigenéticamente la acción de los retinoides sobre su capacidad diferenciadora (Liu L, 2004, Fazi F, 2005). En nuestro caso, hemos estudiado la influencia del grado de diferenciación y del metabolismo del GSH en la respuesta a los retinoides.

En este estudio, hemos utilizado el derivado natural más activo de la vitamina A, el ácido transretinoico (ATRA), uno de los retinoides clásicos más utilizados en terapia, con resultados más contrastados y el que se está utilizando actualmente en los estudios experimentales para el tratamiento del RMS (Crouch GD, 1991).

En primer lugar, analizamos la capacidad diferenciadora del ATRA sobre las células S4MH y F21. Como se pudo observar a través del marcaje con miogenina, ambos tipos celulares son capaces de responder al tratamiento con ATRA, si bien el

efecto es más acusado en el caso del tipo celular menos diferenciado, S4MH, la cual además modificó significativamente su morfología, adoptando una forma fusiforme muy parecida a la variante más diferenciada y menos tumorigénica F21.

Los retinoides producen un efecto sobre el metabolismo oxidativo celular, induciendo la producción de metabolitos reactivos del oxígeno (MROs) (Castro OS, 1996). La presencia de estos metabolitos tiene diferentes efectos dependiendo de la dosis. Cuando los niveles de MROs son bajos pueden estimular la proliferación celular y proteger a la célula frente a los mecanismos apoptóticos. Sin embargo, cuando se producen niveles moderados o altos de MROs, se produce un daño celular (daño en el ADN, oxidación de proteínas, inactivación enzimática) que puede dar lugar a un incremento en la apoptosis en último término (Valko M, 2006; Hirai Y, 2006). Asimismo, los retinoides también tienen un efecto directo sobre los mecanismos que regulan la apoptosis celular, como se ha visto en la inducción de la caspasa 8 (proteína que forma parte de la cascada apoptótica) y el gen proapoptótico p53, y la disminución de la expresión del gen antiapoptótico Bcl-2 (Pasquali D, 1999). Este efecto revierte la alteración que muestran muchas células tumorales en cuanto a los mecanismos de regulación del proceso apoptótico.

En este estudio hemos observado efectos diferentes del ATRA dependiendo del grado de diferenciación celular y del metabolismo del GSH de las células S4MH y F21. En la línea celular poco diferenciada S4MH, el tratamiento con ATRA produjo un efecto antiproliferativo así como una disminución de los niveles de GSH intracelular. Así mismo, en las experiencias *in vivo*, dicho tratamiento redujo significativamente tanto la capacidad tumorigénica como metastática de las células S4MH. En el caso de las células más diferenciadas F21, este mismo efecto solo se pudo observar cuando se utilizó la dosis más alta de ATRA. A dosis moderadas, en estas células se produjo un incremento de la proliferación celular y de los niveles de GSH, lo que *in vivo* se tradujo en una mayor capacidad tumorigénica y metastática.

Algunos estudios refieren que podría existir una relación entre los retinoides y el metabolismo del GSH, de hecho se ha observado una disminución de los niveles

de GSH cuando las células son previamente tratadas con ATRA (Caliaro MJ, 1997). Es más, se ha demostrado que los niveles intracelulares de GSH modulan la respuesta celular a los retinoides y que la inducción de la disminución de dichos niveles producen una mayor sensibilización de las células a los retinoides (Miyatake JI, 1998). De hecho, hay estudios que sugieren que el sistema redox del GSH podría actuar de forma sinérgica con el ATRA para potenciar el efecto de otras drogas antiproliferativas. Además, algunos autores han demostrado que células preincubadas con compuestos tiólicos no responden ante los efectos antiproliferativos del ATRA. También se ha sugerido que el ATRA podría inhibir la enzima glutation-S-transferasa (GST) (Kulkarni AA, 1995), lo que potenciaría la acción de drogas citostáticas.

Estos datos plantean la existencia de un papel relevante del GSH y sus enzimas relacionados en los efectos producidos por el tratamiento con retinoides. De hecho, como se puede observar, los resultados obtenidos cuando las células han sido tratadas con ATRA, son muy similares a los observados cuando se ha utilizado el BSO (Castro B, 2002). Otros autores han relacionado los efectos producidos por ambos moduladores biológicos, por ejemplo, en la despigmentación de la piel (Kasraee B, 2003). En este estudio, estos efectos similares podrían ser debidos a una alteración en el estado redox de las células tumorales.

En el caso de las células poco diferenciadas, S4MH, la disminución de los niveles de GSH producida por el BSO es debida al bloqueo de la enzima γ -GCS. En el caso del ATRA, la disminución del GSH puede ser secundaria a un mayor consumo debido al efecto que tiene este modulador en la inducción de la formación de metabolitos reactivos del oxígeno (MROs). Las células S4MH, como ocurre en el caso del BSO, no son capaces de reponer el GSH oxidado mediante la acción de la enzima GGT; de hecho, el tratamiento con ATRA produce una disminución de la actividad de la enzima en estas células tumorales. En las células más diferenciadas F21, este tratamiento aumenta de la misma forma los niveles de MROs, pero estas células son capaces de responder al consumo secundario a este efecto del GSH, mediante un incremento en la actividad de la enzima GGT. El

tratamiento de las células F21 con las dosis más bajas de ATRA produce un incremento significativo de la actividad de la GGT, lo que permite incrementar los niveles intracelulares de GSH y, en consecuencia, la proliferación celular por encima de los niveles del control, al igual que ocurre con el BSO.

Estos resultados sugieren que un mecanismo de resistencia al tratamiento con ATRA puede estar mediado por la enzima GGT. En aquellas células con un alto nivel de expresión de la GGT, el estrés oxidativo (aumento de los MROs) producido por el ATRA y la consecuente reducción de los compuestos tiólicos, pueden ser revertidos por una rápida recuperación de los niveles de GSH intracelular mediada por la actividad de la GGT. Además, si la inducción de MROs es baja o moderada como ocurre con la dosis baja de ATRA empleada, el incremento de la actividad de la GGT como respuesta al estrés generado, puede producir una señal de supervivencia e incrementar la proliferación celular, como han sugerido también otros autores (Le Bras M, 2005). Este efecto puede ser mejor observado *in vivo*, donde la accesibilidad a los metabolitos que conforman el GSH es más limitante, por lo que existe más dependencia de enzimas suministradoras de los mismos, como es el caso de la GGT. Las células F21 aumentan su capacidad tumorigénica y metastática, tanto si han sido pretratadas con dosis moderadas de ATRA y posteriormente inoculadas en el animal, como si el ATRA se administra intraperitonealmente una vez inducido el tumor. Sin embargo, el tratamiento con ATRA de los tumores producidos por las células S4MH, disminuye su capacidad tumorigénica y metastática, produciéndose un índice de FRC de 1.2, lo que indica una eficacia terapéutica de este tratamiento.

El mecanismo de acción del ATRA para la inducción de su efecto en las células S4MH, parece ser dosis-dependiente. Así, la exposición a bajas dosis de ATRA, produce una disminución de su capacidad proliferativa posiblemente debido a una parada en el ciclo celular (como ocurre en otros modelos tumorales) (El-Metwally, 2006; Emionite L, 2003) y no debido a una inducción de la apoptosis celular. Sin embargo, cuando la dosis de ATRA aumenta, los MROs alcanzan niveles moderados-altos, observándose un aumento en el porcentaje de células

apoptóticas. Las células F21 son capaces de compensar los MROs producidos por las dos concentraciones de ATRA utilizadas, no observándose un aumento significativo de la apoptosis. Además se ha demostrado que la actividad de la enzima GGT es capaz de activar factores de transcripción, como es el caso del factor de transcripción NF-kB (Accaaoui MJ, 2000), el cual media en las respuestas celulares frente al estrés oxidativo y controla la expresión de diversos genes entre los que se encuentran algunos inhibidores del proceso apoptótico (Baeuerle PA, 1994). Este puede ser uno de los motivos por los que el tratamiento con ATRA en las células F21 no refleja un incremento en la apoptosis celular.

Estos resultados sugieren la relevancia que puede tener determinar la respuesta metabólica de las células tumorales frente a las terapias antitumorales, y no solo tener en cuenta la modificación de los niveles de GSH en condiciones basales para abordar un tipo de tratamiento. Así, aunque en condiciones basales, los niveles de GSH de las células S4MH son superiores, cuando estas células son tratadas con moduladores como el BSO o el ATRA, no presentan la maquinaria necesaria para obtener la respuesta metabólica que las permita seguir proliferando y mantener su capacidad tumorigénica. Sin embargo, las células F21, que cuentan con niveles basales de GSH más bajos, son capaces de responder ante estos moduladores, mediante un incremento de la enzima GGT y, a dosis moderadas de estos agentes, no solo mantienen sus niveles proliferativos sino que llegan a aumentar su capacidad tumorigénica con respecto a las células control.

Por otro lado, la capacidad de respuesta de las células tumorales al ATRA varía dependiendo del tipo tumoral. Los diferentes tumores presentan distintos perfiles de expresión de los receptores nucleares del ATRA, y la respuesta al tratamiento dependerá de su presencia y del tipo de isoformas que contienen las células. Además de la presencia de los receptores, otros factores pueden determinar la respuesta de las células al tratamiento, por lo que, de nuevo, es necesario determinar previamente el tipo de tumor y su grado de diferenciación, para prever la respuesta que tendrá el tratamiento que se propone. Es decir, sería relevante determinar el "perfil tumoral" de cada sujeto, para evitar efectos adversos de los

moduladores empleados en la terapia antitumoral y así aumentar la eficacia de los mismos.

Hay muy pocas referencias acerca de ensayos terapéuticos previos que utilicen de forma combinada el ATRA y el BSO. Sin embargo, algunos trabajos sobre la despigmentación producida por la citotoxicidad de ciertos agentes químicos, muestran un mecanismo de acción similar para el BSO y el ATRA, ya que proponen que ambos agentes actúan a través de la inhibición de la enzima γ -GST, produciendo una disminución de los niveles de GSH celulares y una sensibilización frente a la acción de drogas (Kasraee B, 2003).

Una vez determinado, en nuestro modelo experimental, los efectos producidos por el BSO –a través de la inhibición de la enzima γ -GCS– y el ATRA –a través de los mecanismos que regulan la proliferación, apoptosis, producción de MROs y diferenciación, entre otros–, nuestro siguiente objetivo ha sido determinar el efecto antitumoral que podría tener la combinación de los dos moduladores sobre las células de RMS metastático y estudiar la posibilidad de su aplicación terapéutica. Así, hemos utilizado conjuntamente el BSO (para disminuir los niveles de GSH de las células tumorales) y el ATRA (para inducir la diferenciación y actuar sobre la capacidad proliferativa de las células tumorales) para conseguir una quimiosensibilización efectiva para la posterior aplicación de otras terapias antitumorales clásicas (agentes alquilantes).

En las células S4MH, el tratamiento combinado produjo una disminución tanto de los niveles de GSH como de la proliferación celular con respecto al control, similar al producido por el BSO. Sin embargo, este tratamiento aumentó de forma significativa los niveles de MROs de estas células con respecto a los tratamientos utilizados de forma independiente, que igualmente no pudo ser compensado por la GGT, la cual disminuye su actividad con respecto al control. Consecuentemente, se pudo observar un incremento del porcentaje de células apoptóticas sobre todo con respecto al tratamiento aislado con ATRA.

En las células F21, la adición de BSO al tratamiento con ATRA revirtió el aumento, tanto de los niveles de GSH como la proliferación celular, observado cuando se utilizan los moduladores solos, demostrando la relevancia que el metabolismo del GSH tiene sobre la acción del ATRA. Con el tratamiento combinado, estas células, son capaces de mantener los niveles de GSH con respecto al control y, aunque inicialmente disminuyen su tasa proliferativa, a las 72 horas de cultivo ya han recuperado totalmente la capacidad proliferativa del control, hecho que no llega a ocurrir en el caso de las células S4MH. Sin embargo, este tratamiento incrementó la producción de MROs, que no pudieron ser compensados por la enzima GGT, la cual se mantuvo al nivel del control, no observándose el incremento producido por el BSO o el ATRA. Estos efectos indujeron un incremento en la apoptosis celular con respecto al control.

Cuando el tratamiento de ATRA+BSO fue administrado intraperitonealmente en los animales previamente inoculados con las células S4MH y F21 se pudo observar un efecto sinérgico de los dos moduladores. En las células S4MH, el tratamiento combinado produjo una disminución del volumen relativo de tumor (VRT) de 2.7 veces con respecto al control, el cual dio lugar a un T/C de 37%, inferior al obtenido con el BSO o el ATRA y se consiguió un FRC de 1.7, lo que indica un incremento muy significativo de este índice terapéutico con respecto a los tratamientos solos. Además, esta combinación terapéutica también disminuye la capacidad metastática de las células S4MH con respecto a los tratamientos de BSO o ATRA utilizados de forma independiente. En las células F21, al igual que en los experimentos *in vitro*, el tratamiento combinado revierte el incremento de la capacidad tumorigénica y metastática producida por el BSO o el ATRA. Es más, la doble combinación disminuye 1.3 veces el VRT con respecto al control, dando un T/C del 79%. Sin embargo no se obtuvieron diferencias en cuanto a la capacidad metastática de las células F21 con respecto al control.

Como se puede observar, los efectos del tratamiento BSO+ATRA observados *in vitro* en ambos tipos celulares, se ven incrementados cuando los moduladores se administran *in vivo*. Como hemos señalado anteriormente, en este caso las células

tumorales no se encuentran con el ambiente propicio para su crecimiento, como ocurre cuando se mantienen en condiciones de cultivo sin carencias de nutrientes. En la situación *in vivo*, las células tienen que potenciar sus mecanismos de supervivencia y proliferación, y es posible, que los mecanismos que son capaces de inducir *in vitro*, no sean suficientes para sobreponerse al ambiente hostil del tejido en el que se asientan.

Por otro lado, hemos comparado los resultados obtenidos con el tratamiento BSO+ATRA con el producido por la CY, un agente alquilante clásico utilizado en las combinaciones terapéuticas indicadas para el tratamiento del RMS metastático, junto con la vancomicina y la adriamicina D (terapia VAC). Tanto en las células S4MH como F21, el tratamiento con CY disminuye su capacidad metastática con respecto a la combinación de los moduladores. En las células F21, la combinación de estos moduladores revirtió el efecto prometastático que se producía cuando se aplicaban de forma aislada, pero no se encontraron diferencias con respecto al grupo control; sin embargo, en el caso de las células S4MH se produjo una disminución de la capacidad metastática de 1.8 veces con respecto al control. Con relación a la capacidad tumorigénica, las células F21 no mostraron diferencias respecto al tratamiento con CY, mientras que en las células S4MH disminuyó dicha capacidad cuando se aplicó el agente alquilante, con respecto al tratamiento BSO+ATRA. Como se observó en los ensayos *in vitro*, las células S4MH se vieron más afectadas por el tratamiento con el agente alquilante que las células F21. Estas últimas aumentaron la actividad GGT 1.8 veces con respecto al control, lo que les permitió recuperar antes tanto sus niveles de GSH como su actividad proliferativa, llegando a los niveles del control en ambos parámetros. Sin embargo, las células S4MH no llegaron a recuperar su capacidad proliferativa en ningún momento de la experiencia.

Sin embargo, la combinación de los moduladores muestra una ventaja terapéutica con respecto a la CY. Aunque este tratamiento disminuye en mayor medida los parámetros antitumorales, presenta una toxicidad asociada a su administración, lo que se demuestra por una disminución significativa de los

parámetros hematológicos analizados, así como en el peso de los animales. Cuando se administran ambos moduladores, no se observa una disminución de los linfocitos, ni de los parámetros de la serie roja, ni tampoco se produce una modificación significativa del peso de los animales con respecto al grupo control.

Teniendo en cuenta los efectos producidos tanto por la utilización de los moduladores como de la CY y la ausencia de efectos tóxicos cuando se utilizó el tratamiento combinado BSO+ATRA, nos planteamos una combinación terapéutica en busca de sinergias en la acción antitumoral de los moduladores y la CY.

Existen referencias sobre combinaciones terapéuticas de la CY con ambos moduladores por separado. El BSO ha sido utilizado como estrategia quimiosensibilizadora a este agente alquilante, sobre todo en el tratamiento de tumores de ovario (Ayhan A, 1996), sarcomas uterinos (Szantho A, 2003) y cáncer de mama (Chen G, 1995). La combinación CY+ATRA se ha utilizado en menor medida, en particular en el tratamiento de la leucemia promielocítica. El ATRA, aparte de los conocidos efectos sensibilizadores y antitumorales *per se*, en la terapia con CY tiene un efecto adyuvante mediante la activación de los macrófagos tisulares (Goettsch W, 1992). Además, estudios recientes proponen una mediación del ATRA en el aumento de la citotoxicidad producida por la CY, a través de una disminución de la actividad de las enzimas aldehído deshidrogenadas. Estas enzimas son capaces de convertir a la CY en un metabolito inactivo y su expresión está directamente relacionada con un incremento de la resistencia de las células tumorales a la CY (Moreb JS, 2005 y 2006).

Si comparamos el efecto producido por el tratamiento CY+BSO, en ambos tipos celulares, podemos observar que si bien el efecto sobre la capacidad tumorigénica es mayor en las células S4MH que en las F21 con respecto al control (disminución del VRT de 3.15 y 1.9 veces respectivamente), el efecto de la adición del BSO a la CY es más acusado en el caso de las células F21. Estas células disminuyeron 2 veces su capacidad tumorigénica con respecto al tratamiento con CY sola, mientras que en el caso de las células S4MH esta disminución fue de 1.3

veces. A pesar de que tratamiento produjo un incremento en la actividad GGT en las células F21, estas no pudieron contrarrestar sus efectos, observándose un incremento tanto de la producción de MROs como de la apoptosis con respecto al tratamiento con CY o BSO solos. Estos hechos se manifiestan en mayor medida *in vivo*, donde además el BSO se suministra de forma continua durante todo el ciclo de tratamiento y se produce una exposición a las defensas tisulares (Petruccio CA, 2006).

Por otro lado, cuando se adicionó ATRA al tratamiento con CY, no se encontraron diferencias en la capacidad tumorigénica de ambas líneas celulares, con respecto al tratamiento con CY sola. Sin embargo, se observó una disminución de 9 veces de la capacidad metastática en las células S4MH, no encontrándose diferencias en el caso de las células F21. Esta acción sobre el desarrollo metastático del ATRA ha sido estudiada por diferentes autores, los cuales han demostrado que las células tumorales tratadas con este agente disminuyen su capacidad invasiva, la expresión de metaloproteinasas de matriz extracelular (Berbow U, 1999), la expresión de moléculas de adhesión (cadherinas, Nwankwo JO, 2002) y sus receptores (integrinas, Segnupta S, 2000) y produce la reorganización de la actina del citoesqueleto, lo que disminuye la capacidad de adhesión e invasión y la motilidad de las células tumorales (Donald CD, 2001).

Si comparamos los efectos producidos por las dobles combinaciones CY+BSO y CY+ATRA podemos observar que, si bien el tratamiento con CY+BSO es el que produce un mayor efecto sobre la capacidad tumorigénica en ambos tipos celulares, la combinación CY+ATRA es más efectiva en cuanto a la disminución de la capacidad metastática. Además, otro hecho importante, es que estos tratamientos no aumentaron la toxicidad con respecto a la CY sola, como muestran los análisis del perfil hematológico y el peso de los animales.

Teniendo en cuenta los efectos de estos dobles tratamientos, y para utilizar las ventajas de cada uno de ellos, llevamos a cabo un estudio sobre la acción de un triple tratamiento utilizando simultáneamente los moduladores y el agente

alquilante. La administración de CY+BSO+ATRA dio lugar al mayor beneficio terapéutico en los dos tipos celulares. Los tratamientos *in vitro* revelaron la mayor disminución de la capacidad proliferativa con dicha triple terapia, incluso en las células F21, que si bien incrementaron de nuevo su actividad GGT, dicho incremento no fue suficiente para contrarrestar este tratamiento, observándose un aumento tanto de los MROs como de la apoptosis celular. La triple administración *in vivo*, permitió igualmente observar la máxima disminución de la capacidad tumorigénica, que en el caso de las células S4MH fue de 9 veces con respecto al control y de 3, 2.3 y 2.8 con respecto a la CY y a los dobles tratamientos CY+BSO y CY+ATRA, respectivamente. En las células F21, dicha disminución fue también considerable, siendo de 4 veces con respecto al grupo control, y de 3, 1.4 y 3 veces con respecto al tratamiento con CY, CY+BSO y CY+ATRA, respectivamente. Además, este tratamiento fue capaz de disminuir 300 veces la capacidad metastática de las células S4MH. Además el índice FRC, que indica un beneficio terapéutico del fármaco a partir del valor 1, llegó a sus niveles máximos con esta triple combinación, siendo de 8.6 en las células S4MH y de 3 en el caso de las F21.

Por otro lado, si bien este triple tratamiento produjo una toxicidad hematológica con respecto al grupo control, los niveles de leucocitos no disminuyen significativamente con respecto al tratamiento con CY sola, ni con respecto a las dobles combinaciones CY+BSO y CY+ATRA. De la misma manera, los análisis de la modificación del peso de los animales, muestran una disminución del peso similar a la producida por el tratamiento con CY sola, con una máxima pérdida de peso a lo largo de la experiencia de tan solo el 7%.

Estos resultados sugieren que moduladores como el BSO o el ATRA, combinados con los citostáticos clásicos, pueden ser de gran utilidad en el tratamiento del RMS metastático. Sin embargo, sería conveniente, la realización de un estudio individualizado de las células que componen el tumor, de forma que se defina el "perfil tumoral del sujeto". Para el establecimiento del perfil, se deberían estudiar parámetros celulares como el grado de diferenciación de las células que componen el tumor (el cual hemos visto que es de gran relevancia para determinar

la respuesta al tratamiento, en base a la expresión de la enzima GGT), la capacidad metabólica del GSH intracelular (lo que permitirá al tumor responder en mayor o menor medida a las terapias antineoplásicas) y la capacidad de respuesta frente al ATRA (determinada por la expresión de los receptores nucleares del ATRA, y por factores que regulan epigenéticamente, la funcionalidad de dichos receptores).

En consecuencia, el ATRA y la modulación del GSH pueden tener diferentes efectos dependiendo del grado de diferenciación celular en un mismo tipo tumoral, lo que depende del metabolismo del GSH en cada tipo celular, más que de sus niveles basales. Por este motivo, es necesario un análisis previo de la respuesta celular frente a los moduladores biológicos, antes de su aplicación como alternativa terapéutica.

VII. CONCLUSIONES

1. En las células de rhabdomyosarcoma de rata S4MH y F21, la respuesta al tratamiento con dosis moderadas de ATRA varía dependiendo del grado de diferenciación de cada tipo celular, lo que se evidencia por: a) una disminución de los niveles intracelulares del GSH y de la proliferación celular en la línea celular menos diferenciada S4MH; b) un aumento de dichos niveles y de la proliferación en el caso de la línea celular más diferenciada F21.
2. Los efectos derivados de la inhibición de la síntesis de glutatión con dosis moderadas de BSO, dependen del grado de diferenciación de dichas células derivadas de un mismo tipo tumoral, de modo similar a lo que sucede con el tratamiento con ATRA.
3. Esta respuesta está mediada por el nivel de expresión de la enzima gamma-glutamyltranspeptidasa en cada tipo celular. Ante la presencia de ATRA o BSO, las células F21 son capaces de aumentar el nivel de expresión de esta enzima, lo que les permite contrarrestar el efecto antitumoral de estos agentes, e incluso aumentar su capacidad tumorigénica. Por el contrario, las células S4MH mantienen un nivel bajo de expresión de la enzima, no siendo capaces de evitar los efectos de dichos moduladores biológicos.
4. El mantenimiento adecuado de los niveles de GSH en las células F21, reduce el efecto prooxidativo inducido por dosis moderadas de ATRA o BSO, evitando un aumento de la apoptosis en dicha línea celular. Sin embargo, en las células S4MH, estos agentes aumentan la formación de MROs y la apoptosis celular.
5. En los estudios *in vivo*, la combinación terapéutica ATRA+BSO produce un efecto antitumoral similar al ejercido por la ciclofosfamida, sin que se pueda objetivar un aumento de la toxicidad con respecto a los grupos controles.

6. La combinación ATRA+BSO+CY produce un efecto antitumoral significativamente superior al obtenido tras el tratamiento con CY sola, sin un aumento de la toxicidad con respecto a la administración aislada de dicho agente alquilante.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

A

Accaoui MJ, Enoui M, Mergny M, Masson C, Dominici C, Wellman M, Visvikis A. Gamma-glutamyltranspeptidase-dependent glutathione metabolism results in activation of NF- κ B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 276:1062-7.

Adams JD Jr, Chang ML, Klaidman L. Parkinson's disease-redox mechanisms. *Curr. Med. Chem.* 2001; 8:809-14.

Adams JD Jr, Klaidman LK, Odunze IN, Shen HC, Miller CA. Alzheimer's and Parkinson's disease. Brain levels of glutathione, glutathione disulfide and vitamin. *Mol. Chem. Neuropathol.* 1991; 14:213-26.

Ahmad S, Mulberg A, Aljian J, Vistica DT. Hepatic-mediated elevation and maintenance of metastatic tumor cell glutathione. *Biochem. Pharmacol.* 1986; 35:1697-701.

Akerlund B, Tynell E, Bratt G, Bielenstein M, Lidman C. N-acetylcysteine treatment and the risk of toxic reactions to trimethoprim-sulphamethoxazole in primary *Pneumocystis carinii* prophylaxis in HIV-infected patients. *J. Infect.* 1997; 35:143-7.

Anderson ME, Luo JL. Glutathione therapy: from prodrugs to genes. *Semin. Liver. Dis.* 1998; 18:415-24.

Anderson ME, Meister A. Glutathione monoesters. *Annal. Biochem.* 1989; 183:16-20.

Anderson ME. Glutathione and glutathione delivery compounds. *Adv. Pharmacol.* 1997; 38:65-78.

Arndt CA, Donaldson SS, Anderson JR et al. What constitutes optimal therapy for patients with rhabdomyosarcoma of the female genital tract? *Cancer* 2001; 91:2454-68.

Arnold HH, Gerharz CD, Gabbert HE, Salminen A. Retinoic acid induces myogenin synthesis and myogenin differentiation in the rat rhabdomyosarcoma cell line BA-Han-1C. *J. Cell Biol.* 1992; 118:877-87.

Ayhan A, Tuncer ZS, Hakverdi AU, Yuce K, Ayhan A. Sertoli-Leydig cell tumor of the ovary: a clinicopathologic study of 10 cases. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 1996; 17:75-8.

B

Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NK-kB in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12:141-79.

Bailey HH. L-S,R-buthionine sulfoximine: historical development and clinical issues. *Chem. Biol. Interact.* 1998; 111:239-54.

Barlow JW, Wiley JC, Mous M, Naredran A, Gee MF, Goldberg M, Sexmith E, Malkin D. Differentiation of rhabdomyosarcoma cell lines using retinoic acid. *Pediatr. Blood. Cancer* 2006; 47:773-84.

Barr FG. Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 2001; 20:5736-46.

del Bello B, Paolicchi A, Comporti M, Pompella A, Maellaro E. Hydrogen peroxide produced during g-glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. *FASEB J.* 1999; 13:69-79.

Benlloch M, Ortega A, Ferrer P, Segarra R, Obrador E, Asensi M, Carretero J, Estrela JM. Acceleration of glutathione efflux and inhibition of γ -glutamyltranspeptidase sensitize metastatic B16 melanoma cells to endothelium-induced cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 2005; 280:6950-9.

Bjornstedt M, Kumar S, Bjorkhem L, Spyrou G, Holmgren A. Selenium and the thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biomed. Environ. Sci.* 1997; 10:271-9.

Boya P, de la Peña A, Beloqui O, Larrea E, Conchillo M, Castelruiz Y, Civeira MP, Prieto J. Antioxidant status and glutathione metabolism in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 1999; 31:808-14.

Breitfeld PP, Meyer WH. *Oncologist.* 2005; 10:518-27.

Brennan M, Alektiar k, Maki R. Sarcomas of the soft tissue and bone. *Cancer: principles and practice of oncology.* 2001; 1841-935.

Brenemann JC, Lyden E, Pappo AS, et al. Prognostic factors and clinical outcomes in children and adolescents with metastatic rhabdomyosarcoma- A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21:78-84.

Bridge JA, Liu J, Weibolt V, et el. Novel genomics imbalance in embryonal rhabdomyosarcoma revealed by comparative genomic hybridization: an Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *Genes Chromosome Cancer* 2000; 27:337-44.

Bortoluzzi S, Bisognin A, Romualdi C, Danieli GA. Novel genes, possibly relevant for molecular diagnosis or therapy of human rhabdomyosarcoma, detected by genomic expression profiling. *Gene* 2005; 28:348-71.

Byun SS, Kim SW, Choi H, Lee C, Lee E. Augmentation of cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant human bladder cancer cells by modulating glutathione concentrations and glutathione-related enzyme activities. *BJU Int.* 2005; 95:1086-90.

C

Caliaro MJ, Vitaux P, Lafon C, Lochon I, Néhémé A, Canal P, Bugat R, Jozan S. Multifactorial mechanism for the potentiation of cisplatin (CDDP) cytotoxicity by all-trans retinoic acid (ATRA) in human ovarian cancer cell lines. *BJC.* 1997; 75:333-40.

Calle Y, Palomares T, Castro B, del Olmo M, Bilbao P, Alonso-Varona A. Tunicamycin treatment reduces intracellular glutathione levels: effect on the metastatic potential of the rhabdomyosarcoma cell line S4MH. *Chemotherapy* 2000; 46:406-28.

Calvin HI, Medvedovsky C, Worgul BV. Near-total glutathione depletion and age-specific cataracts induced by buthionine sulfoximine in mice. *Science* 1986; 233:553-5.

Cantin AM, Hubbard RC, Crystal RG. Glutathione deficiency in the epithelial lining fluid of the lower respiratory tract in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989; 139:370-2.

Carli M, Colombatti R, Oberlin O, et al. High-dose melphalan with autologous stem-cell rescue in metastatic rhabdomyosarcoma. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17:2796-803.

Carystinos GD, Alaoui MA, Phipps J, Yen L, Batist G. Upregulation of gap intercellular communication and connexin 43 expression by cyclic-AMP and all-trans-retinoic acid is associated with glutathione depletion and chemosensitivity in neuroblastoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2001; 47:126-32.

Casini AF, Maellaro E, Pompella A, Ferrali M, Comporti M. Lipid peroxidation, protein thiols and calcium homeostasis in bromobenzene-induced liver damage. *Biochem. Pharmacol.* 1987; 36:3689-95.

Castro B, Alonso-Varona A, del Olmo M, Bilbao P, Palomares T. Role of γ -glutamyltranspeptidase on the response of poorly and moderately differentiated rhabdomyosarcoma cell lines to buthionine sulfoximine-induced inhibition of glutathione synthesis. *Anticancer Drugs.* 2002; 13:281-91.

Castro OS, Covarrubias L. Role of retinoic acid and oxidative stress in embryonic stem cells death and neural differentiation. *FEBS Lett.* 1996; 381:93-7.

Cayota A, Vuillier F, González G, Dighiero G. *In vitro* antioxidant treatment recovers proliferative responses of anergic CD4⁺ lymphocytes from human immunodeficiency virus-infected individuals. *Blood* 1996; 87:4746-53.

Chattopadhyay N, Ray S, Biswas N, Chatterjee A. Effect of all-trans-retinoic acid on integrin receptors of human cervical cancer (SiHa) cells. *Gynecol. Oncol.* 1999; 75: 215-21.

Chen G, Waxman DJ. Identification of glutathione S-transferase as a determinant of 4-hydroxycyclophosphamide resistance in human breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 1995; 49:1691-701.

Chen X, Batist G. Sensitization effect of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate on tumor cells to melphalan and the role of 5-oxo-L-proline in glutathione modulation in tumor cells. *Biochem. Pharmacol.* 1998; 56:743-9.

Choi J, Iu RM, Forman HJ. Adaptation to oxidative stress: quinone mediated protection of signaling in rat lung epithelial L2 cells. *Biochem. Pharmacol.* 1997; 53:987-93.

Comporti M. Glutathione depleting agents and lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.* 1987; 45:143-69.

Cormier JN, Pollock RE. Soft tissue sarcomas. *CA Cancer J. Clin.* 2004; 54:94-109.

Crouch GD, Helman LJ. All-trans retinoic acid inhibits the growth of human rhabdomyosarcoma cell lines. *Cancer Res.* 1991; 51:4882-7.

D

De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis* 2001; 22:999-1013.

Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am. J. Physiol.* 1989; 257:163-73.

Deneke SM, Lynch BA, Fanburg BL. Transient depletion of lung glutathione by diethylmaleate enhances oxygen toxicity. *J. Appl. Physiol.* 1985; 58:571-4.

De Rosa SC, Zaretsky MD, Dubs JG, Roederer M, Anderson M, Green A, Mitra D, Watanabe N, Nakamura H, Tjioe I, Deresinski SC, Moore WA, Ela SW, Parks D, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. *Eur. J. Clin. Invest.* 2000; 30:915-29.

Djavaheri-Mergny M, Accaoui MJ, Rouillard D, Wietzerbin J. γ -glutamyl transpeptidase activity mediates NF- κ B activation through peroxidation in human leukemia U937 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 2002; 232:103-11.

Droge W. Cysteine and glutathione deficiency in AIDS patients: a rationale for the treatment with N-acetyl-cysteine. *Pharmacol.* 1993; 46:61-5.

Durham JR, Frierson HF, Hanigan MH. Gamma-glutamyl transpeptidase immunoreactivity in benign and malignant breast tissue. *Breast Cancer Res. Treat.* 1997; 45:55-62.

E

Ek ET, Choong PF. The role of high-dose therapy and autologous stem cell transplantation for pediatric bone and soft tissue sarcomas. *Expert. Rev. Anticancer Ther.* 2006; 6:225-37.

El-Metwally T, Hussein M, Abd-El-Ghaffar SK, Abo-El-Naga MM, Parviz M, Pour PM, Ulrico AB. Retinoic acid can induce markers of endocrine transdifferentiation in pancreatic ductal adenocarcinoma: an in vitro cell line model. *J. Clin. Pathol.* 2006; 59:603-10.

Emionite L, Galmozzi F, Raffo P, Vergani L, Toma S. Retinoids and malignant melanoma: a pathway of proliferation inhibition on SK MEL28 cell line. *Anticancer Res.* 2003; 23:13-9.

Emonet N, Leccia MT, Favier A, Beani JC, Richard MJ. Thiols and selenium: protective effect on human skin fibroblasts exposed to UVA radiation. *J. Photochem. Photobiol. B.* 1997; 40:84-90.

Enoiu M, Aberkane H, Salazar JF, Leroy P, Groffen J, Siest G, Wellman M. Evidence for the pro-oxidant of γ -glutamyltranspeptidase-related enzyme. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 29:825-33.

Estrela JM, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2006; 43:143-81.

F

Fazi F, Travaglini L, Carotti D, Palitti F, Diverio D, Alcalay M, McNamara S, Miller WH, Lo Coco F, Pelicci PG, Nervi C. Retinoic acid targets DNA-methyltransferases and histone deacetylases during APL blast differentiation *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* 2005; 24:1820-30.

Fernández-Checa JC, Kaplowitz N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005; 204:263-73.

Fiaschi T, Cozzi G, Raugei G, Formigli L, Ramponi G, Chiarugi P. Redox regulation of beta-actin during integrin-mediated cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 2006; 281:22983-91.

Fletcher JA. Molecular biology and cytogenetics of soft tissue sarcomas: relevance and targeted therapies. *Cancer Treat. Res.* 2004; 120:99-116.

Forrester TE, Badaloo V, Bennett FI, Jackson AA. Excessive excretion of 5-oxoproline and decreased levels of blood glutathione in type II diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1990; 44:847-50.

G

Gallego S, Sánchez de Toledo J. *Clin. Transl. Oncol.* 2005; 7:35-41.

Ganjavi H, Gee M, Narendran A, Freedman MH, Malkin D. Adenovirus-mediated p53 gene therapy in pediatric soft-tissue sarcoma cell lines: sensitization to cisplatin and doxorubicin. *Cancer Gene Ther.* 2005; 12:397-406.

Goettsch W, Hatori Y, Sharma RP. Adjuvant activity of all-trans retinoic acid in C57Bl/6 mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 1992; 14:143-50.

Gómez-Vidal JA, Campos J, Marchal JA, Boulaiz H, Gallo MA, Carrillo E, Espinosa A, Aránega A. Actual targets in cytodifferentiation cancer therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* 2004; 4:175-202.

Gopalakrishna R, Jaken S. Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28:1349-61.

Graber R, Losa GA. Apoptosis in human lymphoblastoid cells induced by acivicin, a specific γ -gluttransferase inhibitor. *Int. J. Cancer* 1995; 62:443-8.

Groves RW, Fracchia JN, MacDonald Dm. γ -Glutamyl transpeptidase expression in foetal skin, inflammatory dermatoses, and cutaneous neoplasia. *Br. J. Dermatol.* 1991; 125:1-5.

Guérin E, Ludwig MG, Basset P, Anglard P. Stromelysin-3 induction and interstitial collagenasa repression by retinoic acid. *J. of Biol. Chem.* 1997; 272:11088-95.

Guichard M, Lespinasse F, Estelin R, Gerbaulet A, Haie C, Lartigau E, Malaise EP, Micheau C, Prade M, Richard JM. Glutathione and cysteine levels in human tumour biopsies. *Br. J. Radiol.* 1990; 63:557-61.

H

Hale GA. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for pediatric solid tumors. *Expert. Rev. Anticancer Ther.* 2005; 5:835-46.

Hanigan MH, Ricketts WA. Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemistry* 1993; 32:6302-6.

Hanigan MH, Frierson H, Swanson PE, de Young BR. Altered expression of gamma-glutamyl transpeptidase in human tumors. *Hum. Pathol.* 1999; 30:300-5.

Herzenberg LA, De Rosa SC, Dubs JG, Roederer M, Anderson MT, Ela SW, Deresinski SC, Herzenberg LA. Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997; 94:1967-72.

Higuchi Y. Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. *J. Cell Mol. Med.* 2004; 8:455-64.

Hirai Y, Kawabe N, Yoshiko T, Miyamoto S, Iwakawa S. Effect of 2-methoxyestradiol, Buthionine sulfoximine and hydrogen peroxide on the viability of renal carcinoma cell lines (ACHN and ACVB). *Biol. Pharm. Bull.* 2006. 29:1064-7.

Hochwald SN, Harrison LE, Rose DM, Anderson M, Burt ME. Gamma-glutamyl transpeptidase mediation of tumor glutathione utilization in vivo. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996; 88:193-7.

Holroyd KJ, Buhl R, Borok Z, Roum JH, Bokser AD, Grimes GJ, Czerski D, Cantin AM, Crystal RG. Correction of glutathione deficiency in the lower respiratory tract of HIV seropositive individuals by glutathione aerosol treatment. *Thorax* 1993; 48:985-9.

Hoogendorn PC, Collin F, Daugaard S, Dei Tos AP, Fisher C, Schneider U, Sciort R. Pathology and Biology Subcommittee of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Groups. Changing concepts in the pathological basis of soft tissue and bone sarcoma treatments. *Eur. J. Cancer* 2004; 40:1644-54.

Hopkins, FG. On an autoxidisable constituent of the cell. *Biochem. J.* 1921; 15:286-305.

I

Iantomasi T, Marraccini P, Favilli F, Vincenzini MT, Ferretti P, Tonelli F. Glutathione metabolism in Crohn's disease. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 1994; 53:87-91.

J

Jaruga P, Jaruga B, Gackowski D, Olczak A, Halota W, Pawlowska M, Olinski R. Supplementation with antioxidant vitamins prevents oxidative modification of DNA in lymphocytes of HIV-infected patients. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 32:414-20.

Jenner P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet* 1994; 344:796-8.

Jewell SA, Bellomo G, Thor H, Orrenius S, Smith M. Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. *Science* 1982; 217:1257-9.

Jiménez-Lara AM, Clarke N, Altucci L, Gronemeyer H. Retinoic-acid-induced apoptosis in leukemia cells. *TRENDS Mol. Med.* 2004; 10:508-15.

K

Kasraee B, Handjani F, Aslani FS. Enhancement of the depigmenting effect of hydroquinone and 4-hydroxyanisole by all-trans retinoic acid (tretionin): the impairment of glutathione-dependent cytoprotection?. *Dermatology*. 2003; 206:289-91.

Kawai H, Kiura K, Tabata M, Yoshino T, Takata I, Hiraki A, Chikamori K, Ueoka H, Tanimoto M, Harada M. Characterization of non-small-cell lung cancer cell lines established before and after chemotherapy. *Lung Cancer*. 2002; 35:305-14.

Keshavarzian A, Fields JZ. A radical perspective on ulcerative colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol*. 1995; 10:208-9.

Kletsas D, Barbieri D, Stathakos D, Botti B, Bergamini S, Tomasi A, Monti D, Malorni W, Franceschi C. The highly reducing sugar 2-deoxy-D-ribose induces apoptosis in human fibroblasts by reducing glutathione depletion and cytoskeletal disruption. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1998; 243:416-25.

Knoll N, Ruhe C, Veeriah S, Sauer J, Glei M, Gallagher EP, Pool-Zobel BL. Genotoxicity of 4-hydroxy-2-nonenal in human colon tumor cells is associated with cellular levels of glutathione and the modulation of glutathione S-transferase A4 expression by butyrate. *Toxicol. Sci*. 2005; 86:27-35.

Kosower NS, Kosower EM, Wertheim B, Correa WS. Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1969; 37:593-6.

Kulkarni AA, Kulkarni AP. Retinoids inhibit mammalian glutathione transferases. *Cancer Lett*. 1995; 91:185-9.

L

Langston AW, Gudas LJ. Retinoic acid and homeobox gene regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1994; 4:550-5.

Larrea E, Beloqui O, Muñoz-Navas MA, Civeira MP, Prieto J. Superoxide dismutase in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Free Radic. Biol. Med.* 1998; 24:1235-41.

Lash LH. Role of glutathione transport processes in kidney function. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005; 204:329-42.

Le Bras M, Clement MV, Pervaiz S, Brenner C. Reactive oxygen species and the mitochondrial signalling pathway of cell death. *Histol. Histopathol.* 2005; 20:205-20.

Lee FYF, Siemann DW. Isolation by flow cytometry of a human ovarian tumor cell subpopulation exhibiting a high glutathione content phenotype and increased resistance to adriamycin. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1989; 16:1315-9.

Levy EJ, Anderson ME, Meister A. Transport of glutathione diethyl ester into human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993; 90:9171-5.

Lin RH, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH, Evans RM. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature.* 1998; 391: 811-14.

Lin LM, Li BX, Xiao JB, Lin DH, Yang BF. Synergistic effect of all-trans-retinoic acid and arsenic trioxide on growth inhibition and apoptosis in human hepatoma, breast cancer, and lung cancer cells in vitro. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11: 5633-7.

Liu L, Saldanha SN, Pate MS, Andrews LG, Tollefsbol TO. Epigenetic regulation of human telomerase reverse transcriptase promoter activity during cellular differentiation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004; 41: 26-37.

Loguercio C, Del Vecchio M, Blanco C, Coltorti M, Nardi G. Alteration of erythrocyte glutathione, cysteine and glutathione synthetase in alcoholic and non-alcoholic cirrhosis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1992; 52:207-13.

Look MP, Rockstroh JK, Rao GS, Kreuzer KA, Barton S, Lemoch H, Sudhop T, Hoch J, Stockinger K, Spengler U, Sauerbruch T. Serum selenium, plasma glutathione (GSH) and erythrocyte glutathione peroxidase (GSH-Px) levels in asymptomatic versus symptomatic human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1997; 51:266-72.

Lomaestro BM, Malone M. Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. *Ann. Pharmacother.* 1995; 29:1263-73.

Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* 1999; 13:1169-83.

M

Maellaro E, Dominici S, del Bello B, Valentini MA, Pieri L, Perego P, Supino R, Zunino F, Lorenzini E, Paolicchi A, Comporti M, Pompella A. Membrane gamma-glutamyl transpeptidase activity of melanoma cells: effects on cellular H₂O₂ production, cell surface protein thiol oxidation and NF-kB activation status. *J. Cell Sci.* 2000; 113:2671-8.

Mc Mulkin HM, Yanchar NL, Fernandez CV et al. Sentinel lymph node mapping and biopsy: a potential valuable tool in the management of childhood extremity rhabdomyosarcoma. *Pediatr. Surg. Int.* 2003; 19; 453-6.

Martelli H, Oberlin O, Rey A et al. Conservative treatment for girls with nonmetastatic rhabdomyosarcoma of the genital tract: a report from the Study Committee of the International Society of Pediatric Oncology. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17:2117-22.

Martínez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* 1995; 77:147-61.

Matés JM, Sánchez-Jiménez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implication for cancer therapy. *Int. J. Biochem. Biol.* 2000; 32:157-70.

Mazeron JJ, Suit HD. Lymph nodes as sites of metastasis from sarcoma of soft tissue. *Cancer.* 1987; 60:1800-8.

Meister A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis and its reversal applications in research and therapy. *Pharmacol. Ther.* 1991; 51:155-94.

Meister A. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 1983; 52:711-60.

Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 1983; 220:472-7.

Meister A. Transport and metabolism of glutathione and gamma-glutamyl amino acids. *Biochem. Soc. Trans.* 1983; 11:793-4.

Meyer WH, Spunt SL. Soft tissue sarcomas of childhood. *Cancer. Treat. Rev.* 2004; 30:269-80.

Miyatake JI, Maeda Y, Nawata H. Thiol compounds rescue growth inhibition by retinoic acid on HTLV-I (+) T lymphocytes; possible mechanism of retinoic-acid-induced growth inhibition of adult T-cell leukemia cells. *Hematopathol. Mol. Hematol.* 1998; 11:89-99.

Mocellin S, Rossi CR, Brandes A, Nitti D. *Cancer Treat. Rev.* 2006; 32:9-27.

Moreb JS, Muhoczy D, Ostmark B, Zucali JR. RNAi-mediated knockdown of aldehyde deshidrogenase class-1A1 and class-3A1 is specific and reveals that each contributes equally to the resistance against-4-hydroxycyclophosphamide. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2006; 14. (versión online)

Moreb JS, Gabr A, Vartikar GR, Gorda S, Zucali JR, Mohuczy D. Retinoic acid down-regulates aldehyde deshidrogenase and increase cytotoxicity of 4-hydroxycyclophosphamide and acetaldehyde. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005; 312: 339-45.

Morton DI, Eilber Fr. Soft tissue sarcomas. *Cancer Med.* 1982; 2141-57.

N

Njar VCO, Gediya L, Purushottamachar P, Chopra P, Vasaitis TS, Khandelwal A, Mehta J, Huynh C, Belosay A, Patel J. Retinoic acid metabolism blocking agents (RAMBAs) for treatment of cancer and dermatological diseases. *Bioorg. Med. Chem.* 2006; 14:4323-40.

Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. Redox Imbalance and its control in HIV infection. *Antioxid. Redox Signal* 2002; 4:455-64.

Neville HL, Andrassy RJ, Lobe TE et al. Preoperative staging, prognostic factors, and outcome for extremity rhabdomyosarcoma: a preliminary report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV (1991-1997). *J. Pediatr. Surg.* 2000; 35:317-21.

Nishiuch Y, Sasaki M, Nakayasu M, Oikawa A. Cytotoxicity of cysteine in culture media. *In Vitro.* 1976; 12:635-8.

Newton WA, Gehan EA, Webber BL, et al. Classification of rhabdomyosarcomas and related sarcomas. Pathologic aspects and proposal for a new classification. An Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *Cancer* 1995; 76:1073-85.

○

Obrador E, Navarro J, Mompo J, Asensi M, Pellicer JA, Estrela JM. Glutathione and the rate of cellular proliferation determine tumour cell sensitivity to tumour necrosis factor *in vivo*. *Biochem. J.* 1997; 325:183-9.

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. Phase I trial of buthionine sulfoximine in combination with melphalan in patients with cancer. *J. Clin. Oncol.* 1996; 14:249-56.

Ozols RF, Louie KG, Plowman J. Enhanced melphalan cytotoxicity in human ovarian cancer *in vitro* and in tumor bearing nude mice by buthionine sulfoximine depletion of glutathione. *Biochem. Pharmacol.* 1987; 36:147-53.

Ogose A, Motoyama T, Hotta T, Watanabe H. *In Vitro* differentiation and proliferation in a newly established human rhabdomyosarcoma cell line. *Virchows Arch.* 1995; 426:385-91.

Olivier Pascual N, Peralta Calvo JM, Abelairas Gómez JM. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. Nº 6, Junio 2005.

O'Sullivan B, Ward I, Catton C. Recent advances in radiotherapy for soft tissue sarcomas. *Curr Oncol Rep.* 2003; 5:274-81.

P

Pacht ER, Timerman AP, Lykens MG, Merola AJ. Deficiency of alveolar fluid glutathione in patients with sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Chest* 1991; 100:1397-403.

Palomares T, Bilbao P, del Olmo M, Castro B, Calle Y, Alonso-Varona A. In vitro and in vivo comparison between the effects of treatment with adenosine triphosphate and treatment with buthionine sulfoximine on chemosensitization and tumor growth of B16 melanoma. *Melanoma Res.* 1999; 9:233-42.

Pankiv S, Moller S, Bjorkov G, Moens U, Huseby NE. Radiation-induced upregulation of gamma-glutamyltransferase in colon carcinoma cells is mediated through the Ras signal transduction pathway. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1760:151-7.

Pasquali D, Rossi V, Prezioso D, Gentile V, Colantuoni V, Lotti T, Bellastella A, Sinisi A. Changes in tissue transglutaminase activity and expression during retinoic acid induced growth arrest and apoptosis in primary cultures of human epithelial prostate cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84:1463-9.

Pellicer JA, Lasso de la Vega MC, Obrador E, Navarro J, Estrela JM. Metabolismo del glutatión en células tumorales. *Oncología* 1994; 17:437-47.

Pileblad E, Magnusson T. Increase in rat brain glutathione following intracerebroventricular administration of gamma-glutamylcysteine. *Biochem. Pharmacol.* 1992; 44:895-903.

Planas-Silva MD, Weinberg RA. The restriction point and control of cell proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997; 9: 768-72.

Plummer JL, Smith BR, Sies H, Bend JR. Chemical depletion of glutathione *in vivo*. *Methods Enzymol.* 1981; 77:50-9.

Pompella A, de Tata V, Paolicchi A, Zunino F. Expresión of γ -glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance. *Biochem. Pharmacol.* 2006; 71:231-8.

Prezioso JA, Wang N, Duty L, Bloomer WD, Gorelik E. Enhancement of pulmonary metastasis formation and γ -glutamyltranspeptidase activity in B16 melanoma induced by differentiation *in vitro*. *Clin. Exp. Metast.* 1993; 45:55-62.

R

Ragpert-De Meyts E, Shi M, Chang M, Robison TW, Groffen J, Heisterkamp N. Transfection with gamma-glutamyl transpeptidase enhances recovery from glutathione depletion using extracellular glutathione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992; 114:56-62.

Ramp U, Gerharz CD, Eifler E, Biesalski HK, Gabbert HE. Effects of retinoic acid metabolites on proliferation and differentiation of the clonal rhabdomyosarcoma cell line BA-HAN-1C. *Biol. Cell.* 1994; 81:31-7.

Ricaud S, Vernus B, Bonnieu A. Response of human rhabdomyosarcoma cell lines to retinoic acid: relationship with induction of differentiation and retinoic acid sensitivity. *Exp. Cell. Res.* 2005; 311:192-204.

Russo A, DeGraff W, Friedman N, Mitchell JB. Selective modulation of glutathione levels in human normal versus tumor cells and subsequent differential response to chemotherapy drugs. *Cancer Res.* 1986; 46:2845-8.

S

Scotlandi K, Manara MC, Nicoletti G, Lollini PL, Lukas S, Benini S, Croci S, Perdichizzi S, Zambelli D, Serra M, García-Echeverría C, Hofman F, Picci P. Antitumor activity of the insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 in musculoskeletal tumors. *Cancer Res.* 2005; 65:3868-76.

Serrone L, Hersey P. The chemoresistance of human malignant melanoma: an update. *Melanoma Res.* 1999; 9:51-8.

Shimizu T, Iwanaga M, Yasunaga A, Urata Y, Goto S, Shibata S, Kondo T. Protective role of glutathione synthesis on radiation-induced DNA damage in rabbit brain. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1998; 18:299-310.

Simeone AM, Tari AM. How retinoids regulate breast cancer cell proliferation and apoptosis. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2004; 6:1475-84.

Sole LA, Bellmunt J. Historia natural y estadiaje de los sarcomas de partes blandas. *Rev. Cancer.* 1998; 12:137-42.

Soprano DR, Qin P, Soprano KJ. Retinoic acid receptors and cancer. *Annu. Rev. Nutr.* 2004; 24:201-21.

Sorensen PHB, Lunch JC, Qualman SJ, et al. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20:2672-9.

Sutton LM, Warmuth MA, Petros WP, Winer EP. Pharmacokinetics and clinical impact of all-trans-retinoic acid in metastatic breast cancer: a phase II trial. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1997; 40: 335-41.

Szallasi Z. Fatal attractors: theoretical approaches to tumor differentiation. *Trends Pharmacol. Sci.* 2000; 21:459-60.

Szantho A, Balega J, Szabo I, Demeter A, Sipos N, Csapo Z, Papp Z. Adjuvant chemotherapy following surgery in the management of uterine sarcomas. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2003; 24:421-4.

T

Tabbarah HJ. Sarcomas. *Manual of Beside Oncology.* 1983; 21-332.

Thrall BD, Raha GA, Springer DL, Meadows GG. Differential sensitivities of murine melanocytes and melanoma cells to buthionine sulfoximine and anticancer drugs. *Pigment Cell. Res.* 1991; 4:234-9.

Thanislass J, Raveendran M, Devaraj H. Buthionine sulfoximine-induced glutathione depletion. Its effect on antioxidants, lipid peroxidation and calcium homeostasis in the lung. *Biochem. Pharmacol.* 1995; 50:229-34.

V

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2006; doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.

Vanhoefler U, Cao S, Harstrick S, Seeber S, Rustum YM. Comparative antitumor efficacy of docetaxel and paclitaxel in nude mice bearing human tumor xenographs that overexpress the multidrug resistance protein (MRP). *Ann. Oncol.* 1997; 8:1221-8.

van Klaberen RJ, Hoet JL, Demedts M, Nemery B. Increase in γ -glutamyltransferase by glutathione depletion in rat type II pneumocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 22:525-34.

Van Moorsel CJA, Pinedo HM, Veerman G, Vermorken PE, Postmus PE, Peters GJ. Scheduling of gemcitabine and cisplatin in Lewis lung tumour bearing mice. *Eur. J. Cancer* 1999; 35:808-14.

van Zandwijk N. N-acetylcysteine for lung cancer prevention. *Chest* 1995; 107:1437-41.

Vasallo JA, Barrios E. Actualización ponderada de los factores de riesgo del cáncer. Montevideo: *Comisión honoraria de lucha contra el cáncer*, 2003.

W

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* 1995; 81:323-30.

White AC, Thannickal VJ, Fanburg BL. Glutathione deficiency in human disease. *J. Nutr. Biochem.* 1994; 5:218-26.

Wilcken NR, Sarcevic B, Musgrove EA, Sutherland RL. Differential effects of retinoids and antiestrogens on cell cycle progression and cell cycle regulatory genes in human breast cancer cells. *Cell Growth Differ.* 1996; 7:65-74.

Wlodek L, Grabowska A, Marcinkiewicz J. The modulation of IL-2 dependent proliferation of CTLL-2 cells by 2-methyl-thiazolidine-2,4-dicarboxylic acid. *Immunophar.* 1995; 30:51-8.

Wolden SL, Anderson JR, Crist WM, et al. Indications for radiotherapy and chemotherapy after complete resection in rhabdomyosarcoma: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma studies I to III. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17:3468-75.

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 2004; 134:489-92.

Y

Yaagoubi M, Hachad H, Leh H, Siest G, Wellman M. γ -glutamyltranspeptidase expression during all-trans retinoic acid-induced differentiation of hematopoietic cell lines. *FEBS Lett.* 1995; 369:183-6.

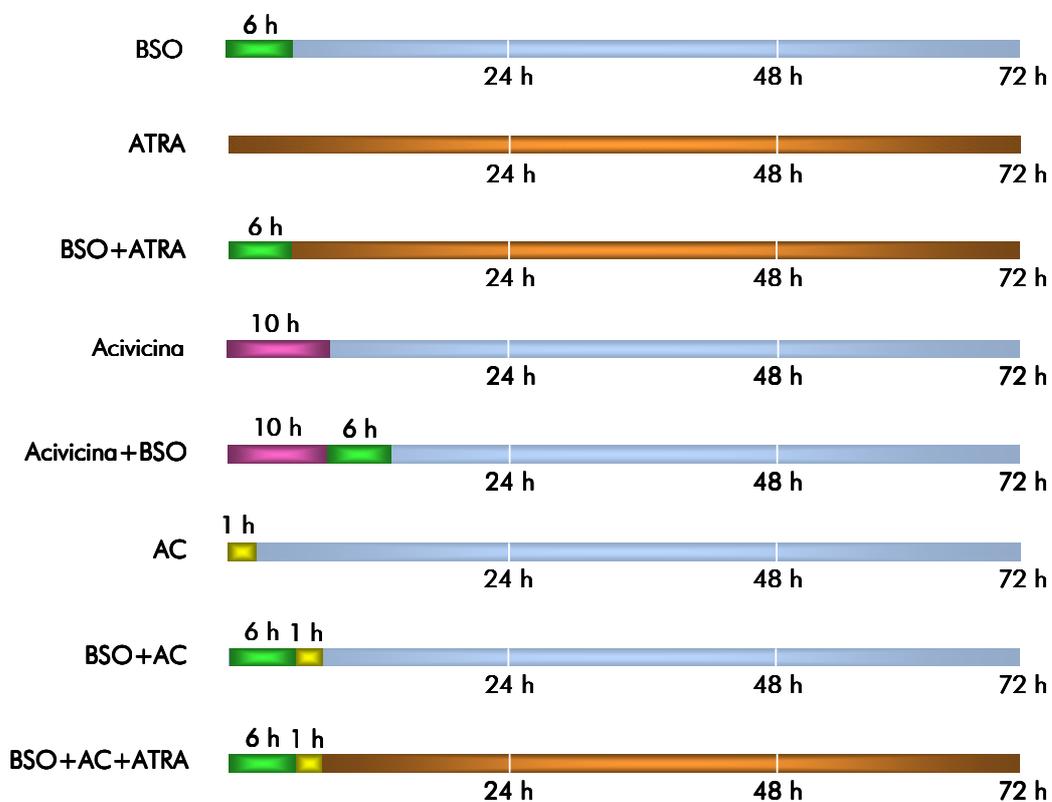
Yang L, Ostrowski J, Reczek P, Brown P. The retinoic acid receptor antagonist, BMS453, inhibits normal breast cell growth by inducing active TGF- β and causing cell cycle arrest. *Oncogene* 2001; 8025-35.

Yoshida T, Oguro T, Numazawa S, Kuroiwa Y. Effects of phorone (diisopropylidene acetone), a glutathione (GSH) depletor, on hepatic enzymes involved in drug and heme metabolism in rats: evidence that phorone is a potent inducer of heme oxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1987; 145:502-8.

IX. ANEXO I

ESQUEMA DE LAS PAUTAS DE LOS TRATAMIENTOS *In Vitro*

Para la determinación de los niveles de GSH, proliferación y apoptosis

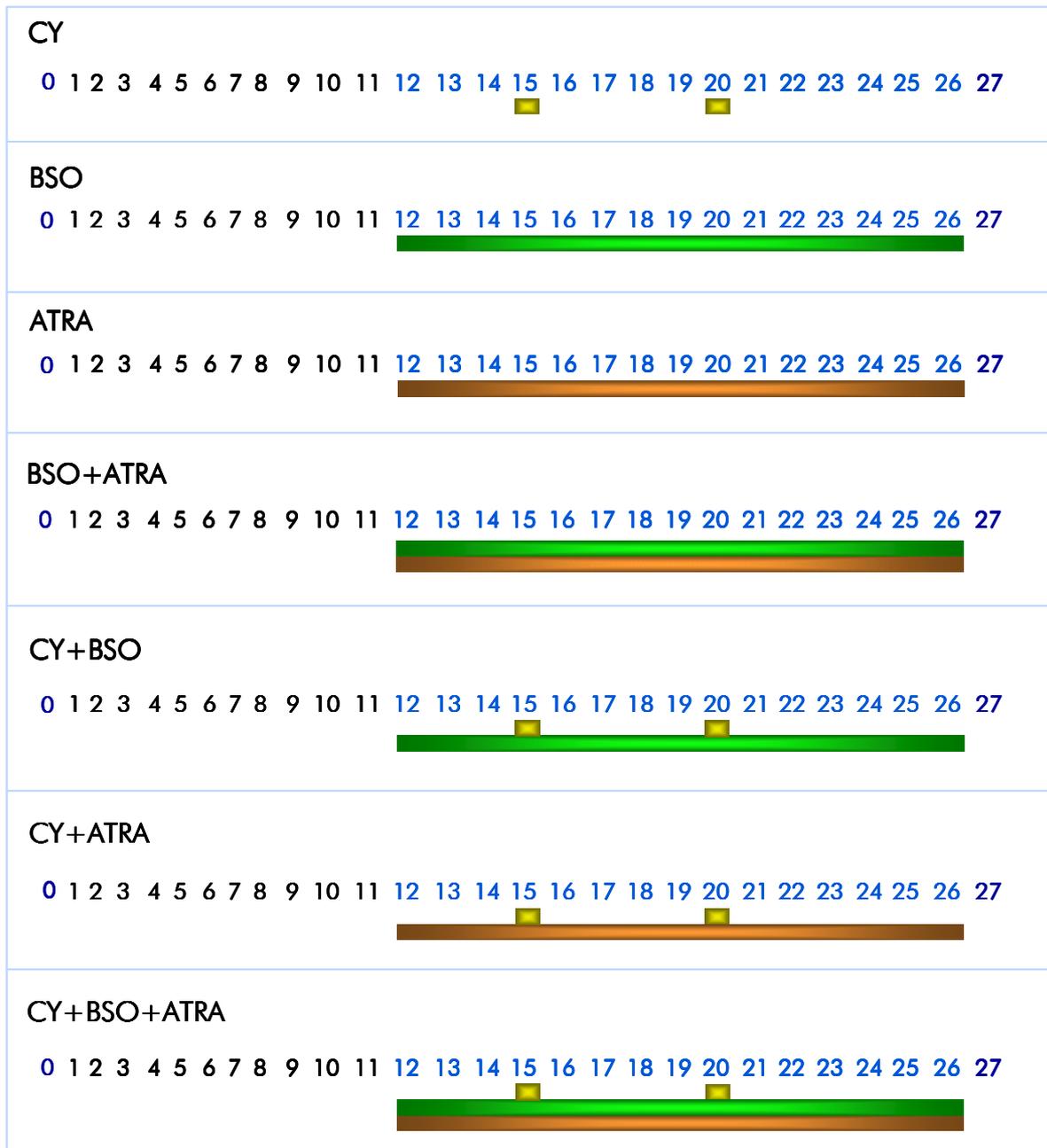


Para la determinación de la actividad GGT y los MROs



X. ANEXO II

ESQUEMA DE LAS PAUTAS DE LOS TRATAMIENTOS *In Vivo*



BSO  0: día de inoculación celular
 ATRA  12-26: ciclo de tratamiento
 CY  27: sacrificio