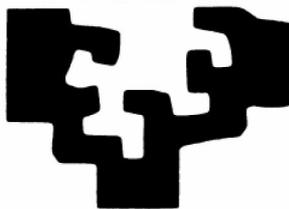


eman ta zabal zazu



universidad
del país vasco

euskal herriko
unibertsitatea

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR E HISTOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

**LA MODULACIÓN SELECTIVA DE LOS NIVELES DE
GLUTATIÓN CON L-2-OXO-4-TIAZOLIDINA CARBOXILATO
AUMENTA LA EFICACIA DE LA INTERLEUCINA-2 E
INCREMENTA EL BENEFICIO TERAPÉUTICO DE LA
BIOQUIMIOTERAPIA DEL MELANOMA METASTÁTICO**

Maite del Olmo Basterretxea
Leioa, 2006

ISBN: 978-84-9860-151-0

**LA MODULACIÓN SELECTIVA DE LOS NIVELES DE
GLUTATIÓN CON L-2-OXO-4-TIAZOLIDINA CARBOXILATO
AUMENTA LA EFICACIA DE LA INTERLEUCINA-2 E
INCREMENTA EL BENEFICIO TERAPÉUTICO DE LA
BIOQUIMIOTERAPIA DEL MELANOMA METASTÁTICO**

**Maite del Olmo Basterretxea
Leioa, 2006**

**Directores de Tesis
Dr. Teodoro Palomares Casado
Dra. Ana Isabel Alonso Varona**

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 Barrena. Asimismo, se agradece la colaboración del animalario perteneciente a la UPV/EHU.

A mis padres, Maite y José Ignacio
y a mis hermanas, Silvia y Sandra

Esta Tesis no se hubiera podido escribir sin el apoyo, consejo y el ánimo de muchos amigos. Quiero expresar mi sincero agradecimiento a

Mis directores, el Doctor Teodoro Palomares y la Doctora Ana Alonso, por su inestimable apoyo, asesoramiento, dedicación y constancia en la elaboración de este trabajo, así como por la confianza depositada en mí y, sobre todo, por su amistad.

Mi amiga Begoña, por su apoyo, ánimo y paciencia en los momentos compartidos en esas interminables jornadas de laboratorio. Por esas largas y entrañables conversaciones que me han ayudado a seguir adelante.

Mi amiga Loli, por sus consejos que me han ayudado y animado en los momentos difíciles.

A Lola Boyano por su apoyo en la realización de esta tesis y a Juan Bilbao por la ayuda inestimable en el análisis estadístico y su apoyo incondicional.

Mis compañeros y amigos de laboratorio Miren, Lorea, Josune, Billy, Olga, Elvira, Marco, Nerea, Rober, que han hecho que el departamento sea un lugar de trabajo alegre y distendido.

A los Profesores y PAS del Departamento, a Mila y Marijose, que siempre me han ayudado cuando lo he necesitado.

Mis amigos por haber compartido conmigo días inolvidables y haber estado ahí en todo momento.

De manera especial a toda mi familia, por el apoyo y paciencia por mis silencios durante todos estos años.

A todos, muchas gracias

ÍNDICE

II. 4. 3. 7. Radioprotección	42
II. 4. 3. 8. Detoxificación	42
II. 4. 4. Modulación de los niveles de glutatión	43
II. 4. 4. 1. Agentes que incrementan los niveles de glutatión	43
II. 4. 4. 1. 1. GSH monoéster	43
II. 4. 4. 1. 2. GSH diéster	44
II. 4. 4. 1. 3. Metionina	44
II. 4. 4. 1. 4. γ -Glutamilcisteína	44
II. 4. 4. 1. 5. N-acetilcisteína	45
II. 4. 4. 1. 6. Tiazolidinas	46
II. 4. 4. 2. Agentes que disminuyen los niveles de GSH	47
II. 4. 5. Glutatión y patología	49
II. 4. 5. 1. Influencia de glutatión en la patología no tumoral	49
II. 4. 5. 2. Glutatión y patología tumoral	50
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	59
IV. 1. Material	61
IV. 1. 1. Animales	61
IV. 1. 2. Células	61
IV. 1. 2. 1. Células tumorales	61
IV. 1. 2. 2. Células mononucleares de sangre periférica	62
IV. 1. 3. Material de cultivos celulares	63
IV. 1. 3. 1. Frascos y placas de cultivo	63
IV. 1. 3. 2. Medios de cultivo	63
IV. 1. 3. 3. Soluciones tamponadas	63
IV. 1. 3. 4. Anticuerpos monoclonales	64

IV. 1. 4. Fármacos	64
IV. 1. 4. 1. Citostáticos	64
IV. 1. 4. 1. 1. Ciclofosfamida	64
IV. 1. 4. 1. 2. Acroleína	65
IV. 1. 4. 2. Moduladores biológicos del glutatión	65
IV. 1. 4. 2. 1. N-acetilcisteína	65
IV. 1. 4. 2. 2. L-butionina-[S,R]-sulfoximina	65
IV. 1. 4. 2. 3. L-2-oxo-4-tiazolidina carboxilato	65
IV. 1. 4. 3. Citocina	66
IV. 1. 4. 3. 1. Interleucina-2	66
IV. 1. 5. Fluorocromos	66
IV. 1. 5. 1. Monoclorobimano	66
IV. 1. 5. 2. O-ftaldehído	67
IV. 1. 5. 3. Sulforrodamina-101	67
IV. 1. 5. 4. Ficoeritrina-Cianina7	68
IV. 1. 6. XTT	68
IV. 1. 7. Quantikine®	68
IV. 1. 8. Citofluorímetros	68
IV. 1. 8. 1. Fluorímetro de barrido de placa	68
IV. 1. 8. 2. Citómetro de flujo	69
IV. 1. 9. Lector automático de microplacas	70
IV. 1. 10. Material para la determinación de los parámetros sanguíneos y el aislamiento de las PBMCs	70
IV. 2. Métodos	72
IV. 2. 1. Cultivos celulares	72
IV. 2. 1. 1. Mantenimiento de las células del melanoma murino B16F10, melanoma humano A375 y PBMCs humanas	72

IV. 2. 1. 2. Siembra de las suspensiones celulares en placas	72
IV. 2. 2. Extracción de las PBMCs murinas y humanas de sangre periférica	73
IV. 2. 3. Determinación de los niveles intracelulares de glutatión	75
IV. 2. 3. 1. Análisis del contenido intracelular de GSH en las células del melanoma B16F10	75
IV. 2. 3. 2. Análisis del contenido intracelular de GSH y cantidad de proteína en las células A375	75
IV. 2. 3. 2. 1. Valoración del contenido de GSH	75
IV. 2. 3. 2. 2. Valoración de la proteína celular	76
IV. 2. 3. 3. Análisis del contenido intracelular de GSH en las PBMCs ..	77
IV. 2. 4. Determinación de la proliferación celular	77
IV. 2. 4. 1. Determinación de la proliferación de las células del melanoma	77
IV. 2. 4. 2. Determinación de la proliferación de las PBMCs	78
IV. 2. 5. Determinación del IL-2R α en células A375 y PBMCs por citometría de flujo	78
IV. 2. 6. Determinación del consumo / secreción de la IL-2 en las células A375	79
IV. 2. 7. Protocolo quirúrgico para la inducción de metástasis experimentales hepáticas del melanoma B16F10	79
IV. 2. 7. 1. Preparación de las suspensiones celulares para su inoculación en los animales	79
IV. 2. 7. 2. Inoculación intraesplénica de las células tumorales	80
IV. 2. 7. 3. Esplenectomía	80
IV. 2. 8. Administración de los fármacos	81
IV. 2. 9. Evaluación de la supervivencia, toxicidad e índice actividad / toxicidad	81

IV. 3. 2. Estudios <i>in vivo</i>	87
IV. 3. 2. 1. Estudio de la supervivencia y toxicidad de los ratones tratados con OTZ de forma inmediata tras la inoculación intraesplénica de las células del melanoma B16F10	88
IV. 3. 2. 2. Estudio del efecto del OTZ y BSO sobre los niveles de GSH de las PBMCs de ratón. Influencia de estos moduladores sobre la citotoxicidad inducida por dosis letales de CY	89
IV. 3. 2. 3. Estudio de la supervivencia y toxicidad de los ratones con metástasis hepáticas del melanoma B16F10 tratados con IL-2 sola y en combinación con OTZ	90
IV. 3. 2. 4. Estudio de la supervivencia y toxicidad de los ratones con metástasis hepáticas del melanoma B16F10, tratados con dosis altas de CY sola y en combinación con BSO y OTZ	92
IV. 3. 2. 5. Estudio del efecto de la adición de OTZ sobre el tratamiento bioquimioterápico con intensificación de dosis de CY e IL-2: análisis de la supervivencia y toxicidad de los ratones con metástasis hepáticas del melanoma B16F10	94
IV. 4. Análisis estadísticos	96
IV. 4. 1. Media aritmética y desviación estándar	96
IV. 4. 2. Nivel de significación	97
IV. 4. 3. Comparación de medias: prueba t de Student	97
IV. 4. 4. Análisis de la varianza	97
IV. 4. 5. Correlación y regresión	98
IV. 4. 5. 1. Correlación simple y regresión lineal	98
IV. 4. 5. 2. Regresión cuadrática	99
IV. 4. 6. Análisis de la supervivencia	99
IV. 4. 6. 1. Curvas de supervivencia: método de Kaplan-Meier	99
IV. 4. 6. 2. Comparación de curvas de supervivencia: Test Log-Rank	100

V. RESULTADOS	101
V. 1. RESULTADOS <i>IN VITRO</i>	103
V. 1. 1. Estudio del efecto del NAC, BSO y OTZ sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma B16F10	105
V. 1. 1. 1. Efecto del NAC sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma B16F10	105
V. 1. 1. 2. Efecto del BSO sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma B16F10	107
V. 1. 1. 3. Efecto del OTZ sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma B16F10 y A375	109
V. 1. 2. Estudio del efecto de la acroleína (AC) sola y en combinación con NAC, BSO y OTZ sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma	112
V. 1. 2. 1. Efecto de la AC y NAC + AC sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma B16F10	112
V. 1. 2. 2. Efecto de la AC y BSO + AC sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma B16F10	114
V. 1. 2. 3. Efecto de la AC y OTZ + AC sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma B16F10 y A375	116
V. 1. 3. Determinación de la expresión del IL-2Rα en las células A375 y PBMCs	119
V. 1. 4. Estudio del efecto de la IL-2 sola y en combinación con OTZ sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma B16F10, A375 y PBMCs humanas	120
V. 1. 5. Estudio del efecto de la IL-2 sola y en combinación con OTZ sobre la expresión del IL-2Rα de las células del melanoma A375 y PBMCs humanas	125
V. 1. 6. Estudio del efecto de la IL-2 sola y en combinación con OTZ sobre el consumo / secreción de IL-2 en las células del melanoma humano A375	127

V. 2. RESULTADOS <i>IN VIVO</i>	129
V. 2. 1. Estudio de la supervivencia y toxicidad de los ratones tratados con OTZ de forma inmediata tras la inoculación intraesplénica de las células del melanoma B16F10	131
V. 2. 1. 1. Estudio de la supervivencia	131
V. 2. 1. 2. Estudio de la toxicidad	132
V. 2. 2. Estudio del efecto del OTZ y BSO sobre los niveles de GSH de las PBMCs de ratón. Influencia de estos moduladores sobre la citotoxicidad inducida por dosis letales de CY	135
V. 2. 3. Estudio de la supervivencia y toxicidad de los ratones con metástasis hepáticas del melanoma B16F10 tratados con IL-2 sola y en combinación con OTZ	138
V. 2. 3. 1. Estudio de la supervivencia	138
V. 2. 3. 2. Estudio de la toxicidad	139
V. 2. 4. Estudio de la supervivencia y toxicidad de los ratones con metástasis hepáticas del melanoma B16F10 tratados con dosis altas de CY sola y en combinación con BSO y OTZ	143
V. 2. 4. 1. Estudio de la supervivencia	143
V. 2. 4. 2. Estudio de la toxicidad	144
V. 2. 5. Estudio del efecto de la adición de OTZ sobre el tratamiento bioquimioterápico con intensificación de dosis de CY e IL-2: análisis de la supervivencia y toxicidad de los ratones con metástasis hepáticas del melanoma B16F10	147
V. 2. 5. 1. Estudio de la supervivencia	147
V. 2. 5. 2. Estudio de la toxicidad	149
VI. DISCUSIÓN	155
VII. CONCLUSIONES	183
VIII. BIBLIOGRAFÍA	187

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la cascada metastática	27
Figura 2. Estructura del glutatión (γ -glutamilcisteinilglicina, GSH)	33
Figura 3. Proceso de oxidación-reducción del glutatión	34
Figura 4. Ciclo del γ -glutamilo	35
Figura 5. Función detoxificadora del GSH	37
Figura 6. Estructura de la N-acetilcisteína (NAC)	45
Figura 7. Metabolismo del L-2-oxo-4-tiazolidina carboxilato (OTZ) y de la 5-oxo-L-prolina mediante la 5-OPasa	46
Figura 8. Inhibición de la γ -Glutamilcisteína sintetasa mediante la L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO)	48
Figura 9. Ratones singénicos de la cepa C57BL/6	61
Figura 10. Células del melanoma murino B16F10 (A) y melanoma humano A375 (B)	62
Figura 11. Marcaje del GSH intracelular con mBCl en las células B16F10 (A) y PBMCs humanas (B) visualizado mediante microscopía de fluorescencia	66
Figura 12. Marcaje de las proteínas con S-101 en las células B16F10 visualizado mediante microscopía de fluorescencia	67
Figura 13. Fluorímetro de barrido de placa	69
Figura 14. Citómetro de flujo Coulter EPICS 752 (A) y FACSCalibur (B)	69
Figura 15. Lector automático de microplacas	70
Figura 16. Inoculación intraesplénica de las células B16F10 en ratones C57BL/6	80

Figura 17. Esquema del tratamiento con OTZ administrado de forma diaria tras la inoculación tumoral	88
Figura 18. Esquema de la pauta de administración con IL-2 (A), OTZ (pc, B), OTZ (pd, C), OTZ (pc) + IL-2 (D) y OTZ (pd) + IL-2 (E)	91
Figura 19. Esquema de la pauta de administración con CY (A), OTZ (pd, B), BSO (C), OTZ (pd) + CY (D) y BSO + CY (E)	93
Figura 20. Esquema de la pauta de administración del OTZ + IL-2 en combinación con la CY	95
Figura 21. Efecto del NAC sobre los niveles intracelulares de GSH (A) y proliferación (B) de las células del melanoma B16F10	106
Figura 22. Efecto del BSO sobre los niveles intracelulares de GSH (A) y proliferación (B) de las células del melanoma B16F10	108
Figura 23. Efecto del OTZ sobre los niveles intracelulares de GSH (A) y proliferación (B) de las células del melanoma B16F10	110
Figura 24. Efecto del OTZ sobre los niveles intracelulares de GSH (A) y proliferación (B) de las células del melanoma A375	111
Figura 25. Efecto del NAC sobre la acción de la AC en los niveles intracelulares de GSH (A) y proliferación (B) de las células del melanoma B16F10 ..	113
Figura 26. Efecto del BSO sobre la acción de la AC en los niveles intracelulares de GSH (A) y proliferación (B) de las células del melanoma B16F10 ..	115
Figura 27. Efecto del OTZ sobre la acción de la AC en los niveles intracelulares de GSH (A) y proliferación (B) de las células del melanoma B16F10 ..	117
Figura 28. Efecto del OTZ sobre la acción de la AC en los niveles intracelulares de GSH (A) y proliferación (B) de las células del melanoma A375	118
Figura 29. Expresión del IL-2R α en las células A375 (A) y PBMCs (B) a las 24 h	119
Figura 30. Efecto del OTZ e IL-2 sobre los niveles intracelulares de GSH de las células del melanoma B16F10 y A375	121

Figura 31. Efecto del OTZ e IL-2 sobre la proliferación de las células del melanoma B16F10 (A) y A375 (B)	122
Figura 32. Efecto del OTZ, IL-2 y OTZ + IL-2 sobre los niveles de GSH (A) y la proliferación (B) de las PBMCs estimulados con PHA-M	124
Figura 33. Efecto de la IL-2 y OTZ + IL-2 sobre el IL-2R α de las células del melanoma A375 (A) y PBMCs (B)	126
Figura 34. Efecto de la IL-2 y OTZ + IL-2 sobre el consumo / secreción de la IL-2 en las células del melanoma A375	128
Figura 35. Niveles de GSH de las PBMCs de los animales tratados con OTZ (A) y BSO (B)	136
Figura 36. Niveles de GSH de las PBMCs de los animales tratados con CY 500 mg/kg y CY + OTZ	137
Figura 37. Índice actividad / toxicidad (IAT) de los tratamientos con IL-2, OTZ (pc), OTZ (pd), OTZ (pc) + IL-2 y OTZ (pd) + IL-2. Valores de IAT mayores de 1 indican un beneficio terapéutico	142
Figura 38. Índice actividad / toxicidad (IAT) de los tratamientos con CY, CY + IL-2, CY + OTZ y CY + OTZ + IL-2. Valores de IAT mayores de 1 indican un beneficio terapéutico	154
Figura 39. Metabolismo de la CY	159
Figura 40. Interleucina-2 (IL-2) y su receptor (IL-2R)	161
Figura 41. Estado de oxidación-reducción celular necesario para la activación del NF- κ B	165

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tasa de mortalidad (número de defunciones/100.000 habitantes) por melanoma en algunos países del mundo. Datos pertenecientes al año 2002 obtenidos de la International Association of Cancer Registries, IACR	10
Tabla 2. Porcentaje de respuestas y supervivencia media en distintos estudios con pacientes tratados con DTIC en el melanoma metastático	14
Tabla 3. Porcentaje de respuestas y supervivencia media en distintos estudios con pacientes tratados con la combinación BOLD, CVD y CBDT en el melanoma metastático	16
Tabla 4. Porcentaje de respuestas de distintos estudios con pacientes tratados con IFN- α en el melanoma metastático	18
Tabla 5. Porcentaje de respuestas de distintos estudios con pacientes tratados con dosis altas de IL-2 en el melanoma metastático	19
Tabla 6. Porcentaje de respuestas de distintos estudios con pacientes tratados con IL-2 en el melanoma metastático	21
Tabla 7. Porcentaje de respuestas de distintos estudios con pacientes tratados con IL-2 + IFN- α en el melanoma metastático	22
Tabla 8. Porcentaje de respuestas y supervivencia media de los pacientes tratados con IFN- α en combinación con mono y poliquimioterapia en el melanoma metastático	23
Tabla 9. Porcentaje de respuestas y supervivencia media de los pacientes tratados con IL-2 en combinación con mono y poliquimioterapia en el melanoma metastático	24
Tabla 10. Porcentaje de respuestas y supervivencia media de los pacientes tratados con bioquimioterapia en el melanoma metastático	26

Tabla 11. Supervivencia de los animales control y tratados con distintas dosis de OTZ desde el día 0 hasta el día 8 postinoculación tumoral	132
Tabla 12. Modificación del peso de los animales tratados con OTZ desde el día 0 hasta el día 8 postinoculación tumoral	133
Tabla 13. Parámetros hematológicos de los animales control y tratados con OTZ desde el día 0 hasta el día 8 postinoculación tumoral	134
Tabla 14. Supervivencia de los animales control, tratados con IL-2 sola y en combinación con las distintas pautas de OTZ	139
Tabla 15. Modificación del peso de los animales tratados con IL-2 sola y en combinación con OTZ	140
Tabla 16. Parámetros hematológicos de los animales control, tratados con IL-2 sola y en combinación con OTZ	141
Tabla 17. Supervivencia de los animales tratados con CY sola y en combinación con BSO y OTZ	144
Tabla 18. Modificación del peso de los animales control, tratados con CY sola y en combinación con BSO y OTZ	145
Tabla 19. Parámetros hematológicos de los animales control, tratados con CY sola y en combinación con BSO y OTZ	146
Tabla 20. Supervivencia de los animales tratados con CY sola y en combinación con IL-2, OTZ y OTZ + IL-2	148
Tabla 21. Modificación del peso de los animales tratados con dosis bajas de CY (50 mg/kg) sola y en combinación con IL-2, OTZ y OTZ + IL-2 ...	149
Tabla 22. Modificación del peso de los animales tratados con dosis altas de CY (250 mg/kg) sola y en combinación con IL-2, OTZ y OTZ + IL-2 ...	150
Tabla 23. Modificación del peso de los animales tratados con dosis letales de CY (500 mg/kg) sola y en combinación con IL-2, OTZ y OTZ + IL-2 ...	151
Tabla 24. Parámetros hematológicos de los animales tratados con dosis bajas de CY (50 mg/kg) sola y en combinación con IL-2, OTZ y OTZ + IL-2 ...	152

Tabla 25. Parámetros hematológicos de los animales tratados con dosis altas de CY (250 mg/kg) sola y en combinación con IL-2, OTZ y OTZ + IL-2 ... 153

Tabla 26. Parámetros hematológicos de los animales tratados con dosis letales de CY (500 mg/kg) sola y en combinación con IL-2, OTZ y OTZ + IL-2 ... 153

ABREVIATURAS

AC: Acroleína

AMF: Factor de movilidad autocrina

ARDS: Síndrome distrés respiratorio

BOLD: Bleomicina, vincristina, lomustina, dacarbazina

BSA: Albúmina sérica bovina

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

CBDT: Cisplatino, carmustina, dacarbazina, tamoxifeno

CD25: Receptor α de la IL-2

CDDP: Cisplatino

CDK4: Ciclina dependiente de quinasa 4

CDKN2A: Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2

CVD: Cisplatino, vinblastina, dacarbazina

CY: Ciclofosfamida

Cys: Cisteína

DG: Diacilglicerol

DMEM: Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco

DTIC: Dacarbazina

E-cadherina: Cadherina epitelial

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EORTC: European Organization for Research and Treatment of Cancer

EPO: Eritropoyetina

EtMSO: Etil metionina sulfoximina

FDA: Food and Drug Administration

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

FMD: Factor modificador de dosis

G-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos

Glu: Glutamato

γ -GCS: γ -glutamylcisteína sintetasa

γ -GT: γ -glutamyltranspeptidasa

Gly: Glicina

GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos

GSH: Glutathión reducido, γ -glutamylcisteinilglicina

GSSG: Glutathión oxidado

GST: Glutathión S-transferasa

HBSS: Solución salina equilibrada de Hanks

IAT: Índice actividad / toxicidad

ic: Infusión continua

ICAM-1: Molécula de adhesión intracelular-1

IFN: Interferón

IL: Interleucina

IL-2R α : Receptor α de la IL-2

IMF: Intensidad media de fluorescencia

InsP3: Inositol trifosfato

IS: Incremento de la supervivencia

iv: Intravenosa

LAK: Células citocidas activadas por linfocinas

LTS: Largo tiempo de supervivencia

mBCI: Monoclorobimano

Mel-CAM/MUC18: Molécula de adhesión del melanoma

MGSA/GRO: Factor estimulador del crecimiento del melanoma

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

MIA: Actividad inhibitoria del melanoma

MMPs: Metaloproteinasas de matriz

MPA: Modificación del peso del animal

MPP: Máxima pérdida de peso del animal

mROS: Metabolitos reactivos del oxígeno

MSH: Hormona estimuladora de los melanocitos

MSO: Metionina sulfoximina

NAC: N-acetilcisteína

N-cadherina: Cadherina neural

NF- κ B: Factor nuclear κ B

NK: Células citocidas naturales

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

pc: Pauta continua

pd: Pauta discontinua

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PE-Cy7: Ficoeritrina-Cianina7

PHA-M: Fitohemaglutinina-M

PKC: Proteína quinasa C

PVB: Cisplatino, vinblastina, bleomicina

S-101: Sulforrodamina-101

SBF: Suero bovino fetal

sc: Subcutánea

TAA: Factor angiogénico tumoral

TCA: Ácido tricloroacético

TGF: Factor de crecimiento transformante

TILs: Linfocitos de infiltración tumoral cultivados en presencia de IL-2

TM: Tamoxifeno

TMZ: Temozolomida

TNF: Factor de necrosis tumoral

UA: Unidades arbitrarias

UCDEN: Enzima degradador de conjugados de ubiquinina

UI: Unidades Internacionales

uPA: Activador del plasminógeno tipo urocinasa

uPAR: Receptor de membrana del activador del plasminógeno tipo urocinasa

VCAM-1: Molécula de adhesión vascular 1

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

I. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El melanoma es en la actualidad un importante problema sanitario por dos razones principales. En primer lugar, por ser uno de los tumores que ha experimentado un mayor incremento en su incidencia en las últimas décadas, lo cual adquiere especial relevancia dado el aumento del diagnóstico de esta patología en adultos jóvenes. En segundo lugar, por ser uno de los tumores más agresivos cuando la enfermedad se ha diseminado a distancia (melanoma metastático), con una media de supervivencia de sólo 6 meses.

Los dos únicos fármacos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento de los pacientes con enfermedad diseminada (estadio IV) son el agente alquilante dacarbazina (DTIC; aprobado en 1979) y el agente estimulador de la respuesta inmune celular interleucina 2 (IL-2; aprobado en 1998). Ambos agentes antitumorales producen una tasa media de respuestas globales del 15-25%, siendo dichas respuestas en el 1-2% con DTIC, y del 4-7% con dosis altas de IL-2. Sin embargo, ésta última da lugar a una toxicidad severa que puede llegar incluso a ocasionar la muerte en el 1-2% de los pacientes, con el agravante de no existir diferencias significativas en la media de supervivencia de los pacientes sometidos a uno u otro tratamiento –5 a 10 meses–.

Todas las aproximaciones terapéuticas para la mejora de la respuesta antitumoral se han fundamentado en la adición de otras drogas antitumorales bien a la DTIC (tratamientos poliquimioterápicos, en particular con cisplatino, vinblastina y tamoxifeno), bien a la IL-2 (combinaciones inmunoterápicas, sobre todo con interferón alfa, IFN- α). Si bien dichas combinaciones terapéuticas consiguen incrementar la tasa de repuestas globales hasta el 20-40%, no producen ninguna mejoría en la supervivencia, aumentando, sin embargo, notablemente la toxicidad. Con la finalidad de sumar los diferentes mecanismos de actuación antitumoral de la quimioterapia y de la inmunoterapia (quimio-inmunoterapia, también denominada bioquimioterapia), desde los años 90 hasta la actualidad, se han llevado a cabo múltiples ensayos clínicos, centrados en la combinación DTIC e IL-2 solos y conjunción con otros agentes citostáticos e IFN- α , en la búsqueda de un nuevo estándar terapéutico para el melanoma metastático.

I. Justificación del estudio

A pesar de las grandes expectativas iniciales auguradas por una gran diversidad de dichos ensayos clínicos, basadas en un aumento significativo en el número de respuestas globales (hasta el 62%), estudios randomizados recientes concluyen que la bioquimioterapia con IL-2 no puede ser considerado como estándar de tratamiento, dado que no produce ninguna ventaja estadística en términos de supervivencia y sí, en cambio, un aumento significativo en la incidencia de efectos secundarios severos. Aún más, no sólo no produce ningún beneficio terapéutico, sino que existen estudios señalando una tendencia a disminuir la supervivencia mediante la adición de IL-2 al tratamiento quimioterápico. Todo esto ha cuestionado la utilización de la IL-2 como agente terapéutico en el tratamiento del melanoma metastático.

En este sentido, diferentes estudios publicados desde 1992 han señalado el efecto dual de la IL-2, estimulando, simultáneamente, a las células del sistema inmune y a las propias células del melanoma. Se ha demostrado, asimismo, que tanto el efecto protumoral como el propio estímulo linfocitario están precedidos por un aumento de los niveles intracelulares de glutatión reducido (GSH).

El GSH es un tripéptido tiol que resulta fundamental para la existencia de un adecuado estado redox intracelular y, por tal motivo, participa en múltiples funciones biológicas fundamentales, entre las que se incluyen, la actividad de diferentes citocinas, la actividad enzimática, la síntesis del ADN, proliferación celular, procesos de detoxificación de metabolitos activos del oxígeno y diferentes xenobióticos, y en el caso particular de los melanocitos, en la síntesis de melanina. Esto hace del GSH una sustancia biológica esencial en el particular metabolismo del melanoma. De hecho, se ha observado que las células del melanoma presentan niveles elevados de GSH, lo que les permite aumentar su capacidad tumorigénica y presentar fenómenos de drogorresistencia. Por el contrario, la reducción farmacológica del contenido intracelular de GSH en estas células tumorales aumenta significativamente su sensibilidad a los agentes alquilantes.

Teniendo en cuenta que la IL-2 es una molécula clave de la respuesta inmune antitumoral, la potencialidad terapéutica de esta citocina no debiera ser rechazada, sino, por el contrario, podría verse incrementada considerablemente si su actividad biológica se realizara de forma selectiva sobre las células del sistema inmune, anulando simultáneamente su efecto protumoral. Dada la importancia de los niveles de GSH en la actividad de las citocinas, es lógico considerar que dicho efecto selectivo podría ser obtenido previa biomodulación farmacológica, también selectiva, de los niveles de GSH.

Por otro lado, conocida la implicación de dicho tripéptido en los procesos de detoxificación celular, una biomodulación selectiva de los niveles de GSH como estrategia terapéutica, cuyo objetivo sería disminuir su contenido en las células del melanoma –incrementando así su sensibilidad a los agentes antitumorales–, y aumentarlo simultáneamente en las células inmunes y otras células sanas –protegiéndolas contra la toxicidad inducida por la quimioterapia–, permitiría llevar a cabo una intensificación de la dosis de quimioterapia.

Ambos efectos derivados de la biomodulación selectiva de los niveles intracelulares de GSH, la reversión del efecto protumoral de la IL-2 y la intensificación de dosis quimioterápica, permitirían en última instancia obtener un beneficio terapéutico del tan ansiado tratamiento bioquimioterápico del melanoma metastático.

Este es el objetivo fundamental de este estudio de investigación básica, que pretende tenga su extrapolación clínica en un futuro próximo, para beneficio de los pacientes con melanoma metastático, que les permita aumentar su supervivencia. Este sería nuestro mayor deseo.

II. INTRODUCCIÓN

II. 1. EPIDEMIOLOGÍA, ETIOLOGÍA Y EVOLUCIÓN DEL MELANOMA MALIGNO

El melanoma maligno es una de las neoplasias más agresivas existentes en la actualidad. De hecho, desde que John Hunter describiera en 1787 el primer caso de metástasis en los nódulos linfáticos de un paciente varón de 35 años (International Academy of Patology News, 2002), el melanoma sigue siendo el mayor desafío de las neoplasias cutáneas, particularmente el tratamiento del melanoma metastático (Curiel-Lewandrowski, 2000).

El melanoma maligno es uno de los cánceres cuya incidencia se ha incrementado de forma más importante en las tres últimas décadas en los diferentes países del mundo. Así, por ejemplo, en Estados Unidos la incidencia se incrementa un 4-6% anualmente (Hall, 2003), siendo una causa importante de mortalidad en este país (tasa de mortalidad de 2.7 por 100.000 habitantes; Tabla 1). Por otro lado, en Europa se diagnostican cada año alrededor de 60.000 nuevos casos de melanoma maligno, representando el 1% de todos los cánceres (Ferlay, 2001). En el caso de España, en los últimos treinta años se ha producido un incremento anual medio en la incidencia del 5%. Según los datos referentes al año 2002, la incidencia fue algo superior en las mujeres (8.6 por 100.000 habitantes) que en los hombres (7.5 por 100.000 habitantes), si bien este efecto se invierte en el caso de la tasa de mortalidad, que fue del 1.6 y 2.0 por 100.000 habitantes, respectivamente, produciéndose en dicho año un total de 709 fallecimientos (International Association of Cancer Registries, 2002).

La etiología del melanoma maligno es multifacética y compleja. Ciertos factores fenotípicos parecen estar asociados con una mayor susceptibilidad individual a padecer un melanoma, como son las personas de pelo rubio y tez clara. Por otro lado, los individuos con un historial de múltiples episodios de quemaduras solares durante la infancia o que presentan un gran número de nevos comunes o nevos displásicos, poseen un mayor riesgo de desarrollar melanoma maligno (Briollais, 2000; Thompson, 2005).

II. Introducción

Tabla 1. Tasa de mortalidad (número de defunciones/100.000 habitantes) por melanoma en algunos países del mundo. Datos pertenecientes al año 2002 obtenidos de la International Association of Cancer Registries, IACR.

País	Mujeres	Hombres
Estados Unidos	2.0	3.4
Canadá	1.8	2.9
México	0.4	0.5
Cuba	0.5	0.7
Argentina	0.7	1.2
Chile	0.9	1.0
Brasil	0.6	0.8
Nicaragua	0.3	0.2
Kenia	0.7	0.3
Angola	1.0	0.9
Marruecos	0.3	0.2
Sudáfrica	1.9	2.0
China	0.1	0.1
Japón	0.3	0.4
Israel	1.9	2.5
Australia	3.9	7.0
Nueva Zelanda	5.1	8.1
Dinamarca	3.6	4.9
Suecia	3.0	5.1
Inglaterra	2.7	3.0
Italia	2.2	2.7
Portugal	1.5	1.7
España	1.6	2.0

De acuerdo con los datos publicados, existe una relación evidente entre el riesgo de padecer un melanoma y la exposición al sol. De hecho, el hábito actual a una exposición intensa e intermitente a la luz solar, ha dado lugar a la circunstancia de que el diagnóstico del melanoma se produzca en pacientes con una media de edad relativamente menor –alrededor de 40 años– con respecto de otras neoplasias malignas (Beitner, 2001; Masci, 2002). En este sentido, la luz solar podría actuar como un promotor de las lesiones melanocíticas preexistentes genéticamente transmitidas como los nevos displásicos. Dentro de la luz solar, la radiación ultravioleta (UV; 200-400 nm) es considerada el factor exógeno más importante, en particular la radiación UV-B (280-320 nm; De Fabo, 2004). Los rayos UV pueden provocar numerosos efectos celulares, destacando la inhibición de la división celular, inactivación enzimática e inducción de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores (Masci, 2002; Thompson, 2005).

La evolución del melanoma puede ser imprevisible, variando desde la regresión espontánea (Cox, 1994) hasta la rápida progresión a ganglios linfáticos regionales o a órganos a distancia (O'Day, 2002). Son numerosos los factores que han sido relacionados con el pronóstico del melanoma maligno. Entre dichos factores cabe destacar, entre otros, el estadio de la enfermedad, la profundidad de la lesión, la presencia de ulceración, el índice mitótico, la localización regional, el volumen tumoral y el nivel de la enzima lactato deshidrogenasa en el suero de los pacientes (Manola, 2000; Balch, 2001).

Entre los factores anteriormente mencionados, el estadio de la enfermedad es el factor pronóstico más importante. La supervivencia a los diez años en los estadios localizados (estadio 0, I y II) es superior al 80% en la mayoría de los casos. Cuando existe afectación ganglionar (estadio III) no suele superar al 40% y cuando hay metástasis a distancia (estadio IV) es del 0% (Ordóñez, 2001; Balch, 2001). En este sentido, los pacientes con melanoma avanzado presentan una media de supervivencia muy pobre, que oscila entre los 3 y 9 meses (O'Day, 2002; Atallah, 2005).

II. Introducción

El comité de la asociación americana para el sistema de estadios en el melanoma cutáneo (American Joint Committee on Cancer Staging System for Cutaneous Melanoma, AJCC) otorga también gran importancia a la profundidad (índice de Breslow) y a la existencia o no de ulceración. El grado de profundidad se ha relacionado de forma directa con la afectación ganglionar y con la probabilidad de metástasis a distancia. Es evidente que la posibilidad de ulceración aumenta con la profundidad, sin embargo, la mayoría de los análisis reconocen que la ulceración tiene valor pronóstico por sí mismo (Buzaid, 1997; Balch, 2001).

En relación al índice mitótico –número de mitosis/mm²–, se ha descrito como pronóstico desfavorable cuando dicho índice es mayor a 6 mitosis/mm² (Johnson, 1995; Slominski, 2001).

Finalmente, en lo que se refiere al valor pronóstico de la localización anatómica del melanoma, se ha observado que las lesiones localizadas en una extremidad, en la cabeza o en el cuello, tiene un valor pronóstico más favorable que las localizadas en el tronco (Masback, 2001; Masci, 2002). Por otro lado, en cuanto a la localización metastásica, son los pacientes afectados con metástasis cerebrales, óseas y hepáticas los que poseen una menor esperanza de vida (Atzpodien, 2002).

II. 2. TRATAMIENTO DEL MELANOMA METASTÁTICO

En la actualidad, la única opción terapéutica curativa continúa siendo la resección quirúrgica cuando ésta se lleva a cabo en los estadios iniciales. A pesar de que hoy en día el diagnóstico de esta patología se realiza en estadios más precoces, la diseminación a distancia del melanoma maligno tiene lugar en aproximadamente el 20% de los casos, siendo la responsable de que la mortalidad sea significativa y que el tratamiento de la enfermedad avanzada constituya una situación clínica no excepcional (Massuti, 2001; Buzaid, 2002).

Desde hace aproximadamente dos décadas, se están llevando a cabo ensayos clínicos en el melanoma metastático para la evaluación de nuevos tratamientos sistémicos, quimio e inmunoterápicos, fundamentados en un mejor conocimiento de la biología del tumor, así como en potenciar el estímulo de la respuesta del huésped frente al mismo (Adrover, 2001). A continuación, se analizan los principales avances terapéuticos producidos en los últimos años.

II. 2. 1. QUIMIOTERAPIA

A pesar de la introducción de nuevas alternativas terapéuticas, la quimioterapia sigue siendo el tratamiento estándar en la práctica clínica para el melanoma metastático. Las drogas que han resultado efectivas en el tratamiento del melanoma son la dacarbazina (DTIC), cisplatino (CDDP), derivados de las nitrosoureas (carmustina, lomustina y fotemustina), los alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina y vindesina), los taxanos (paclitaxel y docetaxel) y la temozolomida. El tratamiento monoquimioterápico con estos agentes produce un rango de respuestas que se sitúan entre el 10-25%, con menos del 5% de remisiones completas (O'Day, 2002; Queirolo, 2005; Atallah, 2005).

El agente alquilante DTIC (dimetil-1-triazenoimidazole-4-carboxamida) está considerado por la FDA como la droga más activa y el único agente quimioterápico realmente reconocido para el tratamiento de esta enfermedad (Serrone, 2000; O'Day, 2002). La respuesta a este fármaco depende de la localización del tumor, y así, en pacientes con melanoma localizado en la piel, tejido subcutáneo y nódulos linfáticos se produce un número de respuestas del 25-35%; en el caso de pacientes con metástasis pulmonares sólo es del 15%, siendo más baja aún la respuesta en pacientes con metástasis cerebrales, medulares y hepáticas -5-10%- (Chowdhury, 1999). Sin embargo, la duración de las respuestas producidas por el tratamiento con DTIC es corta y sólo en el 1-2% de los pacientes se observa respuestas completas de larga duración, con una media de supervivencia de 5-10 meses (Green, 1998; Huncharek, 2001; Tsao, 2004) [Tabla 2].

II. Introducción

Por otro lado, el tratamiento con este agente alquilante produce una serie de efectos tóxicos, como náuseas, vómitos, diarreas, alopecia, daño hepático y sobre todo neutropenia y trombopenia moderadas (Bajetta, 1994; Klimek, 2000; Young, 2001).

Tabla 2. Porcentaje de respuestas y supervivencia media en distintos estudios con pacientes tratados con DTIC en el melanoma metastático.

Estudio	Respuestas (%)	Media de supervivencia (meses)
Falkson 1991	20	9.6
Cocconi 1992	12	7.3
Thomson 1993	17	7.8
Falkson 1998	15	9.9
Chapman 1999	10.2	6.4
Middleton 2000	12.1	5.7

La temozolomida (TMZ) es un nuevo agente alquilante de administración oral, desarrollada como alternativa al DTIC (Stevens, 1984). Ambos agentes son convertidos en el mismo compuesto activo (monometil triazenoimidazol carboxamida), sin embargo, la DTIC precisa ser metabolizada previamente en el hígado, mientras que la TMZ es capaz de penetrar en el sistema nervioso central donde se hidroliza espontáneamente en dicho metabolito activo (Newlands, 1997; Agarwala, 2000).

Diversos estudios sugieren que la TMZ presenta un amplio espectro de actividad antitumoral, y actualmente se está evaluando su eficacia en una gran variedad de tumores como gliomas y metástasis cerebrales de diversas neoplasias como las producidas por el melanoma, entre otros (Yung, 2001).

Entre las ventajas asociadas a esta sustancia, cabe destacar su absorción por vía oral y producir una toxicidad moderada consistente en náuseas, vómitos, neutropenia y trombocitopenia (Gajewski, 2004). Los estudios comparativos de la eficacia de los tratamientos con DTIC y TMZ, han demostrado que este último es tan efectivo como la DTIC, produciendo un grado de respuestas similar –15-20%– (Bleehen, 1995; Middleton, 2000; O'Day, 2002). Debido a su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, nuevas estrategias terapéuticas están introduciendo este fármaco en el tratamiento del melanoma metastático en combinación con otros agentes que han demostrado eficacia para su tratamiento (Agarwala, 2000; de Gast, 2003).

Los intentos de mejorar los limitados resultados de la monoquimioterapia en el melanoma diseminado, han determinado la utilización de múltiples ensayos clínicos con diferentes esquemas terapéuticos combinando diversos fármacos. Los regímenes poliquimioterápicos que no incluyen la DTIC no han supuesto ninguna ventaja desde el punto de vista de la respuesta antitumoral sobre la monoquimioterapia. Este es el caso del regimen PVB (cisplatino, vinblastina, bleomicina) con el que Luikart y cols. (1984) obtuvieron un porcentaje de respuesta (10%) inferior al producido por la DTIC sola (14%).

Entre las estrategias poliquimioterápicas que incluyen la DTIC, cabe destacar el regimen BOLD (bleomicina, vincristina, lomustina, dacarbazina), el regimen Dartmouth o CBDT (cisplatino, carmustina, dacarbazina, tamoxifeno), y el regimen CVD (cisplatino, vinblastina, dacarbazina), entre otros, que han demostrado un rango de respuestas global entre 4-45% y un rango de supervivencia de 4.5-13 meses [Tabla 3].

En general, según estudios de metaanálisis llevados a cabo sobre ensayos randomizados, el tratamiento poliquimioterápico parece estar asociado con un 23% de incremento de la respuesta antitumoral en comparación con la monoquimioterapia con DTIC, pero no demuestra diferencias significativas en la media de supervivencia (Serrone, 2000; Atzpodien, 2002; Atallah, 2005).

II. Introducción

A esto hay que añadir el hecho del importante incremento de los efectos secundarios, sobre todo la toxicidad hematológica, que produce la combinación de diferentes drogas, con la consecuente disminución de la calidad de vida de los pacientes y el aumento considerable del gasto en atención sanitaria que ello supone (Serrone, 2000; Huncharek, 2001).

Tabla 3. Porcentaje de respuestas y supervivencia media en distintos estudios con pacientes tratados con la combinación BOLD, CBDT y CVD en el melanoma metastático.

Estudio	Regimen	Respuestas (%)	Media de supervivencia (meses)
Young 1985	BOLD	45	10.0
York 1988	BOLD	22	6.0
Franco 1989	BOLD	4	4.5
Stables 1992	BOLD	41	9.5
Falkson 1998	CBDT	19	8.0
Chapman 1999	CBDT	18.5	7.7
Middleton 2000	CBDT	26.4	6.7
Atzpodien 2002	CBDT	29.9	13.0
Verschraegen 1988	CVD	24	4.5
Legha 1989	CVD	40	9.0
Jungnelius 1998	CVD	31	6.5
Eton 2002	CVD	25	9.2
Del Vecchio 2003	CVD	21	12.0
Atkins 2003	CVD	11.4	8.7

II. 2. 2. INMUNOTERAPIA

El melanoma metastático es una de las neoplasias en las que más frecuentemente se han ensayado diferentes estrategias inmunoterápicas. La introducción de citocinas –interferones, interleucinas y factores estimuladores de colonias–, células citocidas activadas por linfocinas (células LAK, del inglés *lymphokine-activated killer cells*), anticuerpos monoclonales y vacunas antitumorales, han abierto nuevas y prometedoras posibilidades que podrían utilizarse de forma integrada o en combinación con la quimioterapia.

Entre los agentes inmunológicos ensayados, el Interferón- α (IFN- α) y la Interleucina-2 (IL-2) son dos de las sustancias biológicas que han mostrado mayor actividad contra el melanoma maligno. En general, el efecto antitumoral obtenido del tratamiento con estos modificadores de la respuesta biológica es similar a la producida por la quimioterapia con DTIC –10-20%– (Legha, 1997; Keilholz, 1998).

Los interferones (IFNs) son un grupo de glucoproteínas descubiertos en 1957 por Isaacs y Lindenman (1957), que poseen múltiples efectos biológicos antitumorales, directos e indirectos (Agarwala, 1996; Jonasch, 2001). Existen 2 grupos principales de IFNs, los de tipo I, a los cuales pertenecen las especies α , β y ω , y los IFNs tipo II, cuyo representante es el IFN- γ . Los IFN- α y ω están producidos por los leucocitos, el IFN- β por los fibroblastos, mientras que el IFN- γ está producido, principalmente por los linfocitos T y las células citocidas naturales (NK, del inglés *natural killer*; el Kassas, 1996; Oritani, 2001). De los cuatro tipos de IFNs citados, el IFN- α parece presentar un mayor espectro inmunomodulador, aumentando el número de células NK, macrófagos y linfocitos T citotóxicos, junto con una estimulación en la secreción de otras citocinas. Además, posee la propiedad de actuar directamente sobre las propias células tumorales, induciendo su diferenciación y disminuyendo su capacidad proliferativa. Por otro lado, aumenta la expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) y de los antígenos asociados al tumor, lo que permite su mejor reconocimiento por el sistema inmune del huésped (Gray, 2002; Kirkwood, 2002).

II. Introducción

Debido a estos efectos, la FDA aprobó en 1996 su utilización como tratamiento adyuvante del melanoma metastático (Agarwala, 2000; Kirkwood, 2002).

Se han llevado a cabo diferentes estudios con dos especies de IFN- α , IFN- α 2a e IFN- α 2b, que han demostrado similares grados de actividad, con un porcentaje de respuesta media del 15% (rango del 8-27%), un tercio de las cuales fueron respuestas completas duraderas (Legha 1997; Kirkwood, 2002) [Tabla 4].

Tabla 4. Porcentaje de respuestas de distintos estudios con pacientes tratados con IFN- α en el melanoma metastático.

Estudio	Tipo de Interferón	Respuestas (%)
Hersey 1985	α 2a	11
Kirkwood 1985	α 2b	22
Creagan 1986	α 2a	22
Dorval 1986	α 2b	27
Legha 1987	α 2a	8
Sertoli 1989	α 2b	14

A pesar de que no existe una clara correlación dosis-respuesta, la dosis y la secuencia de administración parecen ser relevantes en el resultado terapéutico del IFN- α , habiéndose observado un mayor índice de respuestas mediante su administración a dosis altas de forma diaria o en días alternos (Agarwala, 1998; Kirkwood, 2000). Por otro lado, el tratamiento con este tipo de sustancias no está exento de efectos secundarios, como son náuseas, vómitos, diarreas, daño neurológico, hepatopatías, leucopenia y trombopenia, entre otros (Jonasch, 2001; Kilbridge, 2001; Kirkwood, 2002).

La IL-2 es una citocina multifuncional producida por las células T colaboradoras que poseen efectos pluripotenciales. Identificada en 1976 por Robert C. Gallo (Morgan, 1976), es la responsable de la inducción a la maduración, diferenciación y actividad lítica de las células T. Además, la IL-2 estimula la función de las células NK, induce a la actividad LAK, de los monocitos y de los macrófagos, y asimismo, estimula la secreción de otras citocinas. Toda esta función crucial de la IL-2 en la respuesta inmune antitumoral indujo, igualmente, a su aprobación por la FDA en 1998 como agente terapéutico para el melanoma metastático (Atkins, 1999; Tsao, 2004).

Diferentes estudios clínicos han permitido comprobar que la administración, en infusión intravenosa continua o en bolus, de dosis altas de IL-2 produce un grado de respuesta del 5-22%, observándose respuestas completas duraderas en el 4-7% de los pacientes tratados (Rosenberg, 1994; Atkins, 2002) [Tabla 5].

Tabla 5. Porcentaje de respuestas de distintos estudios con pacientes tratados con dosis altas de IL-2 en el melanoma metastático.

Estudio	Administración	Respuestas (%)
Parkinson 1990	bolus iv	22
Sparano 1993	bolus iv	5
Rosenberg 1994	bolus iv	17
Legha 1996	ic	22
Atkins 1999	bolus iv	16
Phan 2001	bolus iv	15.5

iv: intravenosa
ic: infusión continua

II. Introducción

Sin embargo, este tratamiento da lugar, también, a una elevada toxicidad, destacando hipotensión, oliguria/anuria, insuficiencia renal, toxicidad pulmonar, cardíaca, del sistema nervioso central, hepática y hematológica (Atkins, 2002; Schwartz, 2002; Thompson, 2005).

Con la finalidad de disminuir esta importante toxicidad, diversos autores han ensayado otras pautas de administración utilizando dosis menores de IL-2 (Mier, 2003). Algunos de estos estudios sugieren que el tratamiento continuado con dosis bajas de IL-2 es menos efectivo que la administración de dosis altas, pero significativamente menos tóxico. Sin embargo, estos datos no pueden considerarse como concluyentes y está aún por demostrar la pauta más eficaz (Chowdhury, 1999; Eton, 2000).

Con el fin de mejorar el resultado obtenido por el tratamiento con IL-2, se han llevado a cabo otros ensayos terapéuticos combinando esta interleucina con otros agentes inmunoterápicos. Este es el caso de la administración de IL-2 en conjunción con células LAK activadas por IL-2 *ex vivo* y linfocitos de infiltración tumoral cultivados en la presencia de IL-2 (TILs, del inglés *tumor-infiltrating lymphocytes*). Estos ensayos obtuvieron un rango de respuesta entre 12-31%, aunque no significativamente superior al tratamiento con IL-2 sola, observándose, además, un incremento de los efectos tóxicos (Rosenberg, 1985; Duchter, 1991; Philip, 1997) [Tabla 6].

Tabla 6. Porcentaje de respuestas de distintos estudios con pacientes tratados con IL-2 en el melanoma metastático.

Estudio	Regimen	Respuestas (%)
Rosenberg 1985	IL-2 (ic) + LAK	21
Dutcher 1989	IL-2 (ic) + LAK	19
Parkinson 1990	IL-2 (ic) + LAK	22
Dillman 1991	IL-2 (ic) + TIL	12
Rosenberg 1994	IL-2 (iv) + TIL	31
Goedegebuure 1995	IL-2 (iv) + TIL	19

ic: infusión continua
iv: intravenosa

Resultados similares se han observado en estudios con la combinación de IL-2 e IFN- α . Dicha combinación terapéutica, fundamentada en la existencia de una interacción sinérgica o aditiva entre ambos agentes (Legha, 1997; Buzaid, 2000), ha dado lugar a datos contradictorios, si bien se ha descrito un rango de respuestas de 10-33%, que en ningún caso ha demostrado ser significativamente superior al tratamiento con IL-2 sola (Keilholz, 1997; Buzaid 2000) [Tabla 7].

II. Introducción

Tabla 7. Porcentaje de respuestas de distintos estudios con pacientes tratados con IL-2 + IFN- α en el melanoma metastático.

Estudio	Tipo de Interferón	Administración IL-2	Respuestas (%)
Rosenberg 1989	$\alpha 2$	bolus iv	33
Kruit 1991	$\alpha 2a$	ic	21
Taylor 1992	γ	bolus iv	14.3
Sparano 1993	$\alpha 2a$	bolus iv	10
Marincola 1995	$\alpha 2a$	bolus iv	23
Kim 1996	γ	bolus iv	10
Keilholz 1997	$\alpha 2a$	bolus iv	18
Eton 2000	$\alpha 2a$	bolus iv	10

iv: intravenosa
ic: infusión continua

II. 2. 3. BIOQUIMIOTERAPIA

A principios de la década de los 90, con el fin de incrementar la respuesta al tratamiento quimioterápico, se establecieron numerosos protocolos clínicos basados en la combinación de agentes quimio e inmunoterápicos (principalmente con IFN- α e IL-2). Esta combinación terapéutica se fundamenta en dos principios generales, por un lado, las drogas citotóxicas y los inmunomoduladores realizan su actividad antitumoral mediante mecanismos independientes y, por otro lado, presentan una aparente ausencia de resistencia cruzada (Serrone, 2000; Buzaid, 2000).

La terapia combinada del IFN- α y DTIC ha demostrado dar lugar a un grado bajo de respuesta antitumoral (21-28%), en ningún caso superior al observado con DTIC sola. De la misma forma, la adición del IFN- α al tratamiento poliquimioterápico (BOLD, CBDT y CVD), si bien produce un mayor grado de respuestas que en el caso anterior (26-68%), éstas tampoco han demostrado ser significativamente superior ni en el número de respuestas ni en la supervivencia de los pacientes, respecto a la combinación quimioterápica (Anderson, 1995; Chowdhury, 1999; Schrader, 2000) [Tabla 8].

Tabla 8. Porcentaje de respuestas y supervivencia media de los pacientes tratados con IFN- α en combinación con mono y poliquimioterapia en el melanoma metastático.

Estudio	Regimen	Respuestas (%)	Media de supervivencia (meses)
Thomson 1993	DITC + IFN- α 2a	21	8.4
Bajetta 1994	DITC + IFN- α	28	11
Falkson 1998	DITC + IFN- α 2b	21	9.3
Hahka-Kemppinen 1995	BOLD + IFN- α	68	10.2
Vuoristo 1996	BOLD + IFN- α 2b	25.8	9
Punt 1997	BOLD + IFN- α 2b	27	5
Bajetta 2001	CVD + IFN- α 2a	41.3	NP
Sertoli 1999	CVD + IFN- α 2a + TM	35	11
Stein 2002	CBDT + IFN- α 2b	52	8.7

NP: no publicado
 TM: Tamoxifeno

II. Introducción

En lo que se refiere al tratamiento quimioinmunoterápico con IL-2, los regímenes utilizados en los múltiples estudios llevados a cabo difieren, no sólo en las drogas citotóxicas empleadas, sino también en las dosis y el método de administración de la IL-2 (subcutánea, bolus o infusión continua). No obstante, la revisión llevada a cabo por Chowdhury y cols. (1999), puso de manifiesto que dicho tratamiento bioquimioterápico da lugar a un número medio de respuestas del 22% y una supervivencia media de 9.5 meses, no siendo superior al tratamiento con quimioterapia sola, pero sí considerablemente más tóxico [Tabla 9].

Tabla 9. Porcentaje de respuestas y supervivencia media de los pacientes tratados con IL-2 en combinación con mono y poli quimioterapia en el melanoma metastático.

Estudio	Regimen	Respuestas (%)	Media de supervivencia (meses)
Stoter 1989	DTIC + IL-2 (ic)	25	8
Flaherty 1990	DTIC + IL-2 (ic)	22	NP
Demchak 1991	CDDP + IL-2 (iv)	37	NP
Flaherty 1993	DTIC + CDDP + IL-2 (iv)	41	10.2
Atkins 1994	DTIC + CDDP + IL-2 (iv) + TM	42	11
Sertoli 1999	DTIC + IL-2 (sc)	13	11
Dorval 1999	CDDP + IL-2 (ic)	16	10.4

ic: infusión continua
iv: intravenosa
sc: subcutáneo

NP: no publicado
TM: Tamoxifeno

Por el contrario, los ensayos clínicos con el tratamiento bioquimioterápico en los que se incluyen ambos moduladores, IL-2 e IFN- α , han demostrado un mayor efecto antitumoral. Este es el caso del estudio realizado por la European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC, Melanoma Cooperative Group), donde la combinación cisplatino, IL-2 e IFN- α , dio lugar a un grado de respuestas del 33% en comparación al 18% producido por el tratamiento con IL-2 e IFN- α solo (Keilholz, 1997). Todos estos estudios han demostrado que para conseguir un sinergismo entre los agentes quimio e inmunoterápicos, resulta de gran importancia la pauta de administración de estos agentes.

A pesar de algunas diferencias en las publicaciones, los resultados de la mayoría de los estudios sugieren que el tratamiento resulta más eficaz cuando las drogas citotóxicas son administradas antes o de forma concurrente con los agentes biológicos. Así lo demuestran diversos estudios llevados a cabo por Legha y cols. (1996, 1998), donde la combinación secuencial (58% de respuestas) o concurrente (62% de respuestas) de CVD en combinación con IL-2 e IFN- α fue netamente superior a la pauta alternante (33% de respuestas). Asimismo, Richards y cols. (1992) con la administración secuencial del regimen CBDT, IL-2 e IFN- α obtuvieron un 57% de respuestas globales y un 15% de respuestas completas, la mayoría de ellas duraderas, alcanzando una supervivencia media de todos los pacientes de 11.5 meses [Tabla 10].

En resumen, se puede decir que los estudios randomizados realizados con bioquimioterapia demuestran que, en comparación con la administración aislada de inmuno o quimioterapia, se obtiene un aumento significativo en el número de respuestas totales –17-62%– y de respuestas completas duraderas –10-20%–; sin embargo, este incremento de la tasa de respuestas no ha dado lugar a un aumento significativo de la supervivencia global de los pacientes –8-13 meses– (Tsao, 2004; Atallah, 2005; Queirolo, 2005).

II. Introducción

Tabla 10. Porcentaje de respuestas y supervivencia media de los pacientes tratados con bioquimioterapia en el melanoma metastático.

Estudio	Regimen	Respuestas (%)	Media de supervivencia (meses)
Legha 1996	CVD + IL-2 (ic) + IFN- α 2a		
	Secuencial	58	13
	Alternante	33	11
Keilholz 1997	CDDP + IL-2 (iv) + IFN- α 2a	33	9
Thompson 1997	CBDT + IL-2 (sc) + IFN- α 2a	42	10
Legha 1998	CVD + IL-2 (ic) + IFN- α 2a		
	Concurrente	62	11.8
Richards 1999	CBDT + IL-2 (iv) + IFN- α 2a		
	Secuencial	55	12.2
O'Day 1999	CVD + TM + IL-2 (ic) + IFN- α 2b + G-CSF		
	Concurrente	57	11.4
Flaherty 2001	DTIC + CDDP + IL-2 (iv) + IFN- α 2b	36	10.7
O'Day 2002	CVD + TM + IL-2 (ic) + IFN- α 2b		
	Concurrente	50	9.5
Eton 2002	CVD + IL-2 (ic) + IFN- α 2b		
	Secuencial	48	11.9
Atkins 2003	CVD + IL-2 (iv) + IFN- α 2b	17	8.4
Del Vecchio 2003	CVD + IL-2 (sc) + IFN- α 2b	27	11

ic: infusión continua
iv: intravenosa

sc: subcutáneo
TM: Tamoxifeno

Por otro lado, la toxicidad secundaria producida por los programas de bioquimioterapia es netamente superior a la que produce la administración aislada de los agentes inmuno o quimioterápicos. Dicha toxicidad tiene un máximo exponente a nivel hematológico, dando lugar a un grado severo de trombocitopenia, leucopenia y anemia (Buzaid, 2002; O'Day, 2002). Tal es así, que en la actualidad se están llevando a cabo estudios en los que, a la combinación de inmunoterapia, se añaden factores estimuladores de colonias de granulocitos (G-CSF), granulocitos y macrófagos (GM-CSF) o eritropoyetina (EPO), con la finalidad de estimular la producción de células sanguíneas y disminuir las complicaciones infecciosas asociadas a la misma. En dichos estudios, el GM-CSF ha demostrado ser eficaz en reducir los tiempos de neutropenia severa, aunque no en la prevención de la misma (Vaughan, 2000).

II. 3. BIOLOGÍA DEL MELANOMA

El melanoma maligno se caracteriza por ser un tumor agresivo con una gran capacidad para la producción de metástasis. Para la formación de dichas metástasis se requiere una serie de sucesos secuenciales: transformación celular y angiogénesis, aislamiento de las células prometastáticas del tumor primario, invasión y migración de éstas a través de la matriz extracelular, intravasación y circulación a través del torrente sanguíneo o de los vasos linfáticos, adhesión y extravasación del endotelio y crecimiento en el órgano diana [Figura 1].

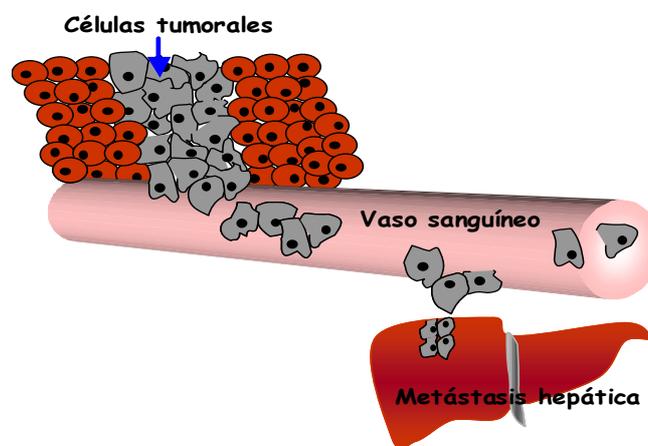


Figura 1. Esquema de la cascada metastásica.

II. Introducción

Sin embargo, las células malignas raramente poseen todas estas propiedades que las capacite para llevar a cabo esta cascada metastática. La presencia en determinadas células tumorales de estas propiedades que configuran el fenotipo metastático, viene determinado por una expresión genética específica, la producción de proteasas, la existencia de un adecuado perfil de expresión de moléculas de adhesión y el requerimiento de un microambiente óptimo en el cual esté presente, entre otros, factores de crecimiento específicos, así como un adecuado aporte sanguíneo (Liotta, 2001; Fidler, 2002).

Estos hechos requieren, por tanto, cambios genéticos y alteraciones en la biología de la célula tumoral, así como de una interacción bidireccional de éstas con las células propias del órgano diana.

En relación a las alteraciones genéticas, se han identificado dos genes principales cuyas mutaciones se han relacionado con el desarrollo y progresión del melanoma metastático, la delección del CDKN2A (inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2A) y la sobreexpresión del CDK4 (ciclina dependiente de quinasa 4), localizados en los cromosomas 9 y 12 respectivamente (Ruiz, 1999; Marsh, 2002; Chin, 2003). El gen CDK4 codifica la proteína Cdk4, la cual promueve la proliferación celular (Marsh, 2002). Por su parte, el gen CDKN2A se encarga de codificar a las proteínas p16 y p14ARF, ambas implicadas en la inhibición del crecimiento celular (Goldstein, 1998; Piepkorn, 2000). La primera de ellas inhibe el producto del gen CDK4, mientras que la segunda inhibe una enzima que degrada la p53, proteína implicada en el mantenimiento de la integridad genómica y la hemostasis celular. En este sentido, aunque con menor frecuencia, se ha observado también, mutaciones del gen p53, lo cual conduce a una alteración del mecanismo celular de muerte programada o apoptosis, con la consecuente supervivencia de los melanocitos transformados y el desarrollo del melanoma.

Relacionado también con el mecanismo de inhibición de la apoptosis, se ha demostrado que en el melanoma se produce, con frecuencia, la pérdida del factor de activación de la apoptosis-1, Apaf-1 (Soengas, 2001).

Otro de los procesos implicados en la migración y metástasis de las células tumorales es la degradación de la matriz extracelular. Este es un evento complejo que requiere de la producción, liberación y activación de una variedad de enzimas degradantes de la matriz extracelular denominadas proteasas. Entre dichas proteasas destacan las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y el activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA). En numerosos melanomas experimentales y humanos se han encontrado una producción elevada tanto de las enzimas MMPs como de las uPA, siendo su medición de utilidad para predecir la evolución de los pacientes (van Muijen, 1995; Wollina, 2001).

Las MMPs son un grupo de enzimas dependientes de zinc que degradan moléculas de la matriz extracelular, proteoglicanos, glucoproteínas y varios tipos de colágeno. Estas enzimas son secretadas en una forma inactiva (pro-metaloproteasas) y, posteriormente, con frecuencia, la activación se lleva a cabo por una activación autocatalítica que da lugar a la pérdida de un péptido amino terminal. Se ha observado que los niveles de MMP-2 y de MMP-9 están significativamente altos en pacientes con melanoma, correlacionándose su sobreexpresión con la progresión maligna (Wollina, 2001; Simonetti, 2002).

El uPA es una serinaproteasa que, además de degradar directamente algunos componentes de la matriz extracelular –fibrina, fibronectina, colágeno tipo IV, vitronectina y laminina–, convierte el plasminógeno en plasmina, una potente enzima capaz, a su vez, de amplificar la cascada proteolítica al activar otras proenzimas. La activación del plasminógeno por el uPA se incrementa cuando está unido a su receptor de membrana (uPAR) centrando así el área de degradación. Cuando existen cantidades aumentadas de uPA y/o uPAR, además de promoverse la degradación de la matriz extracelular, se modifica la señalización intracelular y se puede producir un incremento de la capacidad de migración y proliferación de las células tumorales (Stahl, 1997; Gershtein, 2001).

II. Introducción

El desarrollo del melanoma depende, también, de múltiples factores de crecimiento, autocrinos y paracrinos, cuya presencia además de inducir la proliferación celular, estimula la expresión de moléculas de adhesión y la angiogénesis.

En relación con el perfil de moléculas de superficie expresadas en la membrana plasmática de las células del melanoma, se ha demostrado un aumento de la expresión de una serie de moléculas de adhesión, entre las que cabe destacar:

a. Moléculas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas: la molécula de adhesión del melanoma, Mel-CAM/MUC18, la cual media la adhesión entre las propias células del melanoma y las células del endotelio vascular (Johnson, 1996), y la molécula de adhesión intracelular-1, ICAM-1, la cual se une a las integrinas $\beta 2$ leucocitarias LFA-1 y Mac-1 (Wollina, 1999).

b. Integrinas: $\alpha 2\beta 1$ (Klein, 1991), $\alpha 3\beta 1$ (Natali, 1997), $\alpha 4\beta 1$ (Schadendorf, 1995), $\alpha 6\beta 1$ (Danen, 1993), $\alpha 7\beta 1$ (Kramer, 1991) y la subunidad $\beta 3$ de la integrina $\alpha v\beta 3$ (Eliceiri, 2000). Estas integrinas son moléculas de adhesión que se unen a diferentes componentes de la matriz extracelular como son el colágeno, laminina, fibronectina, vitronectina o el factor von Willebrand, entre otros (Johnson, 1999).

c. CD44: esta molécula se une, principalmente, al ácido hialurónico de las células del melanoma o de la matriz extracelular (Manten-Horst, 1995; Gunthert, 1998; Ahrens, 2001).

d. Cadherinas: entre éstas se encuentra la cadherina neural (N-cadherina), la cual media la unión de las células de melanoma con la N-cadherina de la célula endotelial o el fibroblasto (Sanders, 1999).

Por el contrario, en otras ocasiones la pérdida de expresión de ciertas moléculas de adhesión configura también el fenotipo metastático del melanoma. Así ocurre con la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1), perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, que se une a las integrinas leucitarias $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_4\beta_7$ de los linfocitos T activados (Franzke, 1998); y la cadherina epitelial (E-cadherina), molécula que media la adhesión de los melanocitos a los queratinocitos (Danen, 1996). La pérdida de expresión de esta última está asociada, a su vez, a la activación de la expresión de una proteína citoplasmática, la β -catenina. Ésta une el dominio citoplasmático de la E-cadherina al citoesqueleto, siendo capaz de modular la expresión de genes implicados en el control de la proliferación celular (Rubinfeld, 1997).

En relación a los factores de crecimiento, las células del melanoma poseen la capacidad de secretar, de forma autocrina, una serie de sustancias y expresar los receptores específicos para éstos. Entre dichos factores cabe destacar:

- Interleucinas: IL-1 (de Galdeano, 1999), IL-2 (García-Vázquez, 2000), IL-6 (Mouawad, 1996), IL-8 (Rofstad, 2000) e IL-10 (Kruger-Krasagakes, 1994; Conrad, 1999).
- El factor de crecimiento transformante β o TGF- β (Krasagakis, 1998; Janji, 1999).
- El factor de necrosis tumoral β o TNF- β (Moretti, 1999).
- La hormona estimuladora de los melanocitos, α -melanotropina o α -MSH, (Loir, 1997).
- El factor de movilidad autocrina o AMF (Nagai, 1996).
- La actividad inhibitoria del melanoma o MIA (Bossert, 2001).

Algunos de estos factores, como la IL-10 (Chen, 1994; Gray, 2001) y el TGF- β (Teicher, 2001), pueden actuar como sustancias supresoras de la respuesta inmune.

II. Introducción

Por otro lado, las células del melanoma son también capaces de secretar otros factores que, además de favorecer el desarrollo tumoral, son estimuladores angiogénicos:

- IL-8 (Rofstad, 2000).
- El factor de crecimiento de fibroblastos básico o bFGF (Graeven, 2001).
- TGF- α y TGF- β (Rodeck, 1994; Westphal, 2000).
- El factor de crecimiento epidérmico o EGF (Ellis, 1992; Huang, 1996).
- El factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF (Skobe, 2001).
- El factor angiogénico tumoral o TAA (Stenzinger, 1983).
- La angiogenina (Ugurel, 2001).
- El factor estimulador del crecimiento del melanoma o MGSA/GRO (Luan, 1997; Haghnegahdar, 2000).

Como consecuencia del estímulo de dichos factores de crecimiento se produce la activación de mediadores biológicos intracitoplasmáticos para el desarrollo de las células del melanoma, como la proteína quinasa C (PKC) y el factor nuclear κ B (NF- κ B, del inglés *nuclear factor-kappaB*).

La PKC es una compleja familia de proteínas ricas en cisteína, que se encargan de fosforilar proteínas específicas implicadas en diferentes procesos fisiológicos, en particular de secreción y proliferación (Nishizuka, 1995; Mellor, 1998). Diversos estudios implican a la PKC en la progresión tumoral, como son los fenómenos de migración, invasión y metástasis del melanoma (Yamanishi, 1991; Mapelli, 1994).

Por su parte, el NF- κ B es un factor de transcripción importante en el control de la proliferación celular y la apoptosis, habiéndose relacionado niveles altos de NF- κ B con una mayor capacidad para la producción de metástasis y la inducción de angiogénesis en el modelo de melanoma (Wang, 1996; Huang, 2000; Dominici, 2003).

II. 4. GLUTATIÓN

El glutati3n (γ -glutamilcisteinilglicina, GSH), descubierto en 1888 por Rey-Pailhade, es un trip3ptido ampliamente distribuido en la mayor3a de las c3lulas eucariotas y en muchas procariotas (Meister, 1983), siendo el tiol intracelular m3s abundante (0.2-10 mM).

Dentro del organismo, el h3gado es el 3rgano con mayor nivel de GSH; de hecho, los hepatocitos est3n altamente especializados en la s3ntesis de este trip3ptido, el cual se encuentra presente en estas c3lulas a concentraciones elevadas (10 mM). De este modo, adem3s de la utilizaci3n del GSH para sus funciones, el h3gado se encarga de exportar grandes cantidades al torrente sangu3neo, siendo la fuente m3s importante de este trip3ptido para otros tejidos del organismo como el ri33n o el pulm3n (Lu, 1999).

A continuaci3n, se analizan las caracter3sticas estructurales, bios3ntesis, degradaci3n y las principales funciones del GSH.

II. 4. 1. CARACTER3STICAS ESTRUCTURALES

La composici3n y estructura del GSH fueron determinadas por primera vez por Hopkins en 1921 (Hopkins, 1921). El GSH es un trip3ptido de glutamato, ciste3na y glicina con un enlace pept3dico γ , poco frecuente, entre el glutamato y la ciste3na, y con un grupo tiol en este 3ltimo amino3cido. Estas dos caracter3sticas estructurales, el enlace pept3dico γ y el grupo tiol, son esenciales para el conocimiento de sus propiedades [Figura 2].

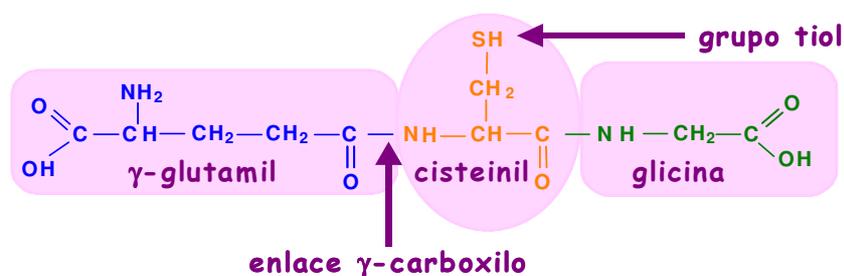


Figura 2. Estructura del glutati3n (γ -glutamilcisteinilglicina, GSH).

II. Introducción

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 -glutamiltanspeptidasa (γ -GT) 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 -glutamilticlotransferasa –los sustratos de esta enzima son los γ -glutamilt-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 sulfidriilo 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 3]:

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).

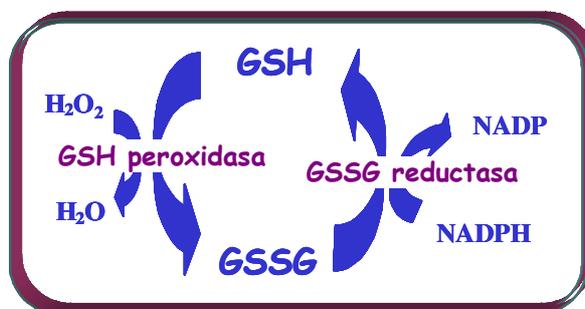


Figura 3. Proceso de oxidación-reducción del glutatión.

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. 4. 2. BIOSÍNTESIS Y DEGRADACIÓN: CICLO DEL γ -GLUTAMILO

La biosíntesis y degradación del GSH se integra en el denominado ciclo del γ -glutamilo [Figura 4], el cual implica el transporte del GSH al espacio extracelular y de los γ -glutamil-aminoácidos al espacio intracelular.

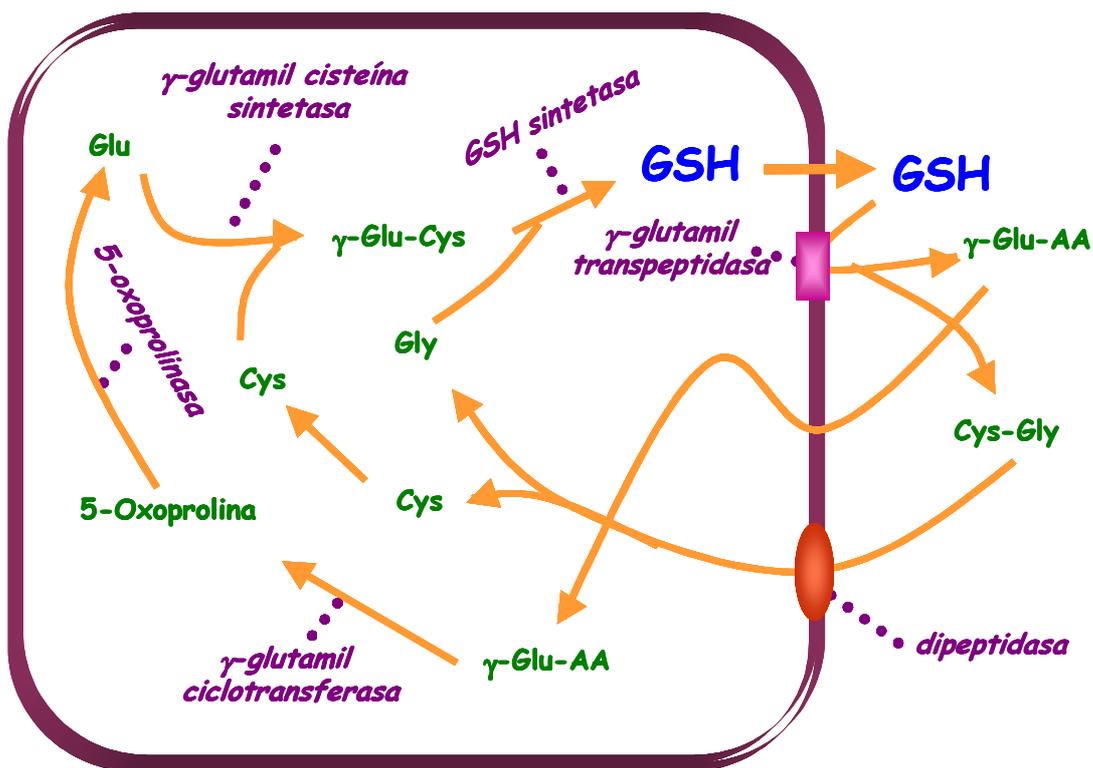
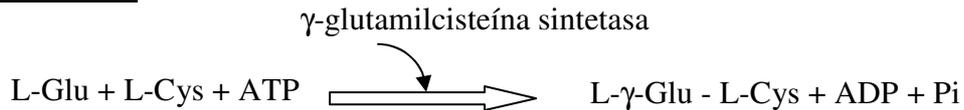


Figura 4. Ciclo del γ -glutamilo.

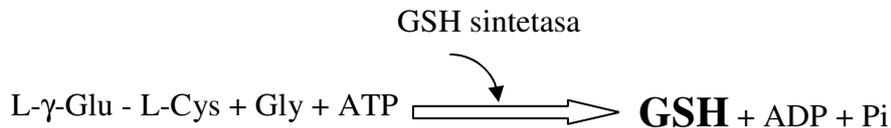
II. Introducción

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):

Reacción a



Reacción b



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 γ -GT, 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 5].

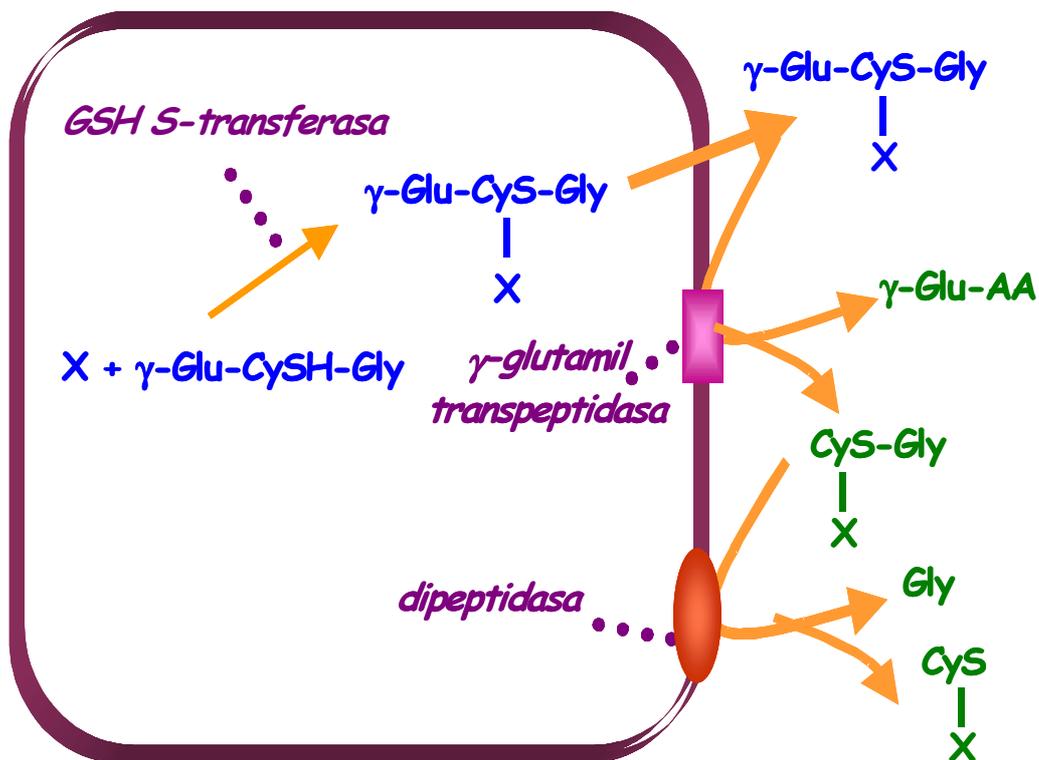


Figura 5. Función detoxificadora del GSH.

II. Introducción

Como ha sido anteriormente señalado, la γ -GT 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. 4. 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. 4. 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. 4. 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. 4. 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 γ -GT 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. 4. 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.

II. Introducción

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. 4. 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. 4. 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 sulfidrilo 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 proteína quinasas, disfunción que puede inhibir la proliferación celular, causando, incluso, la muerte celular por apoptosis (Pellicer, 1994; Gopalakrishna, 2000).

II. 4. 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 los 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. 4. 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. 4. 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).

II. Introducción

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. 4. 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. 4. 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. 4. 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. 4. 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:

II. 4. 4. 1. 1. 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).

II. Introducción

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).

II. 4. 4. 1. 2. 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).

II. 4. 4. 1. 3. 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).

II. 4. 4. 1. 4. 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).

II. 4. 4. 1. 5. 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 6], 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).

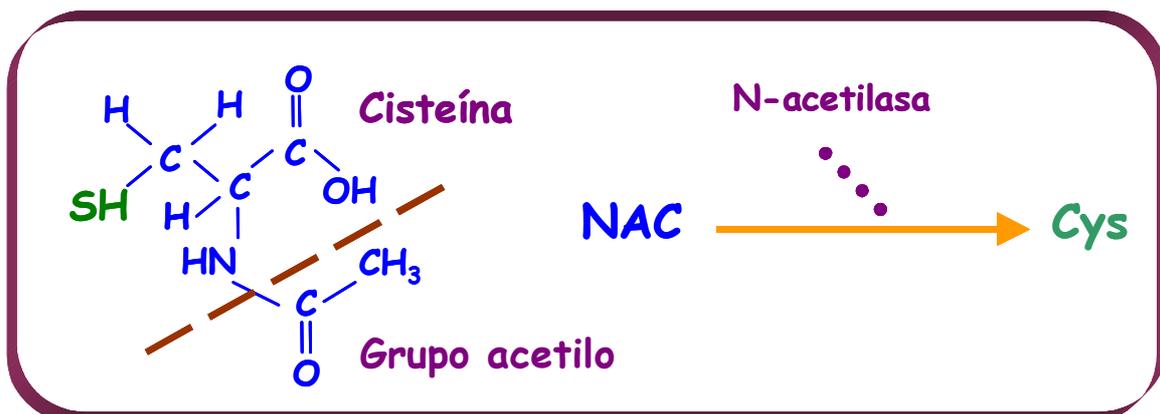


Figura 6. Estructura de la N-acetilcisteína (NAC).

II. Introducción

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).

II. 4. 4. 1. 6. 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 7]. El producto de la reacción es la S-carboxicisteína, que posteriormente, se hidroliza a cisteína y CO_2 .

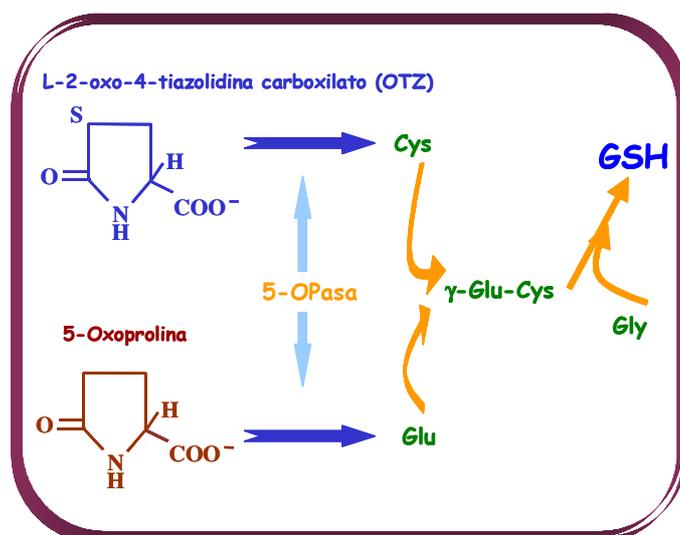


Figura 7. Metabolismo del L-2-oxo-4-tiazolidina carboxilato (OTZ) y de la 5-oxo-L-prolina mediante la 5-OPasa.

II. 4. 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 α -etil metionina sulfoximina (α -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 8], un potente inhibidor de la γ -GCS.

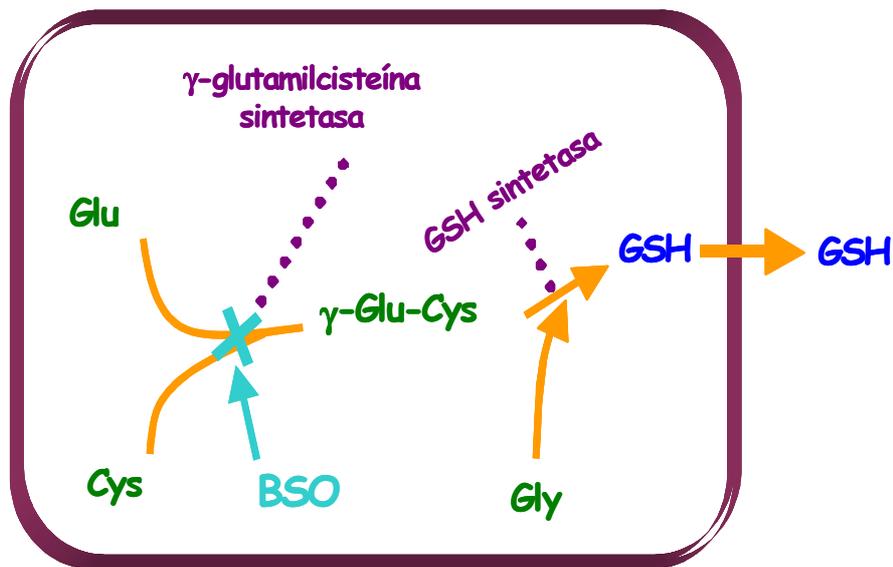


Figura 8. Inhibición de la γ -Glutamilcisteína sintetasa mediante la L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO).

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. 4. 5. GLUTATIÓN Y PATOLOGÍA

II. 4. 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 –ARDS– (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, ARDS, SIDA y artritis reumatoide, entre otras (Adams, 1991; Martínez-Cayuela, 1995; Nakamura, 2002).

II. Introducción

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. 4. 5. 2. GLUTATIÓN Y PATOLOGÍA TUMORAL

La conexión entre el contenido intracelular de GSH y la carcinogénesis ha sido perfectamente establecida. 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 γ -GT (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).

En el caso del melanoma, el GSH tiene una función esencial en el particular metabolismo de este tipo tumoral, participando, entre otras, en la biosíntesis de la melanina (Meister, 1983). Diversos estudios demuestran que las células del melanoma contienen niveles significativamente más elevados de este tiol que los melanocitos no tumorigénicos.

Este hecho se ha relacionado con la inherente radio y quimiorresistencia del melanoma, limitando, de forma considerable, la eficacia terapéutica del tratamiento convencional (Thrall, 1991).

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.

En el caso particular del melanoma, es un hecho bien constatado la importante reducción de la viabilidad celular y la considerable sensibilización a los agentes citotóxicos inducidos por la reducción de los niveles de GSH (Prezioso, 1994). En este sentido, el agente más utilizado para inducir la disminución de los niveles de este tiol ha sido el BSO (O'Dwyer, 1995). Sin embargo, la utilización del BSO provoca no sólo la sensibilización de las células tumorales a los agentes antineoplásicos, sino que de forma simultánea también lo produce sobre las células sanas. Esto ha sido observado en estudios clínicos, como el realizado por Bailey y cols. (1997), quienes combinando el BSO y melfalán, observaron un aumento importante de la toxicidad medular respecto al producido por la administración aislada del agente alquilante. Esta toxicidad limita, de facto, la potencialidad terapéutica del BSO y de otros agentes reductores del GSH no selectivos (Alaoui-Jamali, 1995).

La modulación selectiva del metabolismo del glutatión podría, por tanto, ser un método efectivo para conseguir una sensibilización de las células tumorales y/o una protección de las células sanas frente a los agentes tóxicos endógenos y exógenos. La posibilidad de esta modulación selectiva del GSH depende de las diferencias fisiológicas existentes entre las células normales y las células tumorales, las cuales bajo la exposición a un modulador selectivo del GSH conduciría a diferentes respuestas en ambos tipos celulares.

II. Introducción

Un incremento de los niveles de GSH o de la capacidad de su síntesis por parte de las células normales, aumentaría su resistencia celular, con el consiguiente efecto protector. Por el contrario, una disminución en el contenido de GSH o de la capacidad celular para la síntesis de este tripéptido en las células tumorales, aumentaría su sensibilidad a los efectos de los agentes antitumorales como las radiaciones ionizantes y a ciertas sustancias quimioterápicas. De esta manera, el desarrollo de protocolos clínicos que combinen la radio y/o quimioterapia con agentes que induzcan una modulación selectiva de los niveles de GSH podría ser de gran utilidad en el tratamiento antitumoral (Russo, 1986).

El estudio de la enzimología del metabolismo del glutatión ha facilitado la síntesis de una serie de inhibidores enzimáticos selectivos que podrían resultar eficaces en este tipo de modalidad terapéutica (Meister, 1983). Entre estos compuestos figura el L-2-oxo-4-tiazolidina carboxilato (OTZ), una prodroga de cisteína que induce el aumento de los niveles de GSH en los tejidos normales –músculo esquelético, páncreas, cerebro, linfocitos e hígado– (Williamson, 1982; Porta, 1991; Fukagawa, 2000). En estudios *in vitro*, el OTZ ha demostrado su utilidad como protector en linfocitos humanos contra la toxicidad de la mostaza nitrogenada (Gross, 1997), o en cultivo de fibroblastos humanos contra la toxicidad radioinducida. En ensayos *in vivo* en modelos murinos, ha demostrado su eficacia en proteger contra el daño hepático producido por el alcohol (Iimuro, 2000), reducir el grado de cistitis inducida por la ciclofosfamida (Safron, 1997) o disminuir la hepatotoxicidad producida por el acetaminofeno (Moslen, 1989), entre otros efectos.

Actualmente, el OTZ está siendo utilizado en diversos ensayos clínicos para el tratamiento de distintas patologías relacionadas con la generación de mROS y la reducción de los niveles de GSH. Entre las enfermedades en las que se está ensayando el tratamiento con OTZ destacan, la esclerosis lateral amiotrófica (Cudkowicz, 1999), la arteriosclerosis (Vita, 1998), en pacientes sometidos a diálisis peritoneal (Moberly, 1998) y en enfermos infectados con el virus del SIDA (Kalayjian, 1994; Barditch-Crovo, 1998).

Paradójicamente, al contrario del efecto producido en los tejidos sanos, el OTZ reduce los niveles de GSH en algunas líneas tumorales murinas –carcinoma y sarcoma de rata– (Rose, 1996) y en ciertas líneas tumorales humanas –adenocarcinoma de mama, adenocarcinoma de ovario– (Russo, 1986; Chen, 1998).

Por lo tanto, la utilización de este agente modulador selectivo del GSH podría ser de utilidad como adyuvante de los tratamientos quimio e inmunoterápicos que en la actualidad están siendo aplicados en el melanoma metastático.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El presente trabajo de investigación se centra en el estudio de la influencia del contenido intracelular del GSH en el comportamiento biológico del melanoma metastático y en su respuesta a la bioquimioterapia, en la actualidad uno de los abordajes terapéuticos más importantes utilizados en dicho proceso tumoral.

Tomando en consideración la baja tasa de supervivencia y la importante toxicidad que, en la actualidad, presentan los pacientes con melanoma metastático sometidos a dicho tratamiento bioquimioterápico, se plantea como nueva estrategia terapéutica la modulación farmacológica selectiva de los niveles de GSH en el tejido sano y tumoral, con la siguiente **hipótesis**:

“El tratamiento con L-2-oxo-4-tiazolidina carboxilato (OTZ) modula selectivamente el contenido intracelular de GSH, reduciéndolo en las células del melanoma e incrementándolo en las células sanas, lo cual permite aumentar el índice terapéutico de la bioquimioterapia”.

Para demostrar dicha hipótesis, en este estudio se han planteado los siguientes **objetivos concretos**:

1. Analizar el efecto del OTZ sobre los niveles intracelulares de GSH en las células sanas (células mononucleares de sangre periférica, PBMCs) y en las líneas celulares del melanoma murino B16F10 y del humano A375.
2. Determinar si el tratamiento con OTZ permite obtener una sensibilización de las células del melanoma y una citoprotección de las PBMCs al tratamiento quimioterápico.
3. Investigar si el tratamiento con OTZ anula el efecto protumoral de la IL-2, en las líneas tumorales de melanoma murino y humano.
4. Determinar si la administración previa de OTZ permite llevar a cabo dosis de intensificación quimioterápica con toxicidad aceptable.
5. Determinar el efecto del tratamiento con OTZ sobre el índice terapéutico del tratamiento bioquimioterápico.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. 1. MATERIAL

IV. 1. 1. ANIMALES

La experimentación *in vivo* fue realizada en ratones singénicos de la cepa C57BL/6 (laboratorios Iffa-Credo, L'Arbreole, Francia) [Figura 9]. En todas las experiencias se utilizaron ratones hembras de 6-8 semanas, con un peso de 20 ± 2 g, estabulados en grupos de 10 animales por jaula y mantenidos en condiciones óptimas de higiene, con alimentación y agua “*ad libitum*”.

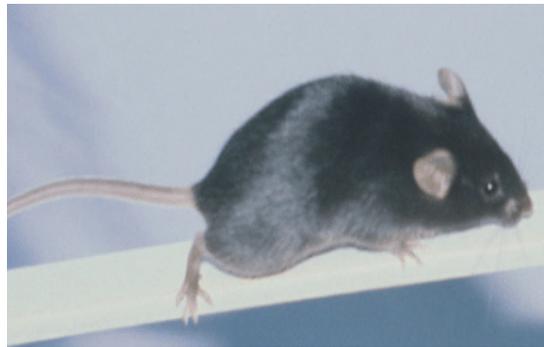


Figura 9. Ratones singénicos de la cepa C57BL/6.

IV. 1. 2. CÉLULAS

IV. 1. 2. 1. Células tumorales

En este estudio, se han utilizado dos líneas de melanoma, melanoma murino B16F10 y melanoma humano A375.

La línea tumoral de melanoma murino B16, fue aislada en los laboratorios Jackson (Maine, USA) en 1954 de una cepa de ratones negros C57BL/6. El melanoma B16 es un tumor de crecimiento anaplásico, productor de melanina, capaz de crecer en cultivo por tiempo indefinido.

IV. Material y Métodos

Se utilizó la sublínea F10 [Figura 10A] seleccionada por I.J. Fidler en 1972 (MD Anderson Hospital and Tumor Institute, USA) por su alta capacidad metastática (Fidler, 1973).

La línea tumoral de melanoma humano A375 es una línea celular de crecimiento amelanótico derivada de una mujer de 54 años de edad, obtenida a partir de la colección Europea de cultivos celulares (The European Collection of Cell Cultures, ECCC). Esta línea, obtenida por D.J. Giard (1973), induce el crecimiento de tumores subcutáneos amelanocíticos cuando es inoculada en ratones atímicos [Figura 10B].

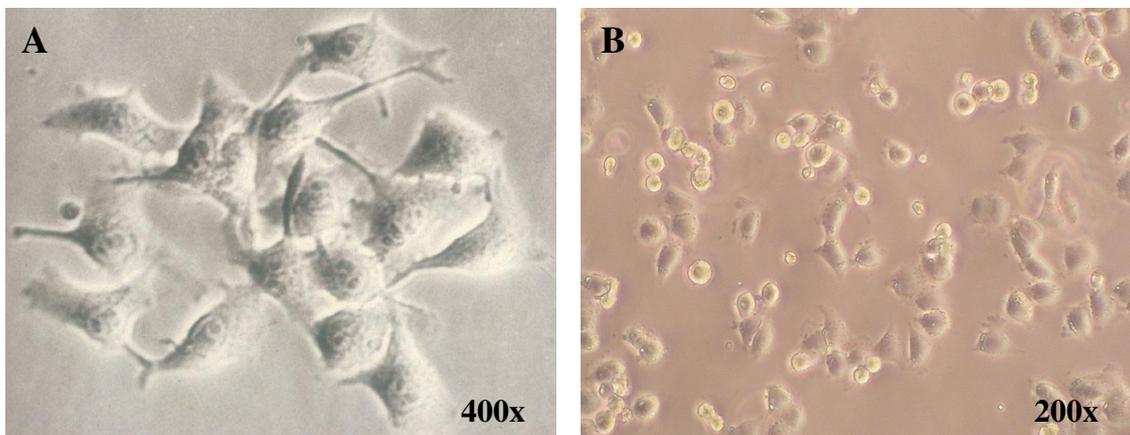


Figura 10. Células del melanoma murino B16F10 (A) y melanoma humano A375 (B).

IV. 1. 2. 2. Células mononucleares de sangre periférica

Se realizaron estudios con células mononucleares, linfocitos y monocitos, extraídas de sangre periférica (PBMCs, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) de ratones singénicos C57BL/6 y de donantes humanos sanos.

IV. 1. 3. MATERIAL DE CULTIVOS CELULARES

IV. 1. 3. 1. Frascos y placas de cultivo

El cultivo de las líneas celulares fue realizado en frascos desechables de 25 y 75 cm² de superficie (Orange Scientific) y en placas de cultivo de 24 y 96 pocillos (Costar).

IV. 1. 3. 2. Medios de cultivo

El mantenimiento de las células tumorales en cultivo se realizó con el medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco BRL™) suplementado con penicilina (100 UI/ml, Biochrom KG), estreptomycin (100 µg/ml, Biochrom KG), anfotericina B (100 µg/ml, Biochrom KG) y suero bovino fetal (SBF, Flow Lab.).

Por otro lado, el cultivo de las PBMCs se efectuó con RPMI-1640 (Gibco BRL™) suplementado con SBF.

IV. 1. 3. 3. Soluciones tamponadas

- Tampón fosfato en solución salina (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*) a pH 7.3, utilizado en la manipulación de los cultivos celulares.
- PBS-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 2 mM, empleado para separar las células adherentes de la base del frasco de cultivo.
- Solución salina equilibrada de Hanks (HBSS, del inglés *Hank's Balanced Salt Solution*, Gibco BRL™), suplementado con la solución tamponada Hepes (Gibco BRL™) 15 mM, utilizado en la suspensión de las células tumorales para la inoculación en los animales.

IV. Material y Métodos

- Suero fisiológico (Laboratorios Mein, S.A.), utilizado como solvente para la administración de los fármacos en la experimentación *in vivo*.

IV. 1. 3. 4. Anticuerpos monoclonales

- Inmunoglobulina de ratón (IgG₁, κ) anti CD25/IL-2R humano conjugado con Ficoeritrina-Cianina7 (PE-Cy7, BD Pharmingen™): utilizado para la determinación del receptor α de la IL-2 (IL-2Rα) en el melanoma A375 y en las PBMCs humanas. El clon empleado fue M-A251.
- El anticuerpo isotópico utilizado en las experiencias fue IgG₁, κ de ratón marcado con PE-Cy7 (BD Pharmingen™) y el clon usado fue MOPC-21.

Los medios de cultivo, soluciones tamponadas y anticuerpos utilizados fueron almacenados a 4°C.

IV. 1. 4. FÁRMACOS

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

IV. 1. 4. 1. CITOSTÁTICOS

IV. 1. 4. 1. 1. Ciclofosfamida

Para los estudios *in vivo* se utilizó el agente alquilante ciclofosfamida (CY; Genoxal[®], Funk) en viales en polvo de 1 g. Este fármaco es un agente citostático que precisa de la metabolización previa por los enzimas microsomales hepáticos. Tiene un amplio espectro antineoplásico y gran poder inmunosupresor. El producto fue almacenado a 4°C.

IV. 1. 4. 1. 2. Acroleína

En la experimentación *in vitro* se utilizó la acroleína (AC; Sigma-Aldrich Chemical Co.), uno de los metabolitos activos de la ciclofosfamida que reacciona con el GSH, disminuyendo sus niveles intracelulares (Norton, 1997). Este producto se presenta en forma líquida y fue almacenado a 4°C.

IV. 1. 4. 2. MODULADORES BIOLÓGICOS DEL GLUTATIÓN

IV. 1. 4. 2. 1. N-acetilcisteína

El N-acetilcisteína (NAC, Sigma-Aldrich Chemical Co.) es un fármaco que aumenta los niveles de GSH intracelulares mediante el aporte de cisteína (Morini, 1999). Se empleó en viales en polvo de 5 g y se almacenó a 4°C.

IV. 1. 4. 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 en polvo de 5 g a 4°C.

IV. 1. 4. 2. 3. L-2-oxo-4-tiazolidina carboxilato

El L-2-oxo-4-tiazolidina carboxilato (OTZ, Sigma-Aldrich Chemical Co.) es un producto que por la acción de la enzima 5-OPasa se convierte en L-cisteína, péptido necesario para la síntesis de GSH (Chen, 1998). Este producto se presenta en viales de 1 g y se almacenó a 4°C.

IV. 1. 4. 3. CITOCINA

IV. 1. 4. 3. 1. Interleucina-2

La Interleucina-2 (IL-2) es una citocina básica en la respuesta inmunitaria (Margolin, 1997). Se empleó la IL-2 humana recombinante (Proleukin[®], Chiron Iberia). Este fármaco se presenta en viales en polvo con una actividad específica de 18×10^6 UI. Estos viales se disolvieron en DMEM y fueron congelados a -80°C . Para los experimentos *in vivo* se prepararon alícuotas de 2×10^5 UI por ml de DMEM y para los estudios *in vitro* las alícuotas preparadas fueron de 2×10^3 UI por ml de DMEM.

IV. 1. 5. FLUOROCROMOS

IV. 1. 5. 1. Monoclorobimano

Para el marcaje del GSH, tanto para la medición por citometría de flujo como por fluorimetría de barrido de placa, se utilizó el fluorocromo monoclorobimano (mBCL, Molecular Probes, Eugene, OR).

La especificidad de este fluorocromo por el GSH es debida al enzima GST, enzima que cataliza la conjugación del GSH con el mBCL, formándose un producto fluorescente (Kamencic, 2000) [Figura 11].

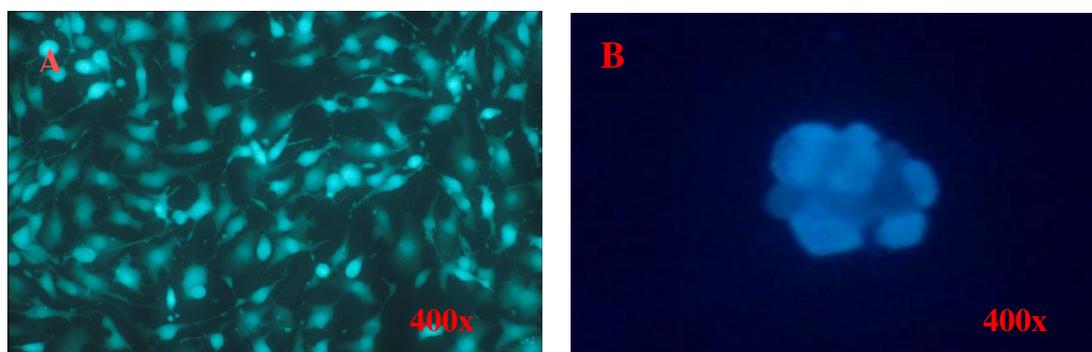


Figura 11. Marcaje del GSH intracelular con mBCL en las células B16F10 (A) y PBMCs humanas (B) visualizado mediante microscopía de fluorescencia.

Se prepararon disoluciones stock de 1 mg/ml en etanol puro que fueron almacenadas a -20°C. La concentración que se utilizó para los ensayos fue 20 μ M y 40 μ M para el marcaje de las células murinas (Shrieve, 1988) y PBMCs humanas (Chang, 1999), respectivamente.

IV. 1. 5. 2. O-ftaldehído

La valoración del GSH en las células del melanoma humano A375 se realizó mediante un método fluorimétrico basado en la reacción del GSH con el fluorocromo O-ftaldehído (1,2-bencenodicarboxialdehído, OPT; Sigma-Aldrich Chemical Co.) a pH 8 (Hissin, 1976). El OPT reacciona tanto con el grupo tiol como con la amina primaria del GSH dando lugar a un producto fluorescente (Puri, 1988). En el momento de la valoración se prepararon disoluciones de 10 mg/ml de metanol.

IV. 1. 5. 3. Sulforrodamina-101

La determinación de la proliferación de las células del melanoma se realizó por citofluorimetría, valorando el contenido proteínico de los cultivos celulares a través del marcaje con el fluorocromo Sulforrodamina-101 (S-101, FluoReporter[®] Fluorometric Cell Protein Assay Kit, Molecular Probes; Skehan, 1990) [Figura 12].

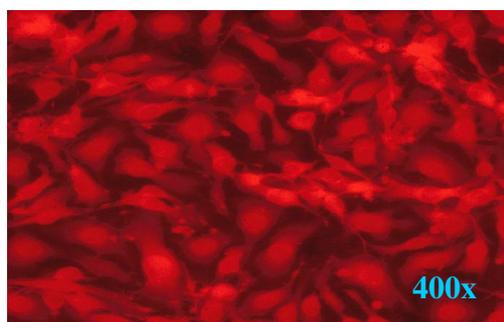


Figura 12. Marcaje de las proteínas con S-101 en las células B16F10 visualizado mediante microscopía de fluorescencia.

IV. 1. 5. 4. Ficoeritrina-Cianina7

Para el análisis por citometría de flujo del IL-2R α se utilizó la inmunoglobulina de ratón anti-humano marcada con la combinación de fluorocromos Ficoeritrina-Cianina7 (PE-Cy7).

IV. 1. 6. XTT

La determinación de la proliferación de las PBMCs, se realizó mediante un ensayo colorimétrico utilizando el kit de proliferación XTT (Boehringer Mannheim). El XTT es una sal tetrazolio (color amarillo) que, en las células metabólicamente activas, por la actividad de la enzima deshidrogenasa presente en las mitocondrias, se transforma en el colorante formazán (color naranja). La medida espectrofotométrica de la absorbancia se realizó en el lector automático de microplacas (Roehm, 1991).

IV. 1. 7. Quantikine[®]

La valoración cuantitativa de la concentración de la IL-2 humana en el sobrenadante del medio de cultivo, fue realizada mediante el inmunoensayo Quantikine[®] (R&D Systems), un ensayo cuya medida espectrofotométrica se realiza en el lector automático de microplacas.

IV. 1. 8. CITOFLUORÍMETROS

IV. 1. 8. 1. FLUORÍMETRO DE BARRIDO DE PLACA

Las medidas de GSH y proliferación celular fueron realizadas en un fluorímetro de barrido de placa (Fluoroskan Ascent, Labsystems) [Figura 13]. Los filtros utilizados para su determinación fueron: mBC1, $\lambda_{exc} = 360$ nm y $\lambda_{emi} = 460$ nm; OPT, $\lambda_{exc} = 360$ nm y $\lambda_{emi} = 450$ nm, y S-101, $\lambda_{exc} = 485$ nm y $\lambda_{emi} = 620$ nm.



Figura 13. Fluorímetro de barrido de placa.

IV. 1. 8. 2. CITÓMETRO DE FLUJO

Las medida del GSH en las PBMCs y la determinación de la expresión del IL-2R α en células del melanoma y en las PBMCs se realizó en un citómetro de flujo Coulter EPICS 752 (EPICS division of Coulter corp., Hialeheat, USA) [Figura 14A] y en un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) [Figura 14B].



Figura 14. Citómetro de flujo Coulter EPICS 752 (A) y FACSCalibur (B).

Para la excitación del mBCI se utilizaron las líneas 360 nm y 524 nm de un láser de helio-cadmio y la fluorescencia emitida fue recogida tras atravesar la combinación de filtros DL 488 nm y BK 488 nm.

IV. Material y Métodos

Para la excitación del PE-Cy7 se utilizó la línea de 488 nm de un láser de argón y la fluorescencia emitida fue recogida tras atravesar la combinación de filtros DL 488, DL 550 nm y BP 525 nm.

IV. 1. 9. LECTOR AUTOMÁTICO DE MICROPLACAS

Las medidas de proliferación de las PBMCs se realizaron mediante la lectura espectrofotométrica de la absorbancia en un lector automático de microplacas (Elx800, Bio-Tek Instruments®) [Figura 15], utilizando el filtro de $\lambda = 490$ nm. Por otro lado, la medida de proteína total se realizó utilizando el filtro de $\lambda = 630$ nm y la medida de la IL-2 del medio de cultivo se obtuvo con el filtro de $\lambda = 450$ nm.

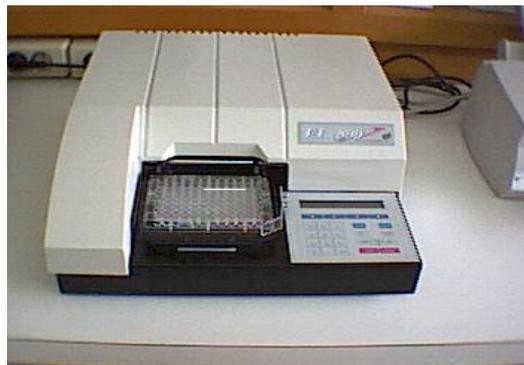


Figura 15. Lector automático de microplacas.

IV. 1. 10. MATERIAL PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS SANGUÍNEOS Y EL AISLAMIENTO DE LAS PBMCs

La determinación del número de leucocitos, hematíes, hemoglobina y el hematocrito, se llevó a cabo en un contador Coulter Counter® (Coulter Electronics LTD, Luton, UK).

Para dichas determinaciones, la manipulación de la sangre periférica de los animales se llevó a cabo empleando el siguiente material:

- Tubos Microtainer[®] con heparina litio (BD Biosciences), utilizados para anticoagular la sangre periférica.
- Isotón[®], diluyente sanguíneo.
- Zap-oglobin[®]: es un agente hemolizante y un reactivo de cianohemoglobina para el conteo de leucocitos y la determinación de hemoglobina.

Finalmente, el aislamiento de las PBMCs, se llevó a cabo mediante densidad de gradiente, utilizando para ello la solución de Ficoll-Paque[®] (Pharmacia Biotech; Boyum, 1968). El Ficoll-Paque[®] es una solución constituida por Ficoll 400, diatrizoato de sodio y edetato cálcico disódico en agua con una densidad de 1.077. Este producto se almacena a 4°C y protegido de la luz.

IV. 2. MÉTODOS

IV. 2. 1. CULTIVOS CELULARES

IV. 2. 1. 1. Mantenimiento de las células del melanoma murino B16F10, melanoma humano A375 y PBMCs humanas

La manipulación de los cultivos celulares se llevó a cabo en cabinas de flujo laminar vertical (Bio48, FASTER). La línea celular tumoral B16F10 fue cultivada en frascos, en DMEM suplementado con antibióticos y SBF al 5%. El mantenimiento de los cultivos se llevó a cabo en un incubador (Heraeus) a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Los cultivos con la línea del melanoma humano A375 se mantuvieron en las mismas condiciones con un 10% de SBF.

Cuando los cultivos alcanzaban la semiconfluencia, las células fueron despegadas de la superficie del frasco por la exposición a PBS-EDTA 2 mM. Posteriormente, fueron subcultivadas a la concentración más adecuada dependiendo de las experiencias a realizar.

Las PBMCs humanas fueron cultivadas en placas de 96 pocillos en RPMI-1640 suplementado con SBF al 2% y fueron estimuladas aplicando al medio de cultivo fitohemaglutinina-M (PHA-M, 10 µg/ml; Sigma-Aldrich Chemical Co.).

IV. 2. 1. 2. Siembra de las suspensiones celulares en placas

Una vez obtenidos los cultivos celulares semiconfluentes, se retiró el medio de cultivo y posteriormente las células fueron incubadas en una solución de PBS-EDTA 2 mM, durante 5 min a 37°C. Se añadió DMEM y se recogió la suspensión celular en tubos de centrifuga. Estos tubos se centrifugaron a 500 g (Labofuge 400R, Heraeus) durante 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en DMEM.

El recuento celular se efectuó en un hemocitómetro Burker[®], determinándose la viabilidad celular por el método de exclusión del azul tripán (Gibco BRL[™]). En todos los ensayos realizados la viabilidad mínima fue del 95%.

De la suspensión de las células del melanoma B16F10, se procedió a la siembra en placas de 24 pocillos de 10^4 células por ml de DMEM suplementado con SBF al 5% y antibiótico.

En los estudios con la línea tumoral humana A375, se procedió a la siembra en placas de 24 pocillos de 2×10^4 células por ml de DMEM suplementado con SBF (10% y 2%) y antibiótico.

Los estudios con las PBMCs humanas se realizaron en microplacas de 96 pocillos, sembrando 5×10^4 células en 200 μ l de RPMI-1640. En ciertos experimentos, dicha siembra fue realizada en tubos de cristal cónicos estériles de 10 ml, sembrando 10^6 células por ml de RPMI-1640.

IV. 2. 2. EXTRACCIÓN DE LAS PBMCs MURINAS Y HUMANAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Para la extracción sanguínea, los ratones fueron anestesiados y dispuestos en decúbito supino. Tras la limpieza de la región se realizó una incisión abdominal, se visualizó la aorta y se extrajo 0.2 ml de sangre con una jeringa de 25 G (BD Biosciences; Morton, 1993). La sangre obtenida fue anticoagulada en tubos Microtainer[®] con heparina-litio. Esta muestra sanguínea fue distribuida cuidadosamente en tubos Eppendorf (Eurotubo[®], Deltalab), en los que previamente se había dispuesto 0.8 ml de Ficoll-Paque[®] a 20°C. A continuación, los tubos son mantenidos a temperatura ambiente durante 30 min.

IV. Material y Métodos

El gradiente de densidad permite eliminar los eritrocitos, las células polimorfonucleares y las células muertas, de forma que dichas células se encontrarían por debajo del Ficoll-Paque[®], y separar las PBMCs que se encuentran en una fase por encima del Ficoll-Paque[®].

La muestra de sangre humana fue extraída de la vena cubital interna mediante una venopunción. El sistema de obtención de la sangre fue mediante tubos estériles de 5 ml al vacío con el anticoagulante heparina-litio (Venojet[®] II, Terumo[®]). A 15 ml de sangre heparinizada se añadió igual cantidad de DMEM a 37°C y se mezcló hasta obtener una suspensión homogénea.

La suspensión celular fue distribuida muy lentamente a razón de 5 ml, en tubos de poliestireno (Eurotubo[®], Deltalab), en los que previamente se había dispuesto 1.5 ml de Ficoll-Paque[®] a 20°C. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 667 g durante 30 minutos a 20°C, con aceleración rápida y sin freno.

Una vez finalizada la centrifugación, los eritrocitos, las células polimorfonucleares y las células muertas se encuentran depositadas en el fondo del tubo, y las PBMCs están en la interfase entre el medio y el Ficoll-Paque[®].

Con ayuda de una pipeta estéril se recogieron los anillos celulares situados en la interfase entre el Ficoll-Paque[®] y el medio de cultivo. Las células se diluyeron en DMEM en un tubo mantenido a 0°C y fueron lavadas dos veces mediante centrifugación con el fin de eliminar los restos tóxicos. Tras el último lavado se procedió al conteo y siembra de las células.

IV. 2. 3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE GLUTATIÓN

IV. 2. 3. 1. Análisis del contenido intracelular de GSH en las células del melanoma B16F10

Las células fueron sembradas en placa y tras el tiempo de exposición a diferentes tratamientos, se lavaron 2 veces con PBS y se añadió 500 μ l de una solución de PBS con 20 μ M de mBCL durante 1 h, a 37°C y en oscuridad. La cuantificación del contenido intracelular de GSH de los cultivos con mBCL se llevó a cabo con un fluorímetro de barrido de placa. Los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias (UA) de fluorescencia, tras las correspondientes correcciones de la autofluorescencia emitida por las células previo a su marcaje con mBCL (Shrieve, 1988).

IV. 2. 3. 2. Análisis del contenido intracelular de GSH y cantidad de proteína en las células A375

Debido a una menor actividad GST presente en las líneas tumorales humanas (Benathan, 1997), el análisis del contenido de GSH no pudo ser realizado con el fluorocromo mBCL, siendo sustituido por el fluorocromo OPT. El análisis del contenido intracelular de GSH en las células del melanoma humano A375 se expresó en nmol de GSH/mg de proteína celular, para lo cual se analizó el contenido intracelular de GSH y la proteína del cultivo celular como se describe a continuación:

IV. 2. 3. 2. 1. Valoración del contenido de GSH

La determinación del contenido intracelular de GSH en células del melanoma humano A375 se realizó siguiendo el método descrito por Hissin y cols. (1976). Tras el tiempo de incubación con el tratamiento, las células adheridas fueron lavadas 2 veces con PBS, se eliminó el sobrenadante y se procedió a la congelación de las placas en N₂ líquido.

IV. Material y Métodos

En el momento de la valoración se añadió a cada pocillo 150 µl de una solución de homogenización [EDTA 2 mM y ácido tricloroacético 5% (TCA, Fluka)]; tras una breve sonicación de la placa (10 segundos) para la ruptura de la membrana celular, se centrifugó a 1000 g durante 30 min a 4°C. De cada pocillo se recogieron 2 muestras de 50 µl y se pusieron en una placa de 96 pocillos; posteriormente, se añadió a cada pocillo una mezcla de 175 µl de PBS 0.1 M con EDTA a pH 8, 15 µl de NaOH 1 M y 10 µl de solución OPT (10 mg/ml de metanol) durante 30 min y en oscuridad. En cada ensayo se obtuvo una curva patrón de GSH (Sigma-Aldrich Chemical Co.) a partir de una concentración de 10 mM, preparándose diluciones sucesivas con la solución de homogenización descrita anteriormente.

La cuantificación se llevó a cabo con un fluorímetro de barrido de placa, obteniendo los resultados en nmol de GSH una vez interpolados los valores de fluorescencia en la curva de calibración.

IV. 2. 3. 2. 2. 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 los nitrógenos de los enlaces peptídicos (reacción de Biuret). Para aumentar el color formado en esta reacción e incrementar 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.

Tras finalizar las incubaciones con los tratamientos, las células se lavaron 2 veces con PBS y se añadió en cada pocillo 150 µl de NaOH 0.5 N. Una vez homogeneizada la muestra, se añadió 375 µl 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 la proporción 100:1:1. Tras 10 min, se añadió 75 µl de la solución del reactivo Folin-Ciocalteus (1:2 en agua destilada).

Del contenido de estos pocillos se transfirieron 2 muestras de 200 μ l a una placa de 96 pocillos, se mantuvo 30 min en oscuridad y se procedió a la medición en el lector automático de microplacas. La curva patrón se realizó a partir de la solución de albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *bovine seric albumin*; Sigma-Aldrich Chemical Co.) 1mg/ml en NaOH 0.5 N. Los resultados obtenidos del contenido de proteína fueron expresados en μ g.

IV. 2. 3. 3. Análisis del contenido intracelular de GSH en las PBMCs

Las PBMCs fueron extraídas por un gradiente de densidad en Ficoll-Paque[®]. A continuación, fueron resuspendidas a una concentración de 10^6 células en 500 μ l de PBS e incubadas con 20 μ M de mBCL durante 10 min y con 40 μ M de mBCL durante 30 min, a temperatura ambiente y en oscuridad, en las PBMCs murinas y humanas, respectivamente. La medida del GSH se realizó por citometría de flujo, analizando la intensidad de marcaje por unidad celular y expresando las valoraciones en unidades arbitrarias de fluorescencia.

IV. 2. 4. DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

IV. 2. 4. 1. Determinación de la proliferación de las células del melanoma

La determinación de la proliferación celular se realizó siguiendo el método descrito por Skehan y cols. (1990). Después del tiempo de exposición a los diferentes tratamientos, las células se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con 500 μ l de TCA durante 1 h. Tras la fijación, se procedió al marcaje de las células con 500 μ l de S-101 durante 30 min, a temperatura ambiente y en oscuridad. El número de células por pocillo es proporcional a la intensidad de fluorescencia utilizando un fluorímetro de barrido de placa.

IV. Material y Métodos

Para conocer el efecto que produce la combinación del agente modulador del GSH y el citostático en la inhibición del crecimiento celular respecto al tratamiento aislado de estos agentes, se calculó el Factor Modificador de Dosis (FMD) de acuerdo a la siguiente ecuación (Tharll, 1991):

$$\text{FMD} = \frac{\% \text{ inhibición por el modulador + droga}}{\% \text{ inhibición por el modulador} + \% \text{ inhibición droga}}$$

donde, valores de FMD > 1 indican sinergia entre los fármacos y valores entre 0 y 1 señalan efecto aditivo.

IV. 2. 4. 2. Determinación de la proliferación de las PBMCs

La determinación de la proliferación de las PBMCs se realizó siguiendo un método colorimétrico descrito por Roehm y cols. (1991), utilizando el kit de proliferación XTT. Después del tiempo de exposición a los diferentes tratamientos, se procedió a la adición de 100 µl de XTT e incubación durante 6 h en la estufa con 5% de CO₂ a 37°C. La valoración de la absorbancia emitida fue realizada en un lector automático de microplacas, de manera que el número de células por pocillo fue proporcional a la absorbancia obtenida.

IV. 2. 5. DETERMINACIÓN DEL IL-2R α EN CÉLULAS A375 Y PBMCs POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La determinación del IL-2R α se realizó mediante inmunofluorescencia directa. Después de los tratamientos, las células (10⁶) fueron incubadas con 5 µl del anticuerpo anti-IL-2R α marcado con PE-Cy7 a temperatura ambiente, durante 30 min. Una vez finalizada la incubación, las células fueron lavadas con la solución PBS-0.1% azida sódica-1% SBF y se centrifugó a 500 g durante 5 min. Posteriormente, las células marcadas fueron fijadas con 100 µl de la solución formaldehído al 2% en PBS a 4°C y el porcentaje de células positivas y la fluorescencia emitida fue determinada mediante citometría de flujo. Los resultados se expresaron como intensidad de fluorescencia de las células que presentaron el anticuerpo menos la intensidad en su ausencia, indicando los valores en UA.

IV. 2. 6. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO / SECRECIÓN DE LA IL-2 EN LAS CÉLULAS A375

La determinación de la cantidad de IL-2 presente en el medio se realizó utilizando el kit Quantikine®. Tras la exposición de las células a los distintos tratamientos, se recogió el medio de cultivo, y se procedió a la centrifugación a 1000 g durante 10 min. Posteriormente, el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

En el momento de la valoración, se añadió 100 µl de diluyente a los pocillos de la microplaca –placa cubierta de anticuerpo monoclonal murino anti-IL-2 humana–. A continuación, se añadió a los pocillos 100 µl de la muestra a valorar. Esta placa se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Posteriormente, se retiró la solución y se lavó 3 veces con la solución tampón. Una vez realizados los lavados, se añadió a los pocillos 200 µl del conjugado de la IL-2, e incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se retiró el conjugado y se procedió al lavado con la solución tampón. A continuación, se añadió 200 µl de la solución sustrato y se incubó durante 20 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación, se añadió a cada pocillo 50 µl de la solución de parada de la reacción y se midió en el lector automático de microplaca dentro de los 30 min. Los resultados fueron expresados en pg/ml.

IV. 2. 7. PROTOCOLO QUIRÚRGICO PARA LA INDUCCIÓN DE METÁSTASIS EXPERIMENTALES HEPÁTICAS DEL MELANOMA B16F10

IV. 2. 7. 1. Preparación de las suspensiones celulares para su inoculación en los animales

Para la inoculación a los animales, las células del melanoma B16F10 fueron resuspendidas en una disolución de HBSS y el tampón Hepes (15 mM) a una concentración de 2.5×10^6 células por ml.

IV. 2. 7. 2. Inoculación intraesplénica de las células tumorales

Los animales fueron anestesiados mediante la administración intraperitoneal (ip) de pentobarbital sódico (Nembutal[®]), a una dosis de 60 mg/Kg. Se dispusieron en decúbito lateral derecho, y tras la limpieza de la pared abdominal, se realizó una incisión subcostal izquierda. Se evisceró el bazo con una tracción cuidadosa de su pedículo y se pasó un hilo de sutura por debajo de la arteria y vena esplénicas, aislando de este modo el pedículo esplénico sin ligarlo [Figura 16].



Figura 16. Inoculación intraesplénica de las células B16F10 en ratones C57BL/6.

Se procedió a la inoculación de 2.5×10^5 células en 0.1 ml de la suspensión celular con una jeringa de 25 G. Se aplicó espongotan[®] en la zona de la inoculación.

IV. 2. 7. 3. Esplenectomía

A los 5 min de la inoculación de las células tumorales se anuda la sutura ligando, de este modo, el pedículo esplénico. Se realizó la extracción del bazo cortando su pedículo. Posteriormente, se cerró la cavidad abdominal en un sólo plano con hilo de seda trenzada de 3/0 (Prolene[®]).

IV. 2. 8. ADMINISTRACIÓN DE LOS FÁRMACOS

Todos los fármacos utilizados, una vez pesada la dosis a administrar, se disolvieron en suero fisiológico y se administraron a los animales vía ip. Previamente, los ratones fueron pesados, adecuando la dosis a administrar al peso del animal.

IV. 2. 9. EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA, TOXICIDAD E ÍNDICE ACTIVIDAD / TOXICIDAD

IV. 2. 9. 1. Evaluación de la supervivencia

Los animales fueron vigilados de forma diaria, mañana y tarde, realizándose la evaluación de la supervivencia en días, desde el momento de la inoculación tumoral hasta la muerte.

El Incremento de la Supervivencia (IS) se calculó según la fórmula,

$$IS = (T/C) \times 100$$

donde T y C son la media de la supervivencia en días de los grupos tratados y control, respectivamente (Prezioso, 1992).

Al igual que lo establecido por otros autores (Guilbaud, 1996), se procedió también a la cuantificación de los animales que presentaron un Largo Tiempo de Supervivencia (LTS), el cual fue establecido en un periodo de tiempo ≥ 50 días.

IV. 2. 9. 2. Determinación de la toxicidad

Los parámetros que se utilizaron para determinar la toxicidad en los ratones fueron la pérdida de peso, la toxicidad hematológica y la toxicidad letal.

IV. 2. 9. 2. 1. Evaluación de pérdida de peso de los animales

Para evaluar las modificaciones de peso, todos los animales fueron pesados los días 1, 9, 15 y 30 después de la inoculación tumoral.

Las Modificaciones del Peso del Animal (MPA) se relativizaron al día 1 del inicio del tratamiento según la fórmula:

$$\text{MPA} = \frac{\text{Media del peso día } i}{\text{Media del peso día 1}} \times 100$$

donde i corresponde al día 9 (día siguiente de finalizar el tratamiento), o bien, al día 15 o 30 postinoculación tumoral para la evaluación de la evolución del peso de los animales durante el experimento (Prezioso, 1992). Asimismo, se determinó la máxima pérdida de peso (MPP) del animal alcanzado durante el estudio.

IV. 2. 9. 2. 2. Evaluación de la toxicidad hematológica

La evaluación de los parámetros hematológicos se llevó a cabo al día siguiente de finalizado el tratamiento (día 9). Para ello, se procedió a la extracción de sangre a 5 ratones de cada grupo, elegidos aleatoriamente.

IV. 2. 9. 2. 3. Determinación de la toxicidad letal

Durante los tratamientos *in vivo*, los animales fueron vigilados diariamente para la evaluación de la toxicidad letal, la cual fue determinada cuando la muerte del animal se produjo durante el tiempo de tratamiento, o bien tras finalizar el mismo cuando el peso hepático era inferior a 1.2 ± 0.05 g –peso medio del hígado en ratones C57BL/6 sanos–.

IV. 2. 9. 3. Determinación del Índice Actividad / Toxicidad

Para la evaluación del beneficio terapéutico obtenido por los tratamientos se calculó el índice actividad / toxicidad (IAT) según la siguiente fórmula:

$$\text{IAT} = [T_S / C_S] \times [(T_{\text{leuco}} / C_{\text{leuco}})^{1/2}]$$

donde T_S y C_S son la media de supervivencia en días de los grupos tratados y control, y T_{leuco} y C_{leuco} son la media de los leucocitos de los grupos tratados y control, respectivamente, en el día 9 tras la inoculación tumoral. Los valores IAT mayores de 1 indican un índice terapéutico positivo.

IV. 3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Para llevar a cabo los objetivos planteados previamente, se establecieron los procedimientos experimentales *in vitro* e *in vivo* que a continuación se relacionan.

IV. 3. 1. ESTUDIOS *IN VITRO*

IV. 3. 1. 1. Estudio del efecto del NAC, BSO y OTZ sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma B16F10 y A375

Las células B16F10 fueron tratadas con los moduladores del GSH a diferentes concentraciones con el fin de determinar la concentración óptima.

Los agentes moduladores del GSH, las concentraciones y los tiempos de exposición utilizados fueron los siguientes:

1. NAC: 5 y 10 mM durante 4 h
2. BSO: 50 y 100 μ M durante 24 h
3. OTZ: 0.5, 1, 1.5, 2.5 y 5 mM durante 48 h

En lo que se refiere a las células A375, éstas fueron tratadas con OTZ a concentraciones de 1, 2.5 y 5 mM durante 48 h con el fin de determinar la concentración óptima.

IV. 3. 1. 2. Estudio del efecto de la acroleína (AC) sola y en combinación con NAC, BSO y OTZ sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma B16F10 y A375

En estos ensayos experimentales, las células fueron tratadas con dosis bajas (0.03 μM) de AC durante 1 h. En los tratamientos combinados, el tratamiento de los moduladores fue previo al tratamiento con AC, con diferentes tiempos de exposición y a la concentración óptima dependiendo del tipo de modulador.

IV. 3. 1. 3. Determinación de la expresión del IL-2R α en las células A375 y PBMCs humanas

En este estudio se determinó si la línea de melanoma A375 expresaba de manera constitutiva el IL-2R α e, igualmente, la expresión de dicho receptor en las PBMCs estimuladas con PHA-M.

IV. 3. 1. 4. Estudio del efecto de la IL-2 sola y en combinación con OTZ sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma B16F10, A375 y PBMCs humanas

En los estudios *in vitro* llevados a cabo con la IL-2, se empleó una dosis de 200 UI/ml. En los tratamientos combinados OTZ + IL-2, el tratamiento con OTZ fue previo a la adición de IL-2 a los cultivos celulares. Estos ensayos fueron realizados en un medio de cultivo con SBF al 2%.

En los estudios con la línea de melanoma B16F10, se utilizó el tratamiento con OTZ (1mM, durante 1h), IL-2 (200 UI/ml) y OTZ + IL-2, y se determinaron los niveles de GSH y proliferación a diferentes tiempos de exposición.

En los ensayos con la línea de melanoma A375, se utilizó el tratamiento con OTZ (2.5 mM, durante 1h), IL-2 (200 UI/ml) y OTZ + IL-2, e igualmente, se determinaron los niveles de GSH y proliferación a diferentes tiempos de exposición.

Las PBMCs fueron inicialmente estimuladas con PHA-M durante 4 h tras el cual se aplicó el tratamiento con OTZ (2.5 mM), IL-2 (200 UI/ml) y OTZ + IL-2, y, de la misma manera, se determinaron los niveles de GSH y proliferación a diferentes tiempos de exposición.

IV. 3. 1. 5. Estudio del efecto de la IL-2 sola y en combinación con OTZ sobre la expresión del IL-2R α en las células del melanoma A375 y PBMCs humanas

Estos ensayos utilizando las células de melanoma A375 y las PBMCs humanas fueron realizados siguiendo el protocolo utilizado en el punto anterior.

IV. 3. 1. 6. Estudio del efecto de la IL-2 sola y en combinación con OTZ sobre el consumo / secreción de IL-2 en las células del melanoma humano A375

En estos estudios, las células A375 fueron tratadas con OTZ (2.5 mM), IL-2 (200 UI/ml) y OTZ + IL-2 durante 24 h, y se determinó el efecto de dichos tratamientos en el consumo / secreción de la IL-2.

IV. 3. 2. ESTUDIOS *IN VIVO*

En el manejo de los animales, dada la utilización de técnicas que incluyen la intervención quirúrgica y la administración de drogas que 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). Asimismo, se han seguido las directrices de la Directiva del Consejo 86/609/CEE sobre la protección de los animales de experimentación promulgada en España por el Real Decreto 223/1988.

En todos los animales se procedió a la inducción de metástasis hepáticas del melanoma B16F10. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en series de 10 individuos, para posteriormente recibir el tratamiento correspondiente, tras el cual fueron vigilados diariamente para el estudio de la supervivencia y de la toxicidad.

A la muerte de cada animal se practicó la autopsia para la evaluación macroscópica de la afectación tumoral.

IV. 3. 2. 1. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA Y TOXICIDAD DE LOS RATONES TRATADOS CON OTZ DE FORMA INMEDIATA TRAS LA INOCULACIÓN INTRAESPLÉNICA DE LAS CÉLULAS DEL MELANOMA B16F10

La finalidad de este estudio fue conocer el efecto del OTZ sobre la supervivencia de los animales inoculadas con las células del melanoma B16F10, así como examinar las dosis óptimas de dicho agente.

Se establecieron las siguientes series de animales:

Serie 0: Control

Serie 1: OTZ 1 mmol/kg

Serie 2: OTZ 2.5 mmol/kg

Serie 3: OTZ 5 mmol/kg

El tratamiento con OTZ fue administrado mediante una dosis diaria desde el día 0 (5 h después de la inoculación intraesplénica de las células tumorales) hasta el día 8 postinoculación tumoral [Figura 17].

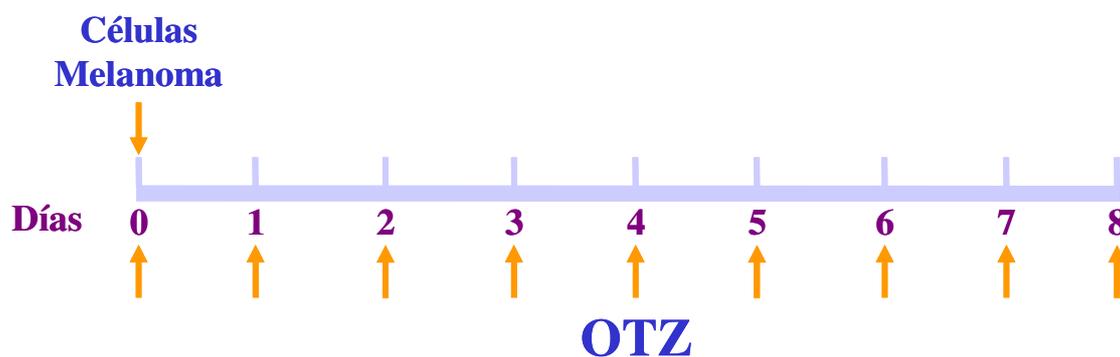


Figura 17. Esquema del tratamiento con OTZ administrado de forma diaria tras la inoculación tumoral.

IV. 3. 2. 2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL OTZ Y BSO SOBRE LOS NIVELES DE GSH DE LAS PBMCS DE RATÓN. INFLUENCIA DE ESTOS MODULADORES SOBRE LA CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR DOSIS LETALES DE CY

Con el fin de conocer el efecto del OTZ (2.5 mmol/kg) y del BSO (200 mg/kg) sobre el contenido de GSH en las células sanas, se realizó una cinética de los niveles de este tripéptido en las PBMCS de los ratones tras recibir dichos tratamientos. Dichas mediciones fueron llevadas a cabo (según el método del apartado IV. 2. 3. 3.) a la 1, 2, 4 y 8 h en el caso del tratamiento con OTZ, y a la 1, 2, 4, 8, 16 y 24 h tras el tratamiento con BSO.

Asimismo, se estudió el efecto de estos agentes sobre la disminución del GSH inducida en dichas células por dosis letales de CY. Para ello se establecieron los siguientes grupos experimentales:

Serie 0: Control

Serie 1: CY

Serie 2: OTZ + CY

El tratamiento con OTZ (2.5 mmol/kg) fue administrado 2 h antes y 30 min después del tratamiento con 500 mg/kg de CY.

IV. 3. 2. 3. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA Y TOXICIDAD DE LOS RATONES CON METÁSTASIS HEPÁTICAS DEL MELANOMA B16F10 TRATADOS CON IL-2 SOLA Y EN COMBINACIÓN CON OTZ

Con el objetivo de conocer el efecto terapéutico del tratamiento OTZ + IL-2, se establecieron las siguientes series experimentales:

Serie 0: Control

Serie 1: IL-2

Serie 2: OTZ (pauta continua, pc)

Serie 3: OTZ (pauta discontinua, pd)

Serie 4: OTZ (pc) + IL-2

Serie 5: OTZ (pd) + IL-2

La IL-2 fue administrada diariamente en una dosis única de 50000 UI, desde el día 3 al 8 postinoculación tumoral [Figura 18A].

El tratamiento con OTZ fue administrado con una dosis de 2.5 mmol/kg. En las series 2 y 4, el OTZ se administró de forma continua en una dosis única desde el día 3 al día 8 [Figura 18B-18D]. En las series 3 y 5, el OTZ fue administrado de forma discontinua los días 3, 6 y 8 [Figura 18C-18E].

En el tratamiento combinado, el OTZ fue administrado 2 h antes del tratamiento con IL-2.

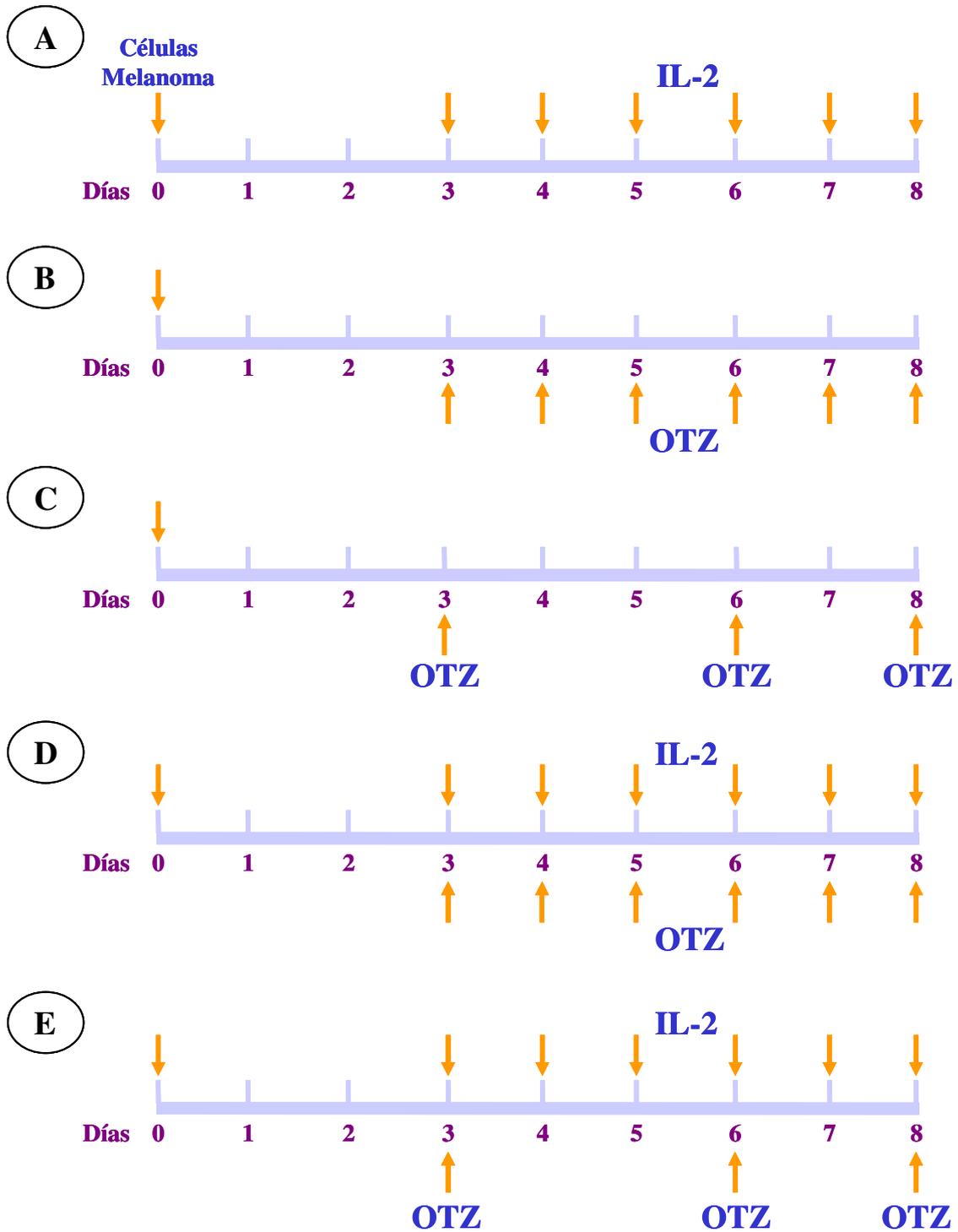


Figura 18. Esquema de las pautas de administración con IL-2 (A), OTZ (pc, B), OTZ (pd, C), OTZ (pc) + IL-2 (D) y OTZ (pd) + IL-2 (E).

IV. 3. 2. 4. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA Y TOXICIDAD DE LOS RATONES CON METÁSTASIS HEPÁTICAS DEL MELANOMA B16F10, TRATADOS CON DOSIS ALTAS DE CY SOLA Y EN COMBINACIÓN CON BSO Y OTZ

El objetivo de este estudio fue conocer la influencia de los moduladores de GSH, OTZ y BSO sobre el efecto terapéutico de la CY. Para ello, las diferentes series recibieron los siguientes tratamientos:

Serie 0: Control

Serie 1: CY

Serie 2: OTZ (pd)

Serie 3: BSO

Serie 4: OTZ (pd) + CY

Serie 5: BSO + CY

El tratamiento con CY consistió en un único ciclo administrando 250 mg/kg los días 3 y 8 tras la inoculación tumoral, siguiendo el protocolo utilizado por otros autores (Palomares, 1995) [Figura 19A].

El OTZ (2.5 mmol/kg) fue administrado los días 3 y 8, en doble dosis (2 h antes y 30 min después del tratamiento con CY), y en una única dosis el día 6 [Figura 19B-19D].

El tratamiento con BSO (200 mg/kg) fue administrado en una única dosis, 16 h antes del tratamiento con CY, esto es, los días 2 y 7 postinoculación tumoral, siguiendo la pauta descrita por otros autores [Figura 19C-19E].

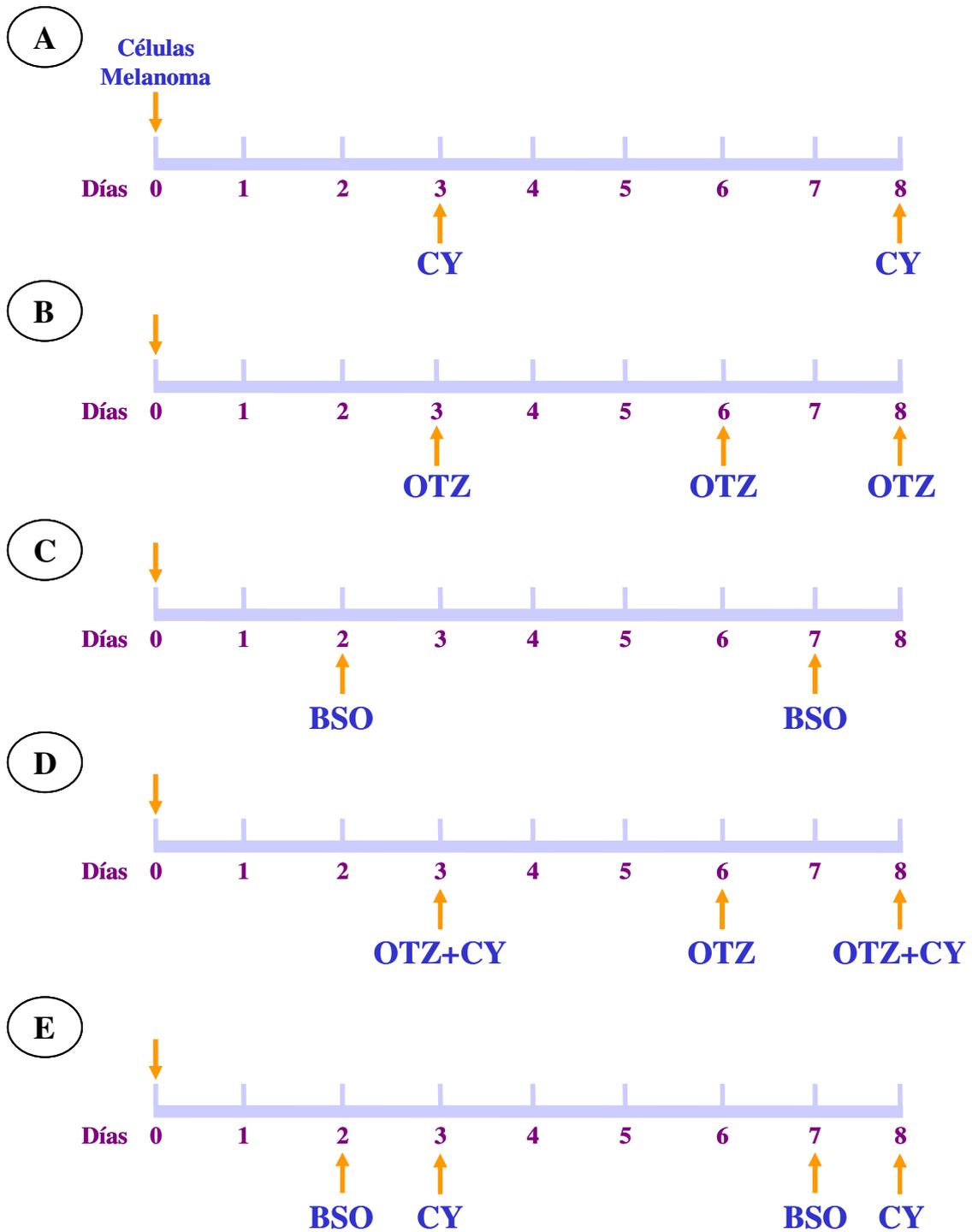


Figura 19. Esquemas de las pautas de administración con CY (A), OTZ (pd, B), BSO (C), OTZ (pd) + CY (D) y BSO + CY (E).

IV. 3. 2. 5. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE OTZ SOBRE EL TRATAMIENTO BIOQUIMIOTERÁPICO CON INTENSIFICACIÓN DE DOSIS DE CY E IL-2: ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA Y TOXICIDAD DE LOS RATONES CON METÁSTASIS HEPÁTICAS DEL MELANOMA B16F10

El presente estudio experimental se planteó con el objetivo de conocer si la modulación de GSH, a través del tratamiento con OTZ, puede obtener un mayor beneficio terapéutico del tratamiento bioquimioterápico con CY + IL-2, así como permitir llevar a cabo una intensificación de dosis de CY. Para ello, se establecieron los siguientes grupos experimentales:

Gupo I:

- Control
- CY 50 mg/Kg
- CY + IL-2
- OTZ + CY
- OTZ + CY + IL-2

Gupo II:

- Control
- CY 250 mg/Kg
- CY + IL-2
- OTZ + CY
- OTZ + CY + IL-2

Gupo III:

- Control
- CY 500 mg/Kg
- CY + IL-2
- OTZ + CY
- OTZ + CY + IL-2

En este estudio, los diferentes tratamientos fueron administrados con la siguiente pauta:

- La CY fue administrada en una dosis única los días 3 y 8 tras la inoculación de las células tumorales.
- El OTZ (2.5 mmol/kg) se administró de forma discontinua, los días 3 y 8, en doble dosis, 2 h antes y 30 min después del tratamiento con CY, y una única dosis el día 6.
- El tratamiento con IL-2 (50000 UI/ml) fue administrado de forma secuencial al tratamiento con CY. Así, se procedió a su administración diaria en dosis única desde el día 4 al día 7 postinoculación tumoral. En las series en las que el tratamiento con IL-2 se combinó con OTZ, la IL-2 fue administrada 2 h después de dicho tratamiento [Figura 20].

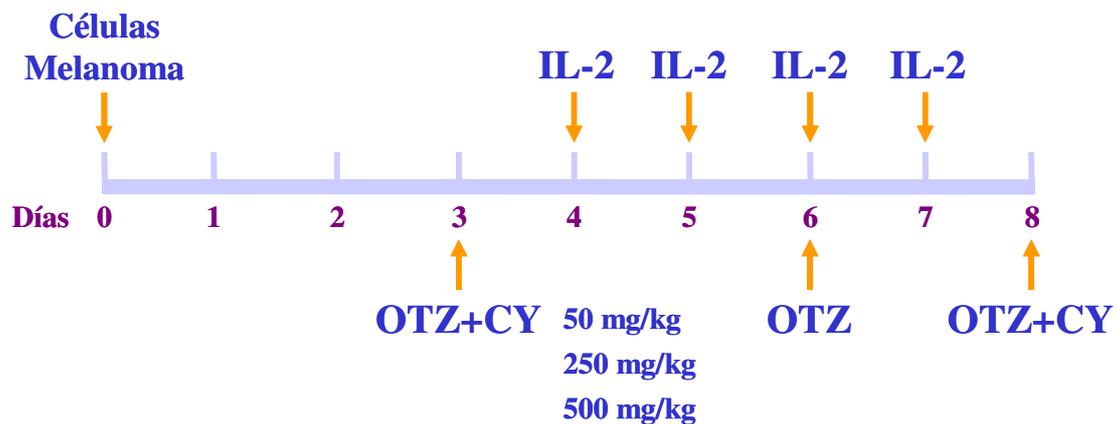


Figura 20. Esquema de la pauta de administración del OTZ + IL-2 en combinación con la CY.

IV. 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

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™ 2.01), a excepción de los resultados de citometría de flujo que fueron procesados empleando el programa informático WinMDi 2.8.

IV. 4. 1. *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,

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

IV. 4. 2. 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.

IV. 4. 3. 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.

IV. 4. 4. 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.

IV. Material y Métodos

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.

IV. 4. 5. *Correlación y regresión*

La *correlación* trata de estudiar la relación o dependencia entre dos variables que intervienen en una distribución y la *regresión* consiste en ajustar lo más posible los puntos de un diagrama de dispersión a una curva. La relación entre dos variables puede ser *lineal*, *polinómica* (*cuadrática*, *cúbica*), *exponencial*, etc.

IV. 4. 5. 1. *Correlación simple y regresión lineal*

Si cada una de las variables, x e y , parecen encontrarse cerca de una recta ($y = ax + b$) se dice que la *correlación* es lineal, y el *coeficiente de correlación* lineal o *coeficiente de Pearson* (r) lo designaremos por:

$$r = \pm \sqrt{\frac{\text{variación explicada}}{\text{variación total}}}$$

Este *coeficiente* informa del grado de relación entre dos variables. Si la relación es lineal, r será ± 1 . El *coeficiente* será positivo cuando tanto x como y se incrementan, y será negativo cuando y tiende a disminuir cuando se incrementa x . Por el contrario, no existe relación entre las variables cuando el valor de r es igual a 0.

IV. 4. 5. 2. Regresión cuadrática

La relación entre las variables puede ajustarse, también, a una función *polinómica*. Entre estas funciones está la *cuadrática* ($y = ax^2 + bx + c$) que describe una parábola.

IV. 4. 6. Análisis de supervivencia

Los objetivos de esta metodología son la estimación de la *supervivencia* de una población y la búsqueda de los factores que condicionan la distinta evolución observada dentro de un grupo. Interesa conocer en qué medida las distintas pautas terapéuticas son las responsables de las variaciones de la *supervivencia* o si esta diferencia puede ser explicada por otros factores relacionados.

El análisis estadístico del estudio de la *supervivencia* se realizó por el método de *Kaplan-Meier* y la comparación de las curvas por la prueba *Log-Rank*.

IV. 4. 6. 1. Curvas de supervivencia: método de Kaplan-Meier

La *curva de supervivencia* es la representación gráfica de la función de *supervivencia* estimada a partir de los datos. La variable tiempo se representa en el eje de abscisas y la *probabilidad de supervivencia*, expresada en porcentaje o en tanto por uno, se representa en el eje de coordenadas.

El método propuesto por *Kaplan-Meier* (1958) es el denominado del *producto límite*, que presenta la ventaja de considerar los tiempos de *supervivencia* precisos para cada caso. Este método parte de los tiempos de *supervivencia* de cada uno de los individuos de la muestra, y estima la función *supervivencia* para la población de la cual esta muestra es representativa. Con un *nivel de confianza* del 95%, la *supervivencia* en un periodo se hallará entre la *probabilidad de supervivencia* determinada $\pm 2 \times \text{error estándar}$.

IV. 4. 6. 2. Comparación de las curvas de supervivencia: Test Log-Rank

Ante la necesidad de comparar la *supervivencia* de dos grupos de individuos, diferenciados por alguna característica como son las distintas pautas terapéuticas, se utiliza el test *Log-Rank*. La hipótesis que se pone a prueba es la igualdad de *supervivencia* de dos poblaciones. Si el test resulta significativo indica que existen razones para rechazar la hipótesis de igualdad y, en consecuencia, afirmar que ambas poblaciones presentan *supervivencias* diferentes.

La idea que dirige el test es la de conocer la diferencia entre las muertes observadas en cada grupo, y las que debiera producirse si la hipótesis de igualdad se cumpliera, en cuyo caso el estadístico sería χ^2 con un *grado de libertad*,

$$\chi^2 = \frac{(O_1 - E_1)^2}{E_1} + \frac{(O_2 - E_2)^2}{E_2}$$

siendo O_1 y O_2 el número de muestras observadas, y E_1 y E_2 el número de muertes esperadas. En caso de que el valor χ^2 fuera significativo, la hipótesis nula sería rechazada.

La prueba computerizada da el valor p de la misma, que expresa el riesgo asumido al rechazar la hipótesis de igualdad de *supervivencias*, es decir, la *probabilidad* de que las diferencias sean debidas al azar.

V. 1. RESULTADOS *IN VITRO*

V. 1. 1. ESTUDIO DEL EFECTO DEL NAC, BSO Y OTZ SOBRE LOS NIVELES DE GSH Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL MELANOMA B16F10

V. 1. 1. 1. Efecto del NAC sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma B16F10

El tratamiento con NAC produjo un aumento significativo de los niveles intracelulares de GSH y de la proliferación de las células del melanoma B16F10.

El estudio del contenido intracelular de GSH tras la exposición a NAC 5, 10 y 20 mM durante 4 h, puso de manifiesto un incremento significativo ($p < 0.01$) y dosis dependiente de un 519%, 772% y 1126.5% de los niveles de GSH respecto a las células control, respectivamente [Figura 21A].

En el estudio del efecto del NAC sobre la proliferación celular, se pudo observar que, si bien no se produjeron diferencias significativas con las dosis de 5 y 20 mM, la exposición de 10 mM dio lugar a un aumento de 1.2 y 1.3 veces ($p < 0.05$) en el índice de proliferación celular a las 24 y 48 h, respectivamente, en comparación a las células control [Figura 21B].

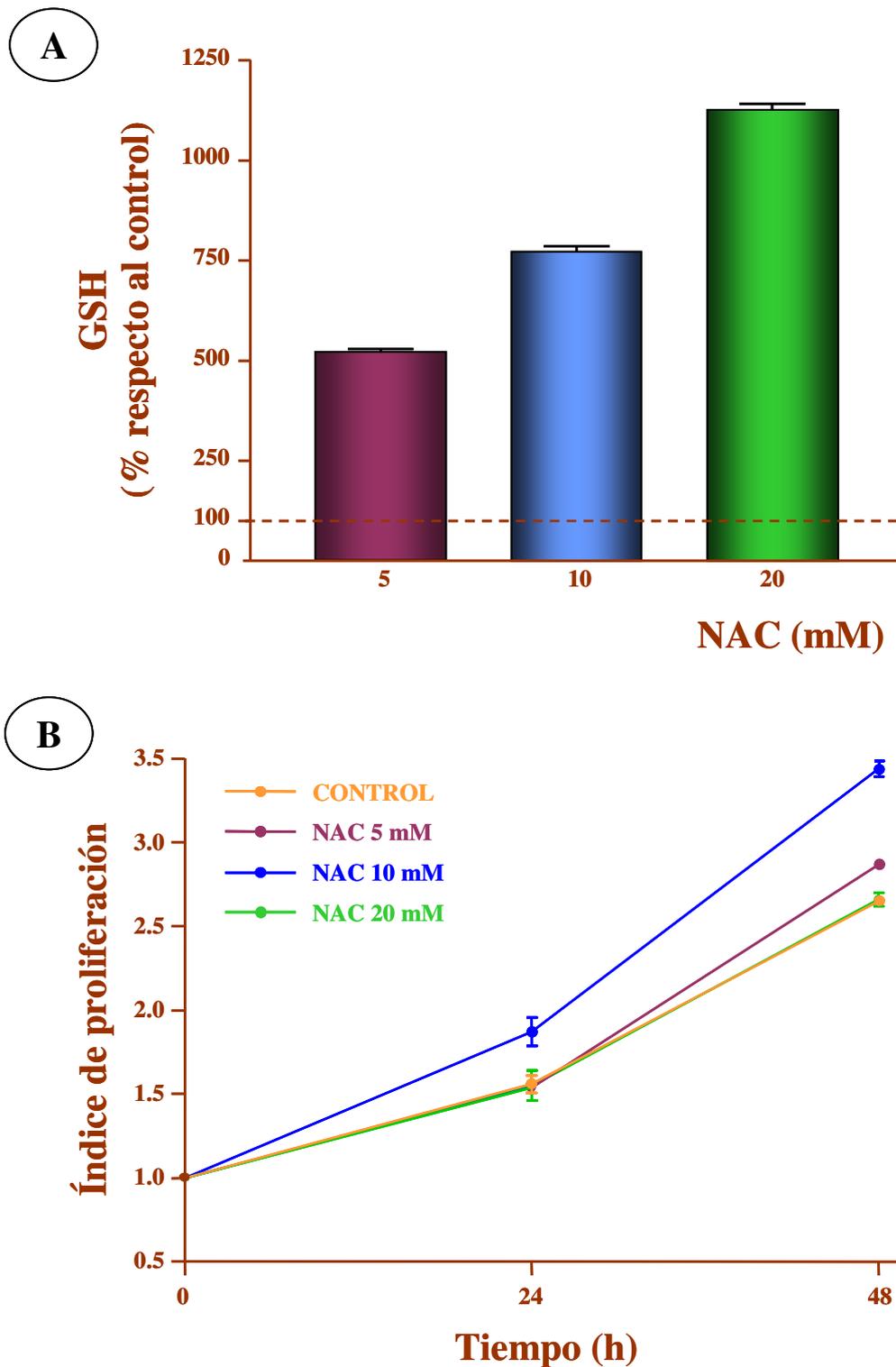


Figura 21. Efecto del NAC sobre los niveles intracelulares de GSH (A) y proliferación (B) de las células del melanoma B16F10.

V. 1. 1. 2. Efecto del BSO sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma B16F10

El tratamiento con BSO produjo una disminución significativa de los niveles de GSH y de la proliferación de las células del melanoma B16F10.

El efecto del BSO fue tiempo dependiente, aunque no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones ensayadas. Así, la medición de los niveles de GSH a 1, 4, 8 y 24 h permitió observar una disminución de dichos niveles del 0.5%, 21%, 48% ($p<0.01$) y 97.3% ($p<0.01$) tras la exposición a 50 μM , y del 0.7%, 24.1%, 53.2% ($p<0.01$) y 97% ($p<0.01$) tras el tratamiento con 100 μM de BSO [Figura 22A].

En el análisis de la proliferación celular, si bien no se observaron diferencias significativas a las 24 h de tratamiento con BSO, a las 48 h el índice de proliferación se redujo en 1.2 y 1.3 veces ($p<0.05$) con las dosis de 50 y 100 μM de BSO, respectivamente, en comparación al control [Figura 22B].

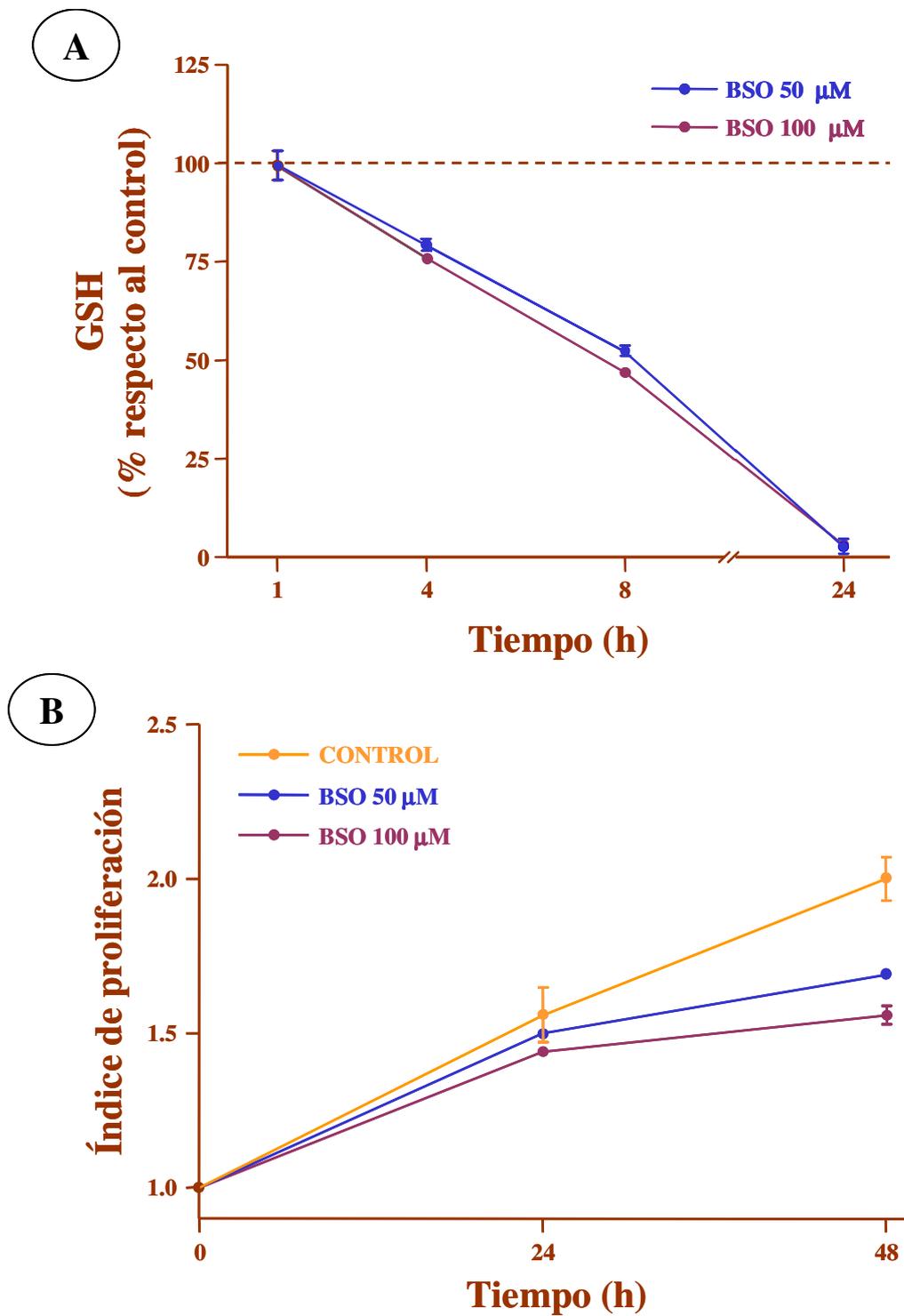


Figura 22. Efecto del BSO sobre los niveles intracelulares de GSH (A) y proliferación (B) de las células del melanoma B16F10.

V. 1. 1. 3. Efecto del OTZ sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma B16F10 y A375

El tratamiento con OTZ produjo un descenso de los niveles intracelulares de GSH y de la proliferación de ambas líneas celulares de melanoma.

El análisis del contenido intracelular de GSH, permitió observar que el tratamiento con OTZ dio lugar a una disminución del GSH en ambas líneas celulares, si bien dicho efecto no fue dosis dependiente.

Así, en el caso de la línea celular B16F10 la exposición a 0.5, 1, 1.5, 2.5 y 5 mM durante 1 h, redujo los niveles de GSH un 28.9%, 57.5% ($p<0.01$), 43.91% ($p<0.01$), 12.94% y 7.01% respecto a las células control, respectivamente [Figura 23A].

En el caso de la línea A375, el tratamiento con 1, 2.5 y 5 mM de OTZ produjo una disminución de los niveles de GSH del 13.5%, 48.7% ($p<0.01$) y 35.7% ($p<0.05$) en comparación a las células control [Figura 24A].

En base al mayor efecto del OTZ con la concentración de 1 mM, en la línea B16F10, y 2.5 mM en la línea A375, el estudio del efecto del OTZ sobre la proliferación celular se realizó con dichas concentraciones. Se pudo observar que en la línea B16F10, el tratamiento con OTZ redujo en 1.2 veces ($p<0.05$) la proliferación celular a las 48 h respecto a las células control [Figura 23B], incrementándose este valor hasta 1.7 ($p<0.01$) veces en comparación al control en la línea A375 [Figura 24B].

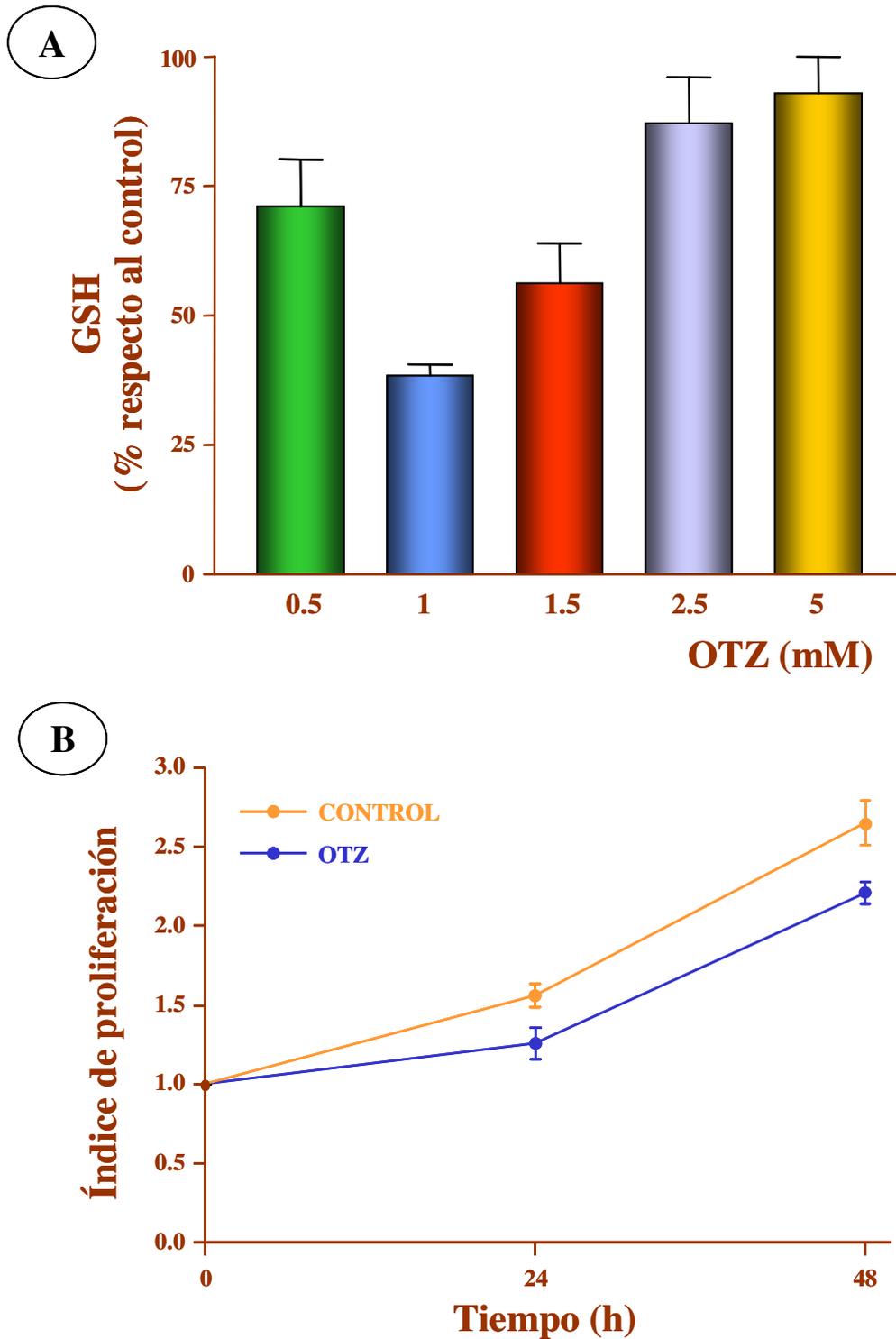


Figura 23. Efecto del OTZ sobre los niveles intracelulares de GSH (A) y proliferación (B) de las células del melanoma B16F10.

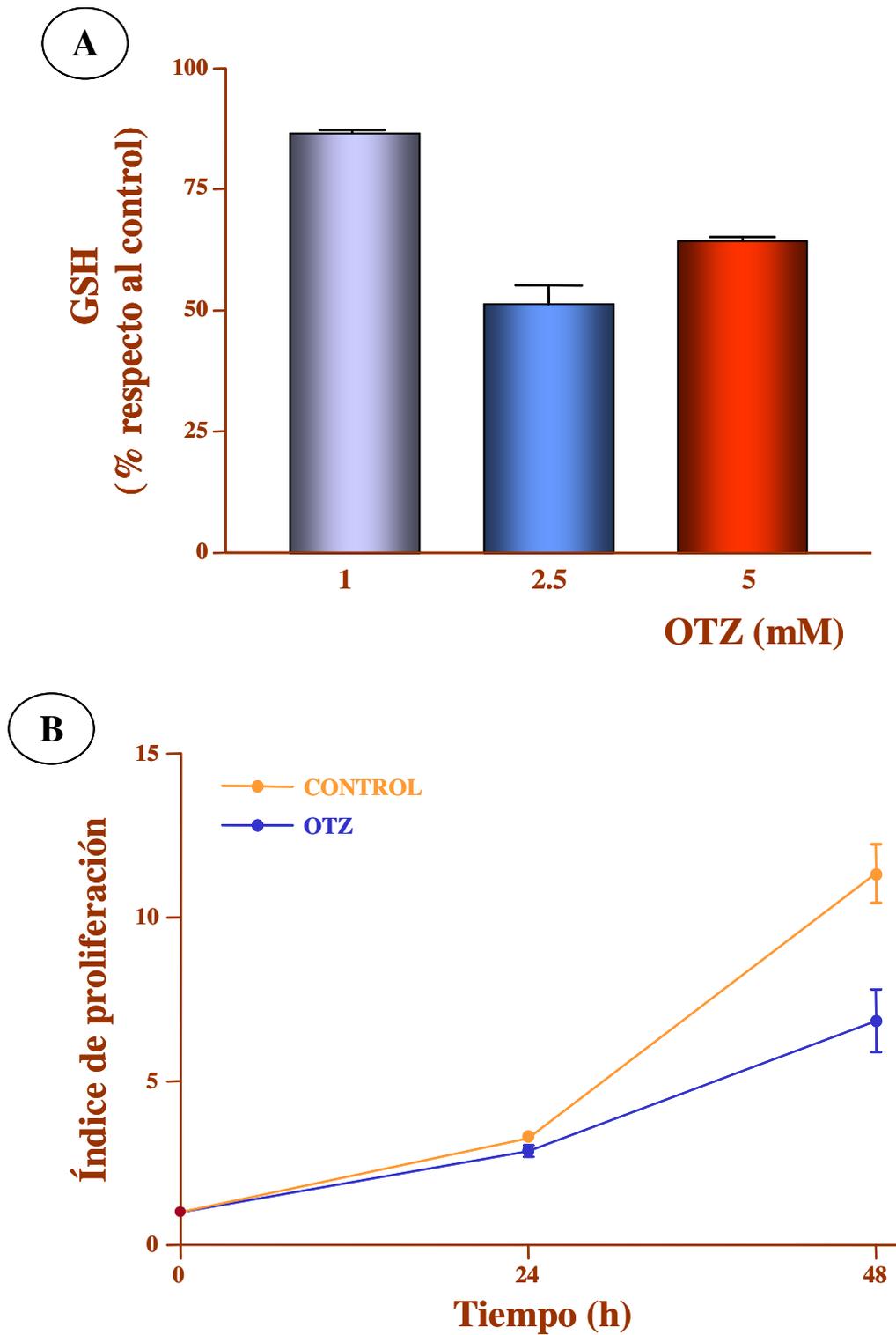


Figura 24. Efecto del OTZ sobre los niveles intracelulares de GSH (A) y proliferación (B) de las células del melanoma A375.

V. 1. 2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ACROLEÍNA (AC) SOLA Y EN COMBINACIÓN CON NAC, BSO Y OTZ SOBRE LOS NIVELES DE GSH Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL MELANOMA

V. 1. 2. 1. Efecto del AC y NAC + AC sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma B16F10

El tratamiento con AC produjo una disminución significativa en los niveles de GSH y de la proliferación celular.

En relación a los niveles de GSH, se puede observar que 1 hora tras la exposición de las células tumorales a la AC (0.03 μ M) se produjo un descenso del 90% ($p < 0.01$) de dichos niveles respecto al control [Figura 25A]. Asimismo, dicho tratamiento disminuyó 1.5 y 1.9 veces ($p < 0.01$) el índice de proliferación a las 24 h y 48 h, respectivamente, en comparación a las células control [Figura 25B].

Sin embargo, la exposición previa de las células al tratamiento con NAC (10 mM durante 4 h) protegió a las células tumorales de los efectos inducidos por la AC, no observándose diferencias significativas ni en los niveles de GSH ni en la proliferación celular entre el tratamiento combinado NAC + AC y las células control [Figura 25A-25B].

Este efecto antagonista entre el biomodulador NAC y el agente citostático AC se ve reflejado tras el cálculo del factor modificador de dosis (FMD) que da como resultado un valor de cero.

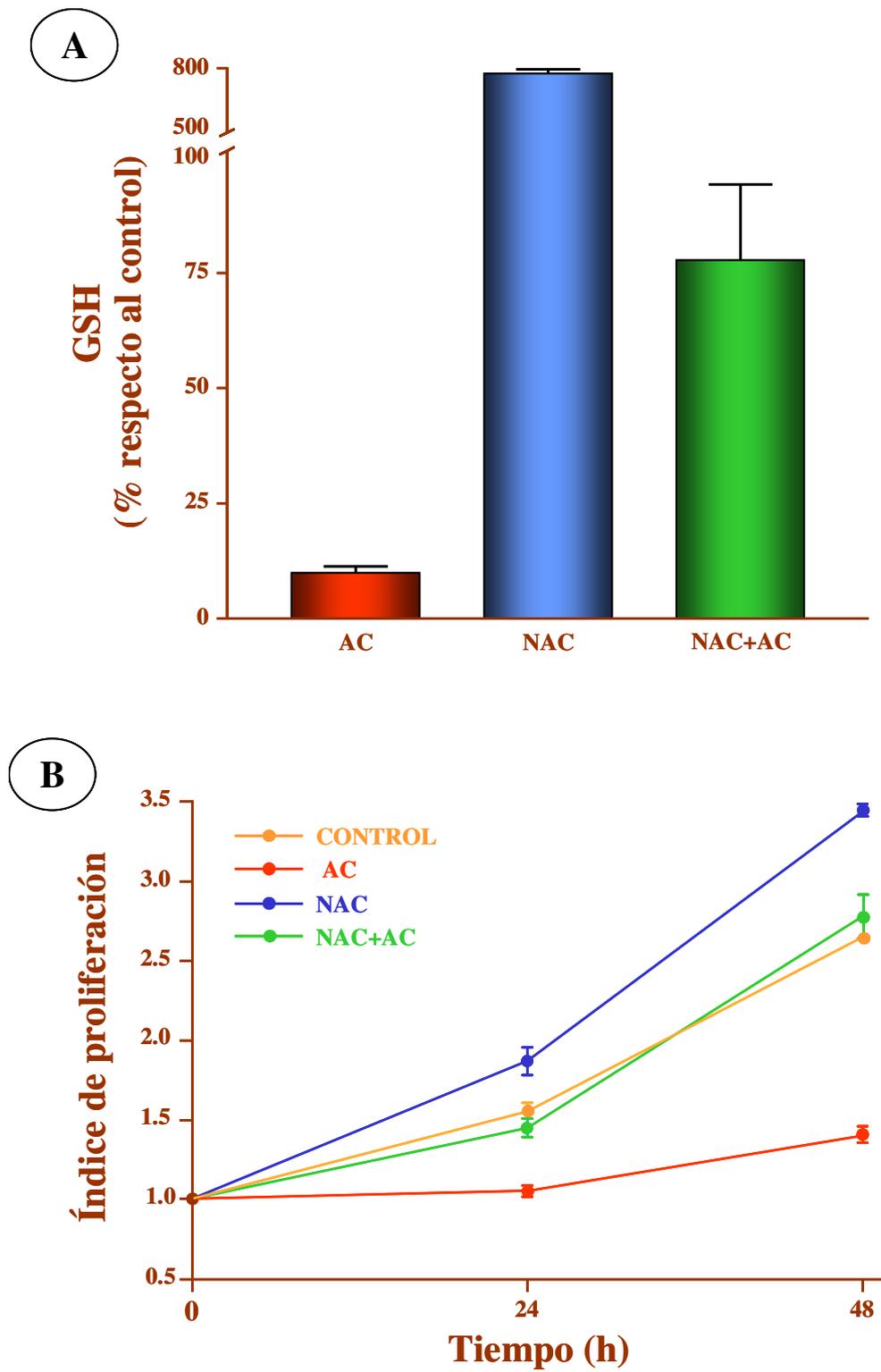


Figura 25. Efecto del NAC sobre la acción de la AC en los niveles intracelulares de GSH (A) y proliferación (B) de las células del melanoma B16F10.

V. 1. 2. 2. Efecto del AC y BSO + AC sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma B16F10

En este caso, las células fueron tratadas con AC a las 24 h de cultivo, tiempo de exposición previo necesario para el tratamiento con BSO.

Al contrario del efecto antagónico del NAC, el tratamiento previo con BSO aumentó el efecto producido por la AC sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma B16F10.

Así, a las 48 horas de cultivo, las células tratadas con AC (0.03 μ M durante 1 h) presentaban una disminución del 37% ($p < 0.05$) en los niveles de GSH y 1.2 veces en el índice proliferativo. Tras la exposición previa con BSO (50 μ M durante 24 h) al tratamiento con AC, los niveles de GSH disminuyeron un 99.5% ($p < 0.01$) y se redujo 2.5 veces ($p < 0.01$) la proliferación respecto a las células control [Figura 26A-26B].

De este modo, dicho tratamiento combinado, BSO + AC, el FMD resultó ser de 1.8, lo que indica un efecto sinérgico con dicha combinación.

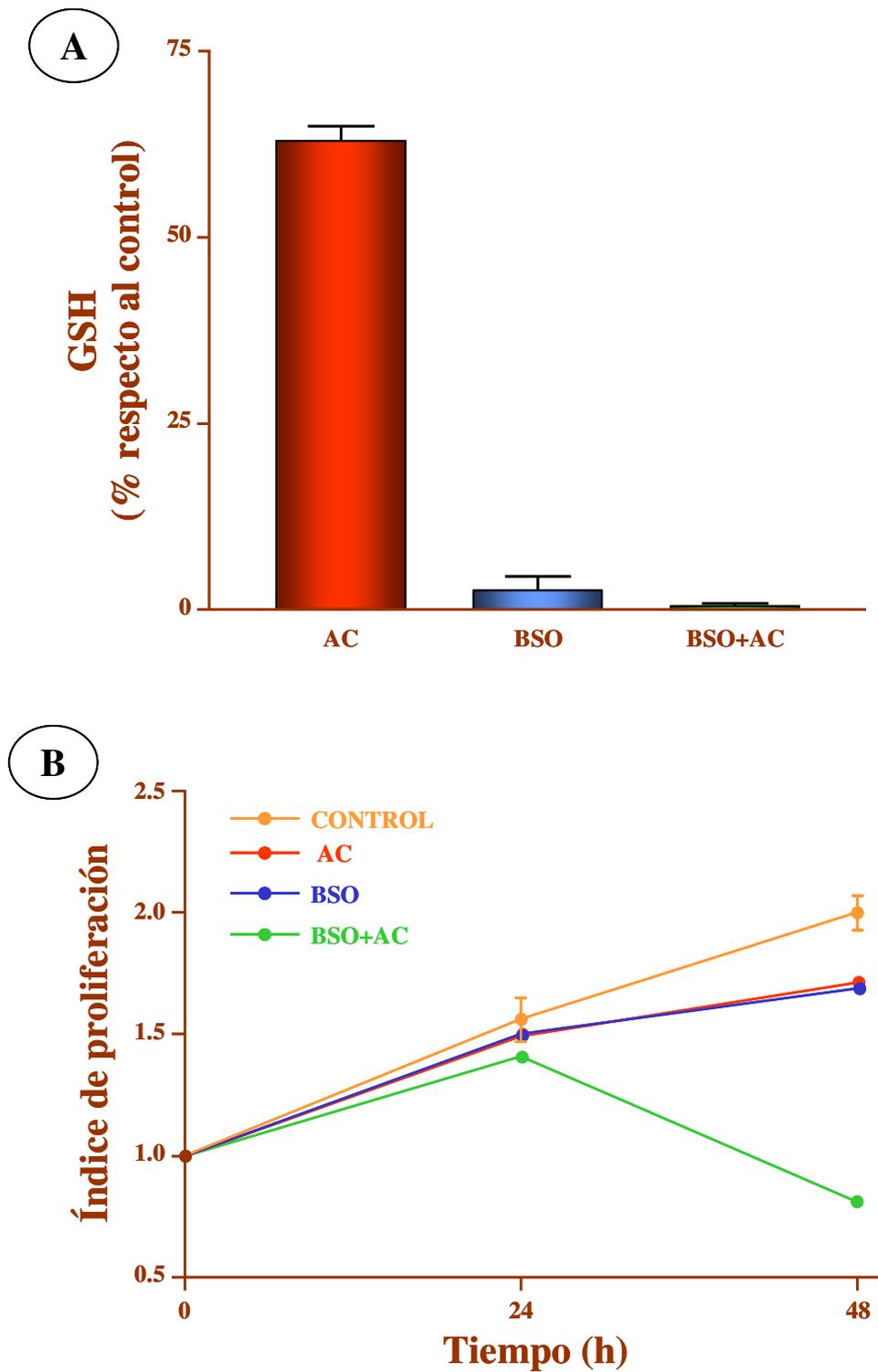


Figura 26. Efecto del BSO sobre la acción de la AC en los niveles intracelulares de GSH (A) y proliferación (B) de las células del melanoma B16F10.

V. 1. 2. 3. Efecto del AC y OTZ + AC sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma B16F10 y A375

La adición del OTZ al tratamiento con AC produjo un incremento en el efecto producido por la AC sobre los niveles de GSH y proliferación de las células del melanoma B16F10 y A375.

La exposición de las células del melanoma B16F10 a la AC (0.03 μ M durante 1 h) redujo un 90% ($p < 0.01$) los niveles de GSH respecto a las células control, mientras que con la exposición previa del OTZ (1 mM durante 1 h) al tratamiento con AC dicha reducción fue prácticamente del 100% ($p < 0.01$) [Figura 27A], reduciendo, asimismo, 2.0 y 5.2 veces ($p < 0.01$) la proliferación celular a las 24 h y 48 h, respectivamente, en comparación al control [Figura 27B].

Este tratamiento combinado OTZ + AC dio como resultado un FMD de 1.3, sugiriendo un efecto sinérgico con dicha combinación.

Por su parte, el tratamiento de las células del melanoma A375 con AC (0.03 μ M durante 1 h) disminuyó un 41.2% ($p < 0.01$) los niveles de GSH respecto al control y redujo la proliferación celular en 1.9 y 5.2 veces ($p < 0.01$) a las 24 h y 48 h, respectivamente, en comparación al control. Además, la exposición previa del OTZ a la AC redujo un 59.5% ($p < 0.01$) los niveles de GSH respecto al control, disminuyendo, del mismo modo, la proliferación celular en 2.2 y 6.7 veces ($p < 0.01$) a las 24 h y 48 h, respectivamente, en comparación al control [Figura 28A-28B].

De esta manera, el tratamiento combinado OTZ + AC en las células A375 dio lugar a un FMD de 0.7, indicando un efecto aditivo con esta combinación.

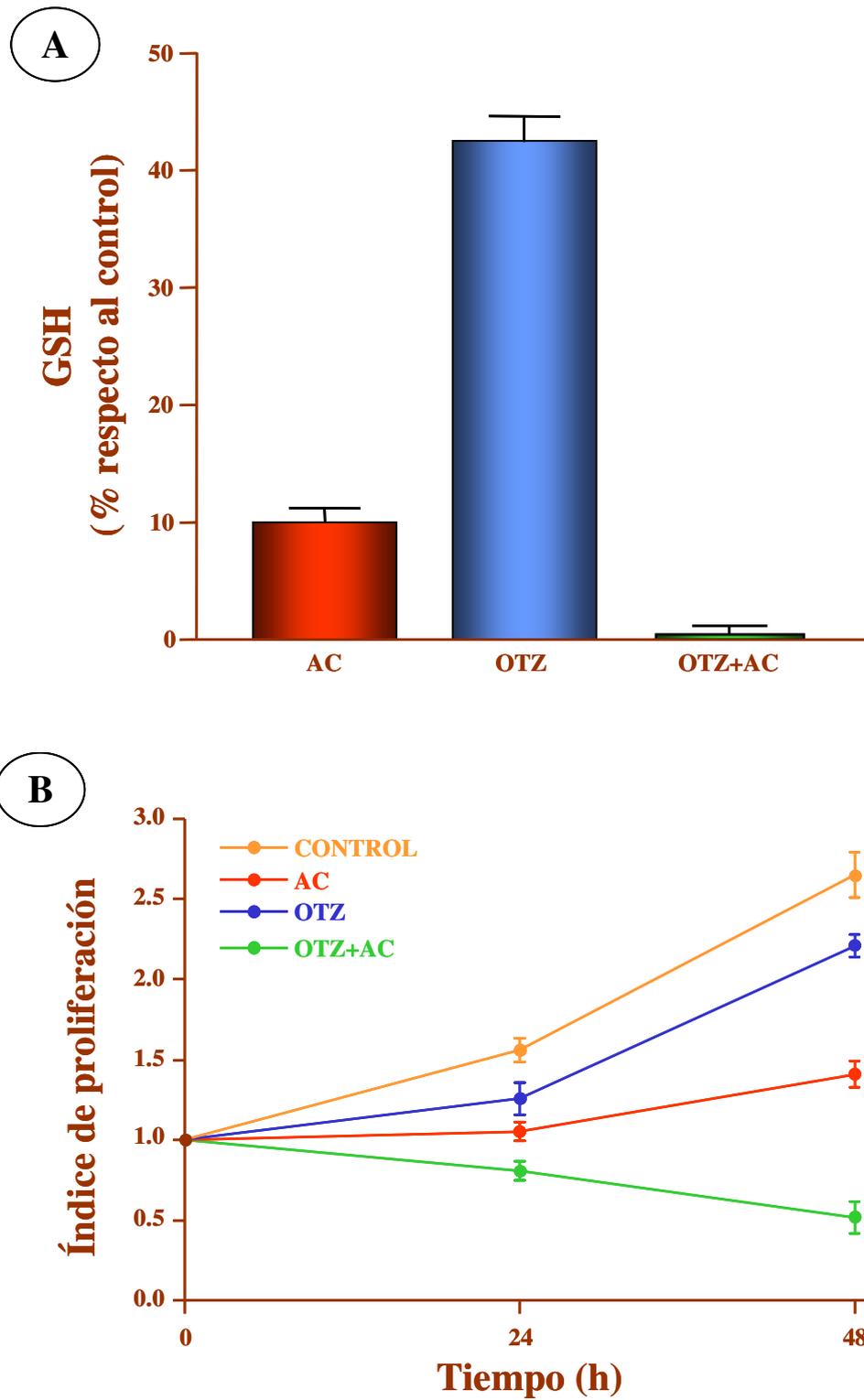


Figura 27. Efecto del OTZ sobre la acción de la AC en los niveles intracelulares de GSH (A) y proliferación (B) de las células del melanoma B16F10.

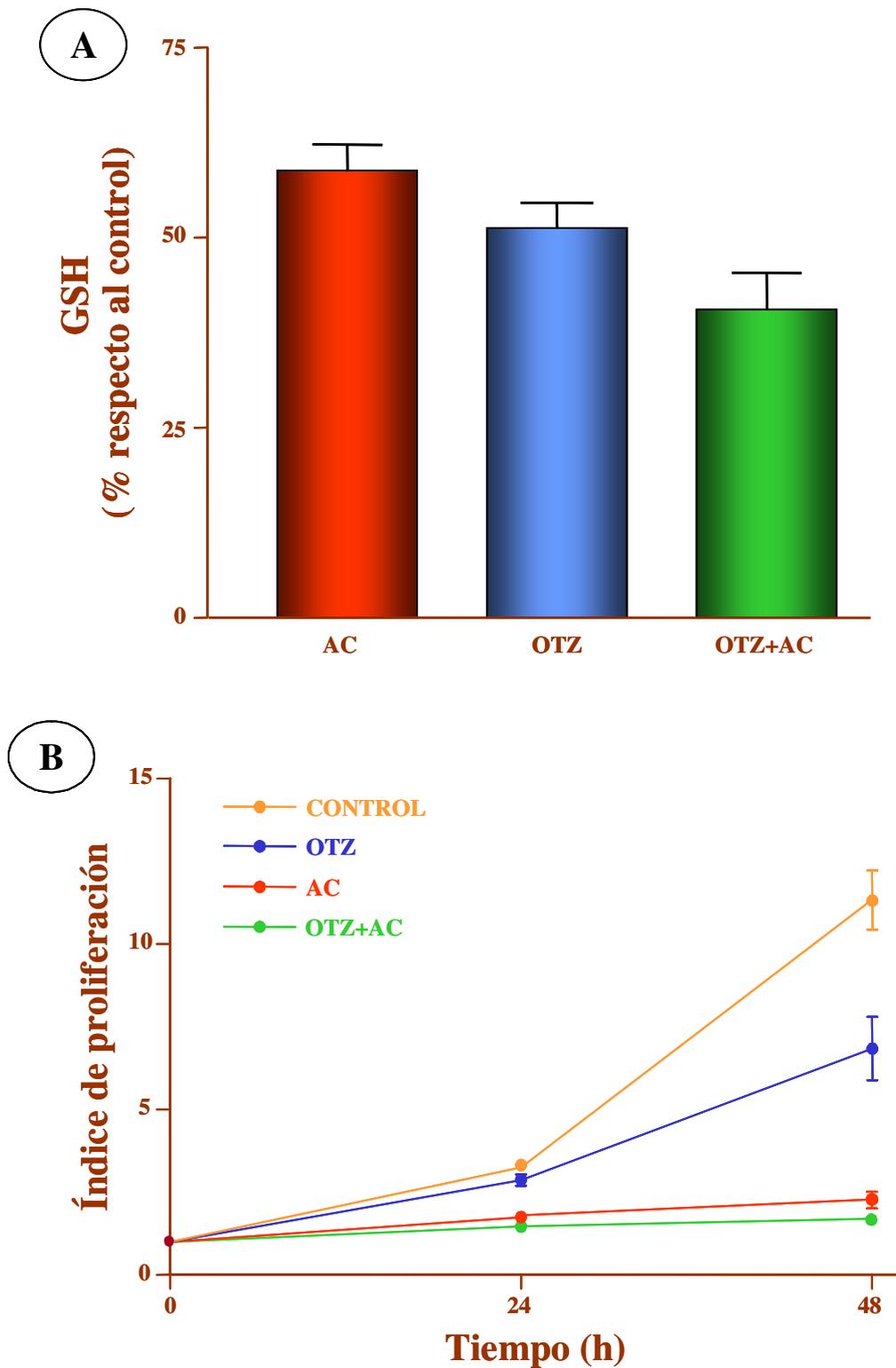


Figura 28. Efecto del OTZ sobre la acción de la AC en los niveles intracelulares de GSH (A) y proliferación (B) de las células del melanoma A375.

V. 1. 3. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL IL-2R α EN LAS CÉLULAS A375 Y PBMCs

Según han descrito otros autores (García de Galdeano, 1996), las células del melanoma B16F10 expresan IL-2R α . En el presente estudio se analizó si la línea A375 expresaba, igualmente, dicho receptor.

El análisis mediante citometría de flujo de las células marcadas con el anticuerpo anti-IL-2R α , permitió observar que el 81.5% de las células expresan el IL-2R α con una intensidad media de fluorescencia de 5.3 ± 0.5 UA [Figura 29A].

El cultivo de las PBMCs estimuladas con PHA-M durante 4 h, 5 h, 8 h y 24 h indujo la expresión del IL-2R α en un 70.22%, 71.91%, 84.55% y 96.28% de las células, con una intensidad media de fluorescencia de 21.78 ± 2.3 UA, 22.84 ± 3.1 UA, 19.68 ± 3.4 UA y 357.50 ± 22.6 UA [Figura 29B].

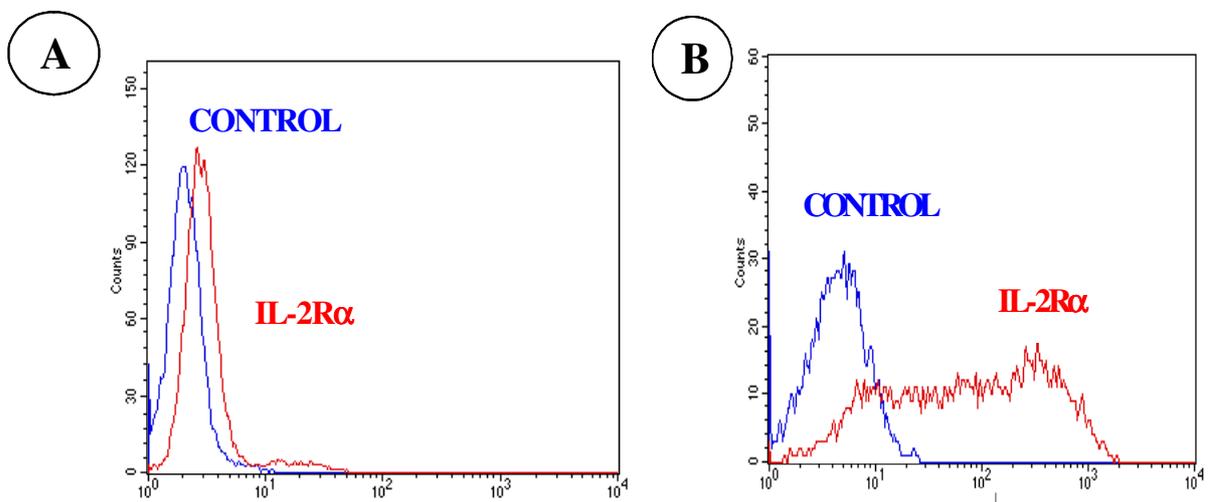


Figura 29. Expresión del IL-2R α en las células A375 (A) y PBMCs (B) a las 24 h.

V. 1. 4. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA IL-2 SOLA Y EN COMBINACIÓN CON OTZ SOBRE LOS NIVELES DE GSH Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL MELANOMA B16F10, A375 Y PBMCs HUMANAS

El tratamiento con OTZ produjo un descenso significativo de los niveles intracelulares de GSH en ambas líneas celulares de melanoma. Dicho descenso fue máximo 1 hora tras la exposición al OTZ [57.5% y 48.7% ($p < 0.01$), en la línea B16F10 y A375, respectivamente]. Del mismo modo, la exposición al tratamiento con OTZ redujo, en ambas líneas celulares, la proliferación celular 1.2 y 1.4 veces en la línea B16 F10 y A375, respectivamente, en comparación al control a las 48 h.

Por el contrario, el tratamiento con IL-2 produjo un incremento significativo del contenido intracelular de GSH y de la proliferación celular, tanto en la línea del melanoma B16F10 como en la A375. Así, la exposición a 200 UI/ml aumentó un 42% ($p < 0.01$) en las células B16F10 y un 58.8% ($p < 0.01$) en las células A375 los niveles de GSH respecto al control [Figura 30]. En el análisis de la proliferación celular, se observó que el tratamiento con IL-2 aumentó 1.2 y 1.4 veces ($p < 0.05$), en las células del melanoma B16F10 y A375, respectivamente, a las 48 h en comparación al control [Figura 31A-31B].

Sin embargo, la exposición previa de OTZ al tratamiento con IL-2, inhibió el efecto protumoral de esta interleucina en las células del melanoma. Así, el tratamiento combinado con OTZ + IL-2 produjo una disminución máxima de los niveles intracelulares de GSH del 37.4% ($p < 0.05$) en la línea B16F10 y del 55% ($p < 0.01$) en la línea A375. Igualmente, respecto al control, la proliferación celular se redujo 1.3 y 1.6 veces ($p < 0.01$) en la línea B16F10 y A375, respectivamente, a las 48 h [Figura 30-31].

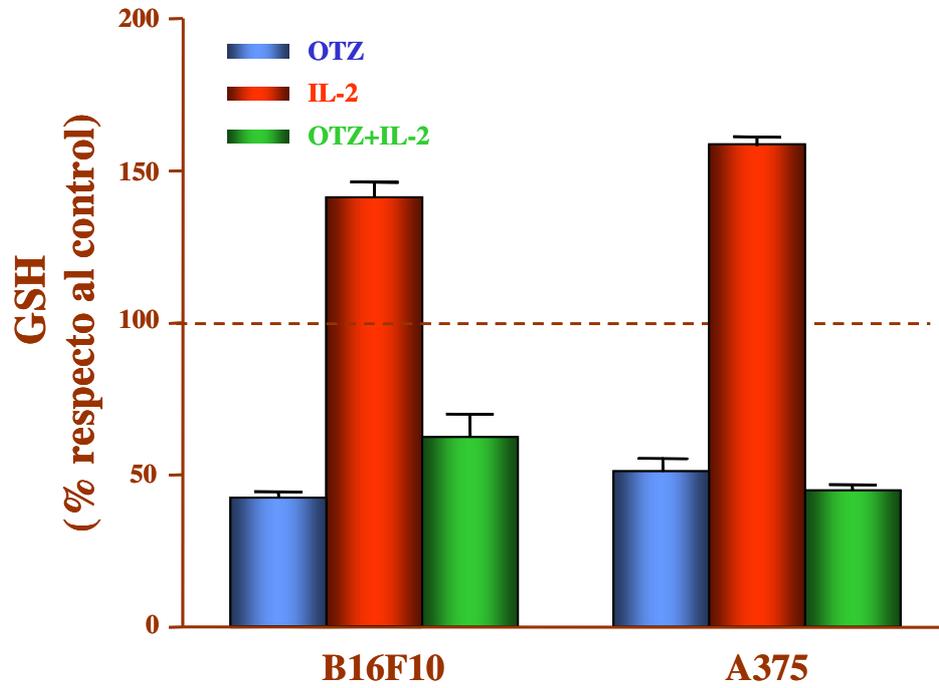


Figura 30. Efecto del OTZ e IL-2 sobre los niveles intracelulares de GSH de las células del melanoma B16F10 y A375.

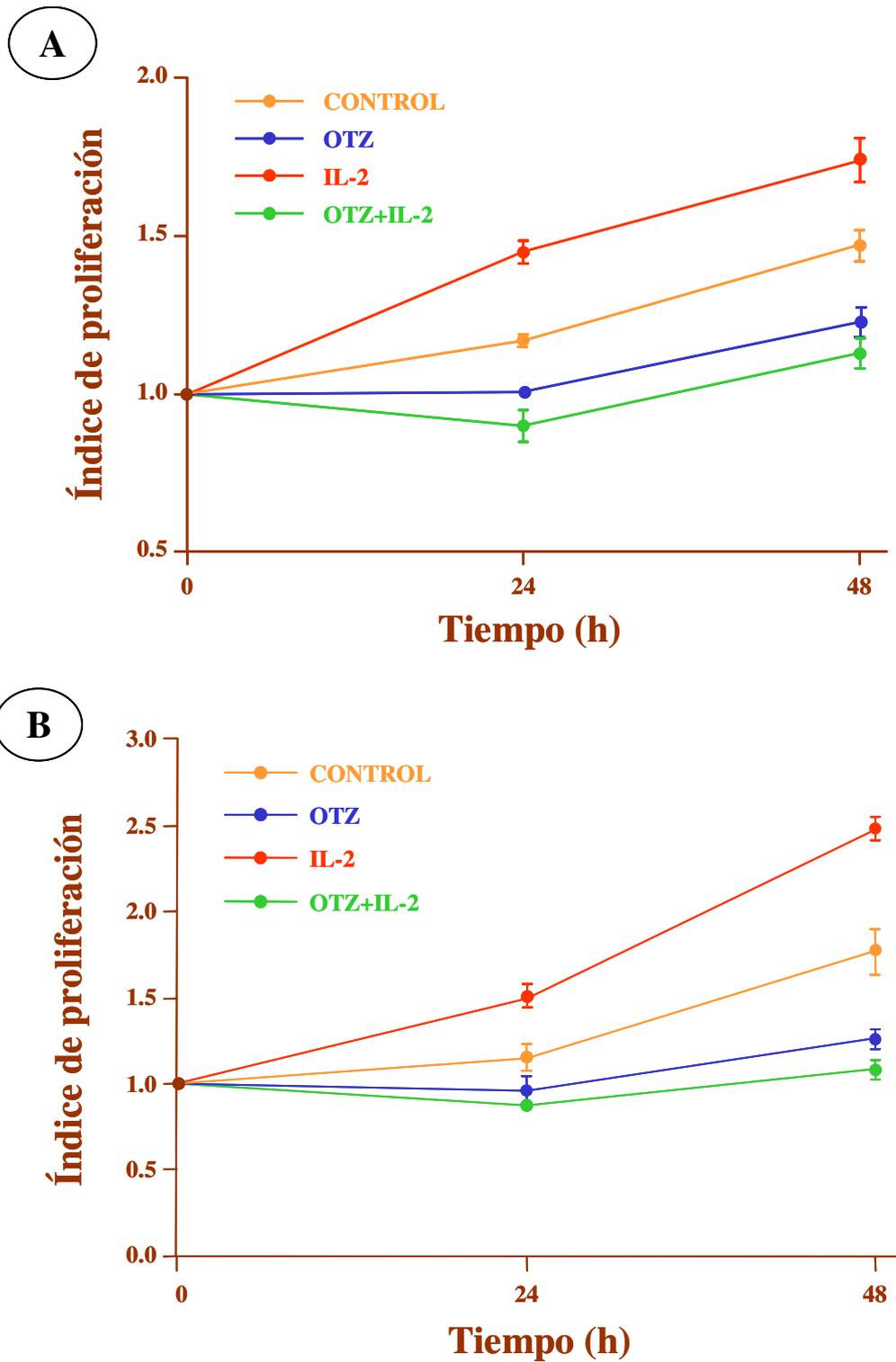


Figura 31. Efecto del OTZ e IL-2 sobre la proliferación de las células del melanoma B16F10 (A) y A375 (B).

En relación a las PBMCs estimuladas con PHA-M durante 4 h, la exposición con IL-2 aumentó un 10.4% ($p<0.05$) los niveles de GSH respecto al control a los 10 min del tratamiento, restableciéndose dichos niveles, a los valores del control a los 30 min; posteriormente, se produjo un nuevo incremento del 10% ($p<0.05$) a los 60 min después del tratamiento. Sin embargo, el tratamiento con OTZ y OTZ + IL-2 indujo un incremento más rápido –a los 5 min– de los niveles de GSH en 13.6% y 14.1% ($p<0.05$) respectivamente, volviendo a los valores del control después de 15 min de tratamiento. A continuación, tal y como se produjo con el tratamiento con IL-2, el OTZ incrementó un 10.7% ($p<0.05$) el contenido intracelular de GSH a los 60 min. Además, la exposición de OTZ + IL-2 incrementó significativamente un 11.4%, 12.0% y 9.2% los niveles de GSH a los 30 min, 45 min y 60 min, respectivamente, en comparación al control [Figura 32A].

Referente a la proliferación, la exposición de las PBMCs a OTZ, IL-2 y la combinación OTZ + IL-2 produjo un aumento significativo de 1.7, 1.7 y 1.8 veces ($p<0.01$), respectivamente, del índice de proliferación a las 24 h respecto a las células control. A las 48 h y 72 h, mientras la exposición de las células a la IL-2 indujo un incremento de 1.8 y 2.3 veces ($p<0.01$) del índice de proliferación celular, respectivamente en comparación al control, con el tratamiento con OTZ se produjo una disminución de la población celular dando lugar a una reducción de 1.3 y 4.2 veces ($p<0.05$) del índice proliferativo, respectivamente. En lo que respecta a la combinación OTZ + IL-2, igualmente se produjo una reducción de la población celular tras las 24 h de tratamiento, si bien no se observaron diferencias significativas en el número de células respecto al control a las 48 h y 72 h [Figura 32B].

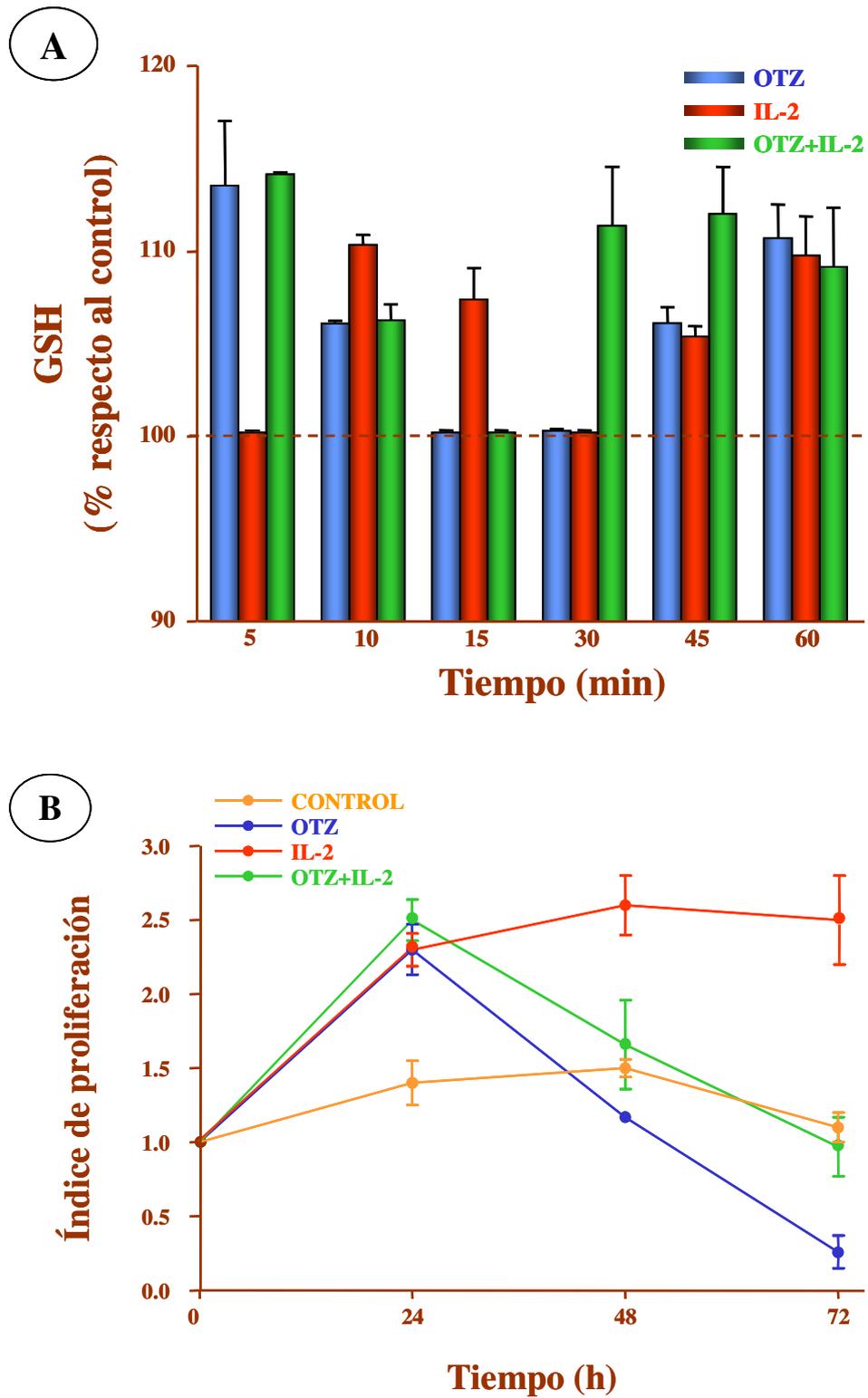


Figura 32. Efecto del OTZ, IL-2 y OTZ + IL-2 sobre los niveles de GSH (A) y la proliferación (B) de las PBMCs estimulados con PHA-M.

V. 1. 5. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA IL-2 SOLA Y EN COMBINACIÓN CON OTZ SOBRE LA EXPRESIÓN DEL IL-2R α EN LAS CÉLULAS DEL MELANOMA A375 Y PBMCs HUMANAS

El análisis de la expresión del IL-2R α en las células del melanoma A375 permitió observar que mientras el tratamiento con OTZ redujo la expresión de dicho receptor en un 9.9% a los 15 min, respecto al control, el tratamiento con la IL-2 produjo un aumento del 20.6%. Sin embargo, la exposición previa de las células al tratamiento con OTZ inhibió el efecto inducido por la IL-2, no produciéndose diferencias respecto al control a los 15 min. A las 24 h, se produjo una disminución moderada, pero significativa, de la expresión del receptor en las células tratadas con OTZ (7.2%) y OTZ + IL-2 (15.5%), siendo sin embargo dicha reducción más acusada con el tratamiento con IL-2 sola (41.6%) [Figura 33A].

En las PBMCs estimuladas con PHA-M durante 4 h, los tratamientos con OTZ, IL-2 y la combinación OTZ + IL-2 produjeron un aumento del 18.7%, 39.0% y 45.6% de la expresión del IL-2R α , respectivamente en comparación al control, a las 4 horas después del tratamiento. De forma previa a dicho tiempo, sólo en el caso del tratamiento combinado se produjo un aumento del 24.0% de la expresión del IL-2R α a los 30 min de la exposición a OTZ + IL-2. Por otro lado, en lo que respecta a las 24 h, mientras en las células expuestas a IL-2 perdura un incremento del 24.3% de la expresión del IL-2R α , con el tratamiento con OTZ dicha expresión se redujo un 27.9%, no existiendo diferencias significativas con el tratamiento combinado OTZ + IL-2, respecto al control [Figura 33B].

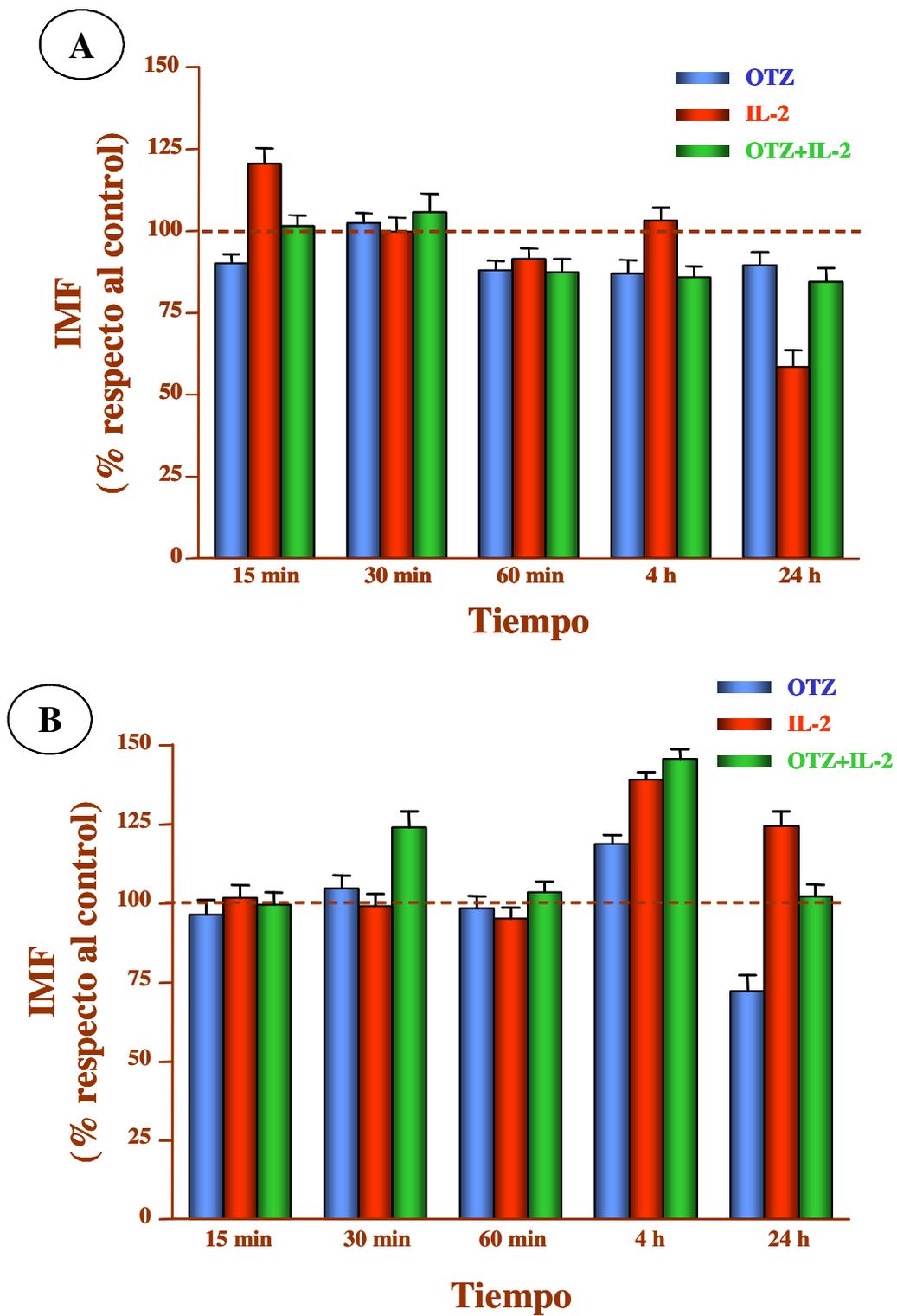


Figura 33. Efecto de la IL-2 y OTZ + IL-2 sobre el IL-2R α de las células del melanoma A375 (A) y PBMCs (B).

V. 1. 6. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA IL-2 SOLA Y EN COMBINACIÓN CON OTZ SOBRE EL CONSUMO / SECRECIÓN DE IL-2 EN LAS CÉLULAS DEL MELANOMA HUMANO A375

En las células del melanoma A375 control y en las tratadas con OTZ no se detectó secreción autocrina de IL-2 al medio de cultivo.

El tratamiento de estas células con IL-2 (200 UI/ml = 6060.6 pg/ml) provocó la activación del mecanismo de consumo y secreción autocrina de dicha interleucina. De esta manera, a los 15 min del tratamiento con IL-2 se produjo un consumo inicial (44.92 pg/ml) de dicha interleucina por parte de las células A375, para posteriormente, promover su secreción siendo máxima a las 24 h de tratamiento (205.5 pg/ml).

Sin embargo, el tratamiento previo de las células con OTZ evitó, parcialmente, la utilización y secreción de la IL-2. Así, en el tratamiento combinado OTZ + IL-2 no se apreció consumo inicial de IL-2, produciéndose posteriormente, una secreción constante de 41.8, 41.5, 96.73 y 45.84 pg/ml a los 30 min, 45 min, 60 min y 24 h. De este modo, en las células tratadas con OTZ + IL-2 se produjo una disminución de 4.5 veces en la cantidad de IL-2 detectada en el medio a las 24 h respecto al tratamiento con IL-2 sola [Figura 34].

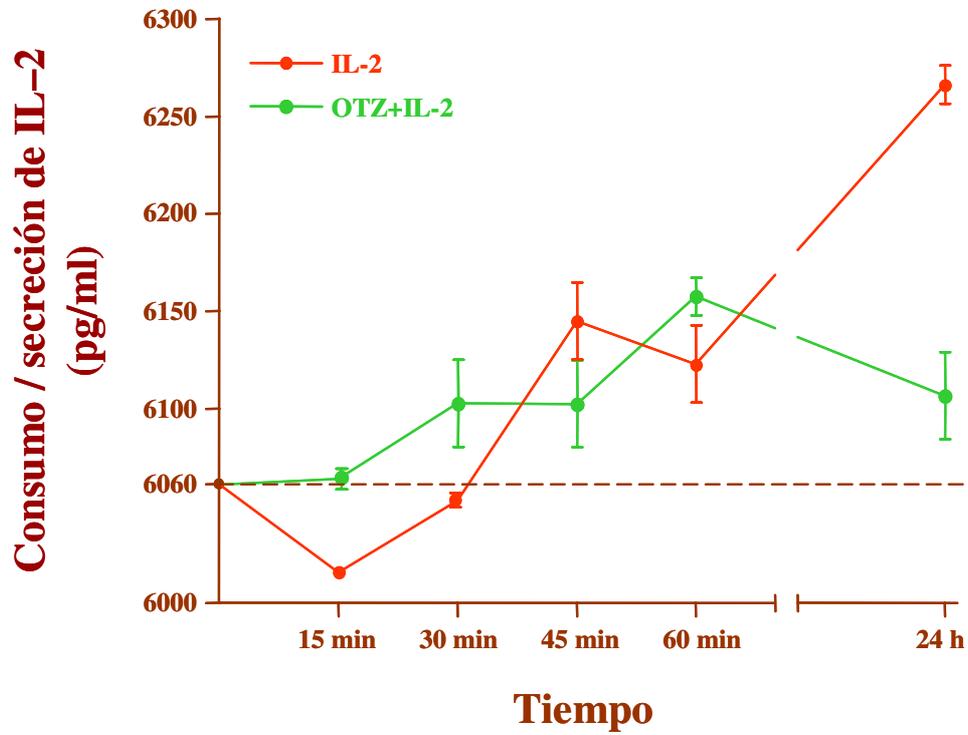


Figura 34. Efecto del la IL-2 y OTZ + IL-2 sobre el consumo / secreción de la IL-2 en las células del melanoma A375.

V. 2. RESULTADOS *IN VIVO*

V. 2. 1. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA Y TOXICIDAD DE LOS RATONES TRATADOS CON OTZ DE FORMA INMEDIATA TRAS LA INOCULACIÓN INTRAESPLÉNICA DE LAS CÉLULAS DEL MELANOMA B16F10

V. 2. 1. 1. Estudio de la supervivencia

Con la finalidad de conocer el efecto *in vivo* del OTZ sobre la implantación hepática de las células del melanoma B16F10 y el posterior desarrollo de las metástasis, el tratamiento con OTZ se administró de forma diaria desde el día 0 (5 horas postinoculación tumoral) hasta el día 8.

El tratamiento con OTZ produjo un aumento significativo en la supervivencia de los animales tratados respecto a los animales control, si bien este aumento no fue dosis dependiente. Así, mientras la supervivencia media de los animales control fue de 20.0 ± 1.3 , los animales tratados con OTZ 1, 2.5 y 5 mmol/kg obtuvieron una supervivencia media de 23.3 ± 2.1 , 24.6 ± 3.1 y 20.1 ± 2.0 , respectivamente. Esto dio como resultado un incremento significativo de la supervivencia (IS) del 116.5%, 123% de los tratados con 1 y 2.5 mmol/kg, respectivamente, no existiendo diferencias significativas con la dosis de 5 mmol/kg (IS = 100.5%) [Tabla 11].

V. 2. Resultados *in vivo*

Tabla 11. Supervivencia de los animales control y tratados con distintas dosis de OTZ desde el día 0 hasta el día 8 postinoculación tumoral.

SUPERVIVENCIA		
Tratamiento	Días ($\bar{x} \pm D.E.$)	IS (%)
Control	20.0 \pm 1.3	–
OTZ 1 mmol/kg (0-8)	23.3 \pm 2.1 ^a	116.5
OTZ 2.5 mmol/kg (0-8)	24.6 \pm 3.1 ^a	123.0
OTZ 5 mmol/kg (0-8)	20.1 \pm 2.0	100.5

^aDiferencias significativas respecto al grupo control (p<0.05)

IS: (Supervivencia de los animales tratados / animales control) x 100

V. 2. 1. 2. Estudio de la toxicidad

El tratamiento con OTZ no produjo pérdida de peso de los animales con ninguna de las concentraciones ensayadas. Respecto a la modificación del peso de los animales (MPA) a lo largo del estudio, si bien en la MPA del día 9 no existían diferencias significativas, en el día 15 de evolución se produjo una disminución de 1.5 veces (p<0.01) en el peso de los animales tratados con 1 y 2.5 mmol/kg respecto a los animales control [Tabla 12].

Tabla 12. Modificación del peso de los animales tratados con OTZ desde el día 0 hasta el día 8 postinoculación tumoral.

MODIFICACIÓN DEL PESO DEL ANIMAL (%)			
Tratamiento	MPA día 9/1	MPA día 15/1	MPP
Control	6.2 ± 3.8	16.7 ± 5.7	0
OTZ 1 mmol/kg (0-8)	5.8 ± 3.5	11.1 ± 7.4^a	0
OTZ 2.5 mmol/kg (0-8)	5.4 ± 4.4	11.6 ± 4.2^a	0
OTZ 5 mmol/kg (0-8)	5.0 ± 2.87	15.4 ± 4.0	0

^a Diferencias significativas comparado con el grupo de ratones control ($p < 0.01$)

MPA: Modificación del peso del animal

MPP: Máxima pérdida de peso del animal

Por otra parte, el tratamiento con OTZ tampoco produjo modificaciones significativas de los parámetros hematológicos analizados, si bien con todas las concentraciones ensayadas se observó una disminución de 1.2 veces ($p > 0.05$) en el número de leucocitos respecto al control [Tabla 13].

V. 2. Resultados *in vivo*

Tabla 13. Parámetros hematológicos de los animales control y tratados con OTZ desde el día 0 hasta el día 8 postinoculación tumoral.

PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS				
Tratamiento	Leucocitos (x10 ³ /μl)	Hematíes (x10 ⁶ /μl)	Hemoglobina (gr/dl)	Hematocrito (%)
Control	10.1 ± 2.8	8.5 ± 0.4	14.2 ± 1.1	43.0 ± 3.5
OTZ 1 mmol/kg (0-8)	8.2 ± 1.4	9.0 ± 0.1	14.5 ± 0.3	43.0 ± 0.1
OTZ 2.5 mmol/kg (0-8)	8.7 ± 2.3	9.4 ± 0.3	15.3 ± 0.8	44.0 ± 0.1
OTZ 5 mmol/kg (0-8)	8.5 ± 1.5	8.3 ± 0.5	14.2 ± 0.6	44.0 ± 0.1

Los resultados de estos experimentos permitieron determinar como dosis óptima de OTZ la concentración de 2.5 mmol/kg, siendo la utilizada en las siguientes series experimentales. Estos ensayos se llevaron a cabo sobre animales con metástasis hepáticas establecidas (de 3 días de evolución) de melanoma B16F10, por lo que los tratamientos en el resto de las experiencias comenzaron en el día 3 postinoculación tumoral.

V. 2. 2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL OTZ Y BSO SOBRE LOS NIVELES DE GSH DE LAS PBMCs DE RATÓN. INFLUENCIA DE ESTOS MODULADORES SOBRE LA CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR DOSIS LETALES DE CY

Con la finalidad de determinar el efecto del tratamiento con OTZ (2.5 mmol/kg) y BSO (200 mg/kg) sobre los niveles intracelulares de GSH de las PBMCs, se procedió a la extracción sanguínea de los animales a tiempos secuenciales tras el tratamiento.

El tratamiento con OTZ aumentó significativamente los niveles de GSH de las PBMCs. Dicho incremento (174%) fue máximo a las 2 horas tras la administración del tratamiento, produciéndose posteriormente una disminución paulatina hasta los valores del control [Figura 35A].

En cambio, el tratamiento con BSO disminuyó significativamente los niveles de GSH de las PBMCs. Dicha disminución fue máxima (51%) a las 16 horas tras la administración del fármaco, produciéndose posteriormente una recuperación de dichos niveles [Figura 35B].

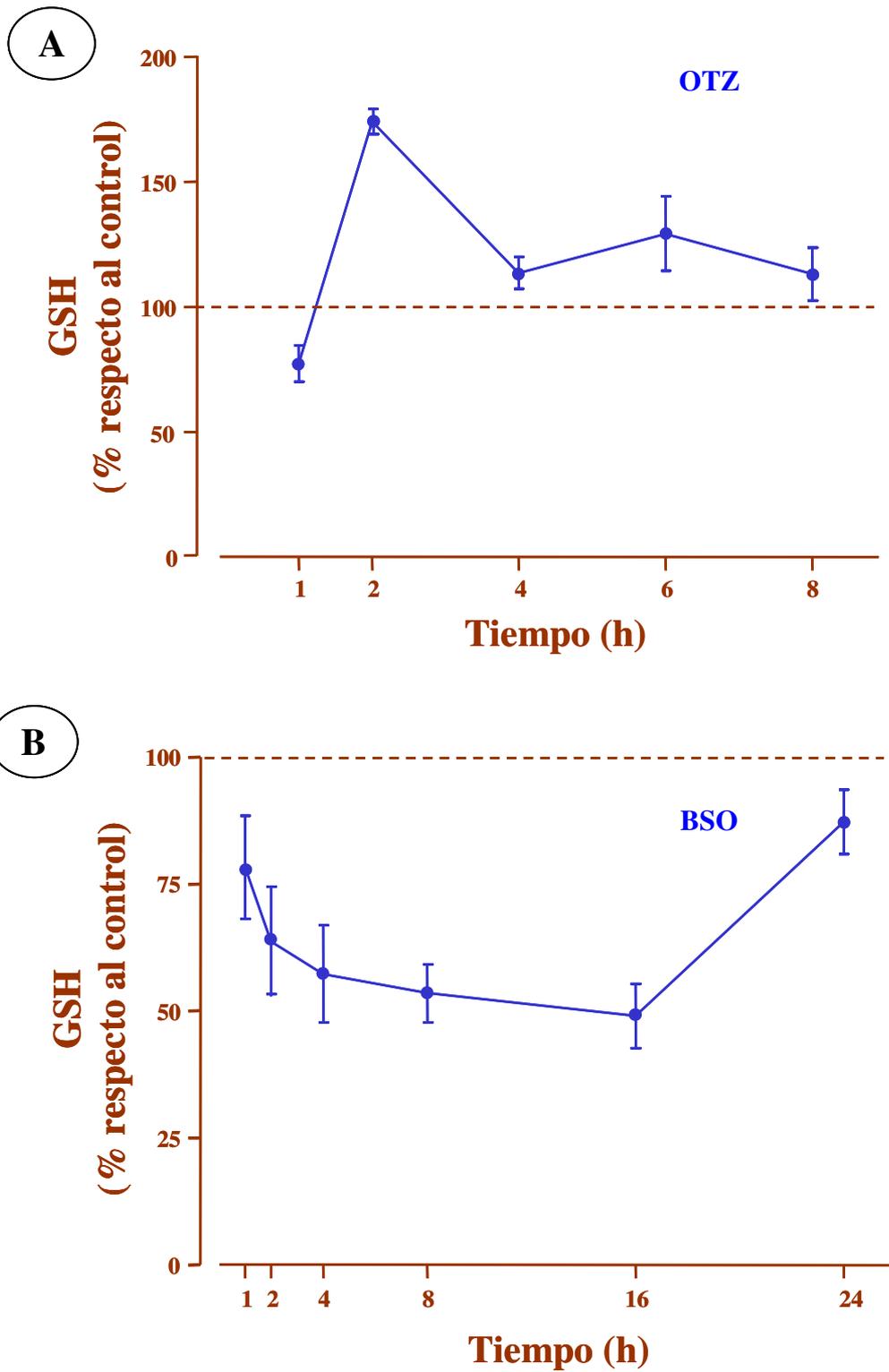


Figura 35. Niveles de GSH de las PBMCs de los animales tratados con OTZ (A) y BSO (B).

Cuando los animales fueron tratados con dosis letales de CY (500 mg/kg), los niveles de GSH de las PBMCs disminuyeron un 50% ($p < 0.05$) respecto a las células control, a las 2 horas del tratamiento. Sin embargo, la adición de OTZ al tratamiento con CY indujo un efecto protector de las PBMCs contra la toxicidad de este agente alquilante. Así, la combinación de OTZ 2 horas antes y 30 minutos después del tratamiento con CY produjo sólo una disminución del 20% de los niveles de GSH, respecto al control [Figura 36].

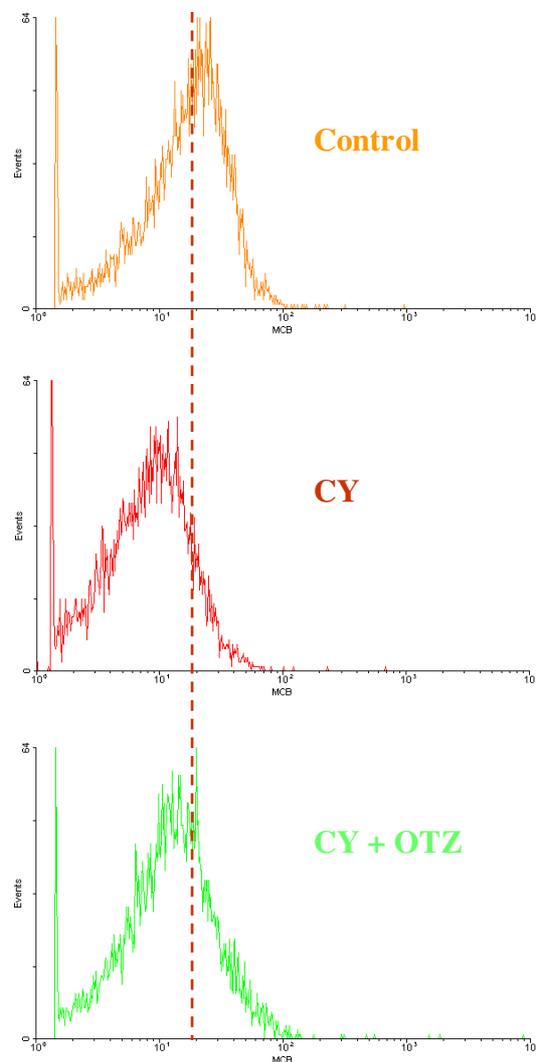


Figura 36. Niveles de GSH de las PBMCs de los animales tratados con CY 500 mg/kg y CY + OTZ.

V. 2. 3. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA Y TOXICIDAD DE LOS RATONES CON METÁSTASIS HEPÁTICAS DEL MELANOMA B16F10 TRATADOS CON IL-2 SOLA Y EN COMBINACIÓN CON OTZ

V. 2. 3. 1. Estudio de la supervivencia

El tratamiento de los animales con una dosis diaria de 50000 UI de IL-2 (días 3-8) produjo un incremento de la supervivencia del 119% ($p < 0.05$) respecto a los ratones control.

Para el tratamiento combinado de OTZ + IL-2 se ensayaron dos pautas de administración diferentes de OTZ: pauta continua (pc, días 3-8) y pauta discontinua (pd, días 3, 6 y 8).

La administración aislada de OTZ, tanto con la pc como con la pd, no produjo diferencias significativas en la supervivencia de los animales respecto al grupo control. Cuando el tratamiento de IL-2 fue administrado en combinación con la pc de OTZ se produjo un menor efecto que el obtenido con la administración de IL-2 sola (IS = 113%). Sin embargo, la administración de IL-2 en combinación con la pd de OTZ resultó en un incremento de un 126% ($p < 0.05$) en la supervivencia respecto al grupo control [Tabla 14].

Tabla 14. Supervivencia de los animales control, tratados con IL-2 sola y en combinación con las distintas pautas de OTZ.

SUPERVIVENCIA		
Tratamiento	Días ($\bar{x} \pm D.E.$)	IS (%)
Control	20.0 \pm 1.3	–
IL-2	23.8 \pm 3.4 ^a	119
OTZ (pc)	20.3 \pm 2.8	101.5
OTZ (pd)	21.1 \pm 4.5	105.5
OTZ (pc) + IL-2	22.6 \pm 3.9	113
OTZ (pd) + IL-2	25.2 \pm 4.3 ^a	126

^aDiferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0.05$)
 IS: (Supervivencia de los animales tratados / animales control) x 100

V. 2. 3. 2. Estudio de la toxicidad

El tratamiento aislado con la pc o pd de OTZ, IL-2 o la combinación de OTZ + IL-2 no produjeron pérdida de peso de los animales. Respecto a la MPA a lo largo del estudio, sólo la administración de OTZ con la pauta continua en combinación con IL-2 produjo una disminución de 1.6 veces ($p < 0.01$) del MPA del día 9 respecto al control, no existiendo diferencias significativas en el resto de los tratamientos. Sin embargo, en comparación con el grupo control, en el día 15 de evolución se produjo una disminución de 1.3, 1.5, 1.4, 1.8 y 1.4 veces del MPA de los animales tratados con IL-2, pc de OTZ, pd de OTZ, OTZ (pc) + IL-2 y OTZ (pd) + IL-2, respectivamente ($p < 0.05$) [Tabla 15].

V. 2. Resultados *in vivo*

Tabla 15. Modificación del peso de los animales tratados con IL-2 sola y en combinación con OTZ.

Tratamiento	MODIFICACIÓN DEL PESO DEL ANIMAL (%)		
	MPA día 9/1	MPA día 15/1	MPP
Control	10.5 ± 3.1	21.2 ± 5.9	0
IL-2	10.6 ± 2.1	16.7 ± 2.7 ^a	0
OTZ (pc)	10.4 ± 3.9	13.7 ± 2.1 ^a	0
OTZ (pd)	9.8 ± 2.6	15.2 ± 4.2 ^a	0
OTZ (pc) + IL-2	6.4 ± 3.6 ^a	11.9 ± 4.8 ^a	0
OTZ (pd) + IL-2	10.6 ± 3.7	15.2 ± 4.8 ^a	0

^a Diferencias significativas comparado con el grupo de ratones control (p<0.05)

MPA: Modificación del peso del animal

MPP: Máxima pérdida de peso del animal

Por otra parte, los tratamientos de OTZ o IL-2, solos o en combinación, no produjeron modificaciones significativas de los parámetros hematológicos analizados, si bien en los animales tratados con IL-2 sola o en combinación con la pc de OTZ se observó una disminución de 1.2 y 1.4 veces, respectivamente, en el número de leucocitos respecto al control (p>0.05) [Tabla 16].

Tabla 16. Parámetros hematológicos de los animales control, tratados con IL-2 sola y en combinación con OTZ.

PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS				
Tratamiento	Leucocitos (x10³/μl)	Hematíes (x10⁶/μl)	Hemoglobina (gr/dl)	Hematocrito (%)
Control	10.1 ± 2.8	8.5 ± 0.4	14.2 ± 1.1	43.0 ± 3.5
IL-2	8.1 ± 1.4	8.7 ± 0.1	14.3 ± 0.4	44.5 ± 0.8
OTZ (pc)	9.5 ± 2.1	9.1 ± 0.2	14.7 ± 0.3	44.0 ± 0.01
OTZ (pd)	10.2 ± 2.3	9.0 ± 0.4	14.7 ± 0.8	44.0 ± 0.02
OTZ (pc) + IL-2	7.1 ± 3.3	8.5 ± 0.5	14.2 ± 0.4	42.6 ± 2.0
OTZ (pd) + IL-2	10.1 ± 2.9	9.0 ± 0.3	14.5 ± 0.6	44.0 ± 0.02

Los resultados de estos experimentos permitieron determinar como pauta óptima de administración del OTZ la pauta discontinua, siendo la utilizada en las siguientes series experimentales. De hecho, tal y como se puede observar en la figura 37, la adición de OTZ (pd) a IL-2 fue la combinación terapéutica que produjo el mejor índice terapéutico (índice actividad / toxicidad, IAT = 1.26).

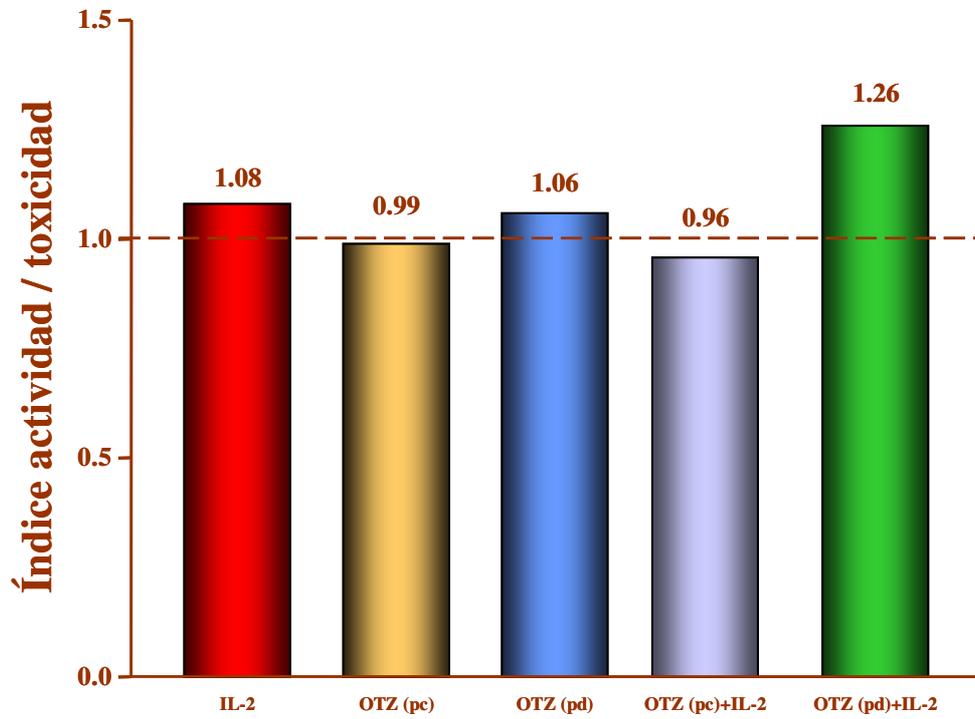


Figura 37. Índice actividad / toxicidad (IAT) de los tratamientos con IL-2, OTZ (pc), OTZ (pd), OTZ (pc) + IL-2 y OTZ (pd) + IL-2. Valores de IAT mayores de 1 indican un beneficio terapéutico.

V. 2. 4. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA Y TOXICIDAD DE LOS RATONES CON METÁSTASIS HEPÁTICAS DEL MELANOMA B16F10 TRATADOS CON DOSIS ALTAS DE CY SOLA Y EN COMBINACIÓN CON BSO Y OTZ

V. 2. 4. 1. Estudio de la supervivencia

El tratamiento con BSO (200 mg/kg, días 2 y 7 postinoculación tumoral) aumentó un 115% ($p < 0.05$) la supervivencia de los animales respecto al grupo control. Sin embargo, el tratamiento con OTZ (2.5 mmol/kg, pd) no produjo diferencias significativas en la supervivencia de los animales (IS = 105.5%).

El tratamiento con 250 mg/kg de CY incrementó un 177% la supervivencia de los animales respecto al grupo control ($p < 0.01$). La combinación terapéutica de BSO y CY incrementó significativamente la supervivencia de los animales (IS = 200% respecto al control) en comparación al tratamiento con CY sola ($p < 0.05$).

Por otro lado, la adición de OTZ al tratamiento con CY produjo un IS del 190% respecto al control ($p < 0.01$), si bien este incremento no fue significativo respecto al tratamiento con CY sola ($p = 0.1388$) [Tabla 17].

V. 2. Resultados *in vivo*

Tabla 17. Supervivencia de los animales tratados con CY sola y en combinación con BSO y OTZ.

SUPERVIVENCIA				
Tratamiento	No tratados con CY		Tratados con CY	
	Días ($\bar{x} \pm D.E.$)	IS (%)	Días ($\bar{x} \pm D.E.$)	IS (%)
Control	20.0 \pm 1.3	–	35.4 \pm 4.2 ^a	177
OTZ (pd)	21.1 \pm 4.5	105.5	38.0 \pm 2.2 ^a	190
BSO	23.0 \pm 1.8 ^a	115	40.0 \pm 5.6 ^{a,b}	200

^a Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0.05$)

^b Diferencias significativas respecto al grupo tratado con CY sola ($p < 0.05$)

IS: (Supervivencia de los animales tratados / animales control) x 100

V. 2. 4. 2. Estudio de la toxicidad

Los tratamientos aislados con OTZ o BSO no produjeron pérdida de peso de los animales. Por el contrario, el tratamiento con CY redujo un 7.9% ($p < 0.05$) el peso de los ratones; dicho porcentaje de disminución fue similar (8.2%) cuando la CY se administró en combinación con OTZ; en cambio, la pérdida de peso fue mayor (11.4%) cuando la CY se combinó con BSO. Como se puede observar en la tabla 18, tras finalizar el tratamiento, en los tres casos se produjo una recuperación parcial del peso de los animales, tal y como lo demuestra la valoración del MPA en el día 15 de evolución.

Tabla 18. Modificación del peso de los animales control, tratados con CY sola y en combinación con BSO y OTZ.

MODIFICACIÓN DEL PESO DEL ANIMAL (%)			
Tratamiento	MPA día 9/1	MPA día 15/1	MPP
Control	10.5 ± 3.1	21.2 ± 5.9	0
CY 250 mg/kg	-7.9 ± 4.5 ^a	0.9 ± 9.4 ^a	7.9 ± 4.5
BSO	10.3 ± 3.5	14.7 ± 3.9 ^a	0
OTZ (pd)	9.8 ± 2.6	15.2 ± 4.2 ^a	0
BSO + CY	-11.4 ± 4.0 ^a	-7.0 ± 3.9 ^a	11.4 ± 4.0
OTZ (pd) + CY	-8.2 ± 4.3 ^a	-4.6 ± 6.1 ^a	8.2 ± 4.3

^a Diferencias significativas respecto a los animales control (p<0.05)

MPA: Modificación del peso del animal

MPP: Máxima pérdida de peso del animal

La valoración de los parámetros sanguíneos puso de manifiesto que los tratamientos aislados con OTZ o BSO no produjeron modificaciones significativas de dichos valores hematológicos (a excepción de una disminución del porcentaje de hematocrito en el caso del tratamiento con BSO). Sin embargo, el tratamiento con CY disminuyó 1.3 veces el número de hematíes, la concentración de hemoglobina y el porcentaje de hematocrito, y 6.7 veces el número de leucocitos (p<0.05).

La adición de BSO al tratamiento con CY, no modificó los parámetros sanguíneos de la serie roja respecto al tratamiento con CY, pero redujo aún más el número de leucocitos (1.7 veces respecto a la CY sola).

V. 2. Resultados *in vivo*

En cambio, en los animales que recibieron el tratamiento combinado de OTZ + CY, el número de leucocitos fue 1.7 veces mayor que en los tratados con CY sola. En este último caso tampoco se modificaron los valores de la serie roja respecto a los obtenidos con la administración aislada del agente alquilante [Tabla 19].

Tabla 19. Parámetros hematológicos de los animales control, tratados con CY sola y en combinación con BSO y OTZ.

PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS				
Tratamiento	Leucocitos (x10 ³ /μl)	Hematíes (x10 ⁶ /μl)	Hemoglobina (gr/dl)	Hematocrito (%)
Control	10.1 ± 2.8	8.5 ± 0.4	14.2 ± 1.1	43.0 ± 3.5
CY 250 mg/Kg	1.5 ± 0.1 ^a	6.6 ± 0.6	11.1 ± 0.6	32.4 ± 3.0 ^a
BSO	10.0 ± 1.3	7.2 ± 0.2	14.6 ± 0.1	34.0 ± 0.01 ^a
OTZ (pd)	10.2 ± 2.3	9.0 ± 0.4	14.7 ± 0.8	44.0 ± 0.02
BSO + CY	0.9 ± 0.2 ^a	7.0 ± 0.2	11.8 ± 0.2	32.0 ± 0.01 ^a
OTZ (pd) + CY	2.5 ± 0.7 ^a	6.9 ± 0.2	11.7 ± 0.9	33.5 ± 0.6 ^a

^a Diferencias significativas respecto a los animales control (p<0.05)

V. 2. 5. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE OTZ SOBRE EL TRATAMIENTO BIOQUIMIOTERÁPICO CON INTENSIFICACIÓN DE DOSIS DE CY E IL-2: ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA Y TOXICIDAD DE LOS RATONES CON METÁSTASIS HEPÁTICAS DEL MELANOMA B16F10

V. 2. 5. 1. Estudio de la supervivencia

En esta experiencia se estudió el efecto sobre la supervivencia de los animales con metástasis hepáticas tratados con un único ciclo de dosis bajas (50 mg/kg), dosis altas (250 mg/kg) y dosis letales (500 mg/kg) de CY sola o en combinación con OTZ (2.5 mmol/kg), IL-2 (50000 UI) y OTZ + IL-2.

Como se muestra en la tabla 20, el tratamiento con las dosis no letales de 50 y 250 mg/kg de CY produjo un incremento en la supervivencia del 114% ($p < 0.05$) y 177% ($p < 0.01$), respectivamente, en comparación al grupo control. Todos los animales tratados con 500 mg/kg de CY murieron como resultado de la elevada toxicidad producida por este fármaco.

En comparación con el tratamiento con CY sola, la adición de la IL-2 al tratamiento con 50 o 250 mg/kg de CY no mostró diferencias significativas en la supervivencia (IS respecto al control de 108% y 184%, respectivamente). Asimismo, la combinación de CY 500 mg/kg + IL-2 dio lugar a una mortalidad del 100% de los animales tratados.

Por otro lado, la adición de OTZ al tratamiento con dosis bajas y altas de CY aumentó la supervivencia un 121% y 190%, respectivamente, en comparación a los animales control, si bien estos incrementos no fueron significativos respecto al tratamiento con CY sola. Además, el tratamiento con OTZ permitió la administración de la dosis letal de 500 mg/kg de CY, obteniendo un incremento de la supervivencia del 279% respecto al control. Asimismo, el 70% de estos animales experimentaron un largo tiempo de supervivencia (LTS > 50 días).

V. 2. Resultados *in vivo*

Sin embargo, el mayor efecto terapéutico fue obtenido cuando el tratamiento de CY fue administrado en combinación con OTZ + IL-2. Así, la administración de OTZ + IL-2 en combinación con dosis bajas, altas y letales de CY dio lugar a un incremento en la supervivencia del 135%, 221% y 320%, respectivamente en comparación al grupo control; además, se observó un LTS del 20% y 100% cuando el tratamiento con OTZ + IL-2 fue administrado en combinación a 250 o 500 mg/kg de CY, respectivamente.

Tabla 20. Supervivencia de los animales tratados con CY sola y en combinación con IL-2, OTZ y OTZ + IL-2.

TRATAMIENTO			SUPERVIVENCIA		
CY	OTZ	IL-2	Días ($\bar{x} \pm D.E.$)	IS (%)	LTS (n/total)
–	–	–	20.0 \pm 1.3	–	–
50 mg/kg	–	–	22.7 \pm 3.5 ^a	114	0/10
50 mg/kg	+	–	24.2 \pm 3.6 ^a	121	0/10
50 mg/kg	–	+	21.6 \pm 1.9 ^a	108	0/10
50 mg/kg	+	+	27.0 \pm 3.7 ^a	135	0/10
250 mg/kg	–	–	35.4 \pm 4.2 ^a	177	0/10
250 mg/kg	+	–	38.0 \pm 2.2 ^a	190	0/10
250 mg/kg	–	+	36.9 \pm 3.6 ^a	184	0/10
250 mg/kg	+	+	44.2 \pm 4.1 ^a	221	2/10
500 mg/kg	–	–	33.4 \pm 14.1 ^a	167	0/10
500 mg/kg	+	–	55.8 \pm 12.1 ^{a,b}	279	7/10
500 mg/kg	–	+	29.8 \pm 9.4 ^a	149	0/10
500 mg/kg	+	+	64.0 \pm 13.1 ^{a,b}	320	10/10

^a Diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$)

^b Diferencias significativas respecto al grupo tratado con CY sola ($p < 0.05$)

LTS: número de animales que sobreviven más de 50 días

IS: (Supervivencia de los animales tratados / animales control) x 100

V. 2. 5. 2. Estudio de la toxicidad

El análisis de la evolución ponderal de los animales demostró que los tratamientos con 50 mg/kg de CY sola o en combinación con IL-2, OTZ u OTZ + IL-2 no produjeron pérdida de peso de los mismos [Tabla 21].

Tabla 21. Modificación del peso de los animales tratados con dosis bajas de CY (50 mg/kg) sola y en combinación con IL-2, OTZ y OTZ + IL-2.

Tratamiento	MODIFICACIÓN DEL PESO DEL ANIMAL (%)		
	MPA día 9/1	MPA día 15/1	MPP
CY 50 mg/Kg	10.1 ± 5.0	11.4 ± 5.6	0
CY + IL-2	8.1 ± 3.2	8.1 ± 3.2	0
CY + OTZ	5.7 ± 5.7	6.5 ± 3.9	0
CY + OTZ + IL-2	5.9 ± 3.7	5.8 ± 4.1	0

MPA: Modificación del peso del animal
MPP: Máxima pérdida de peso del animal

En los animales tratados con 250 mg/kg de CY sola o en combinación con los agentes farmacológicos señalados anteriormente, se observó que durante el tratamiento se produjo una pérdida significativa de peso en una proporción similar en todos los casos, produciéndose, posteriormente, una recuperación del peso de dichos animales. Sin embargo, en el caso del tratamiento combinado de CY + IL-2, dicha recuperación fue significativamente inferior que el tratamiento con CY sola [Tabla 22].

V. 2. Resultados *in vivo*

Tabla 22. Modificación del peso de los animales tratados con dosis altas de CY (250 mg/kg) sola y en combinación con IL-2, OTZ y OTZ + IL-2.

MODIFICACIÓN DEL PESO DEL ANIMAL (%)			
Tratamiento	MPA día 9/1	MPA día 30/1	MPP
CY 250 mg/Kg	-7.9 ± 4.5	15.6 ± 5.0	7.9 ± 4.5
CY + IL-2	-8.6 ± 4.3	1.1 ± 7.0	8.6 ± 4.3
CY + OTZ	-7.1 ± 4.5	10.3 ± 7.6	7.1 ± 4.5
CY + OTZ + IL-2	-6.0 ± 3.8	11.0 ± 1.9	6.0 ± 3.8

MPA: Modificación del peso del animal
MPP: Máxima pérdida de peso del animal

Finalmente, cuando los animales fueron tratados con 500 mg/kg de CY sola y en combinación con los otros agentes, inicialmente se produjo también una pérdida de peso similar en todos los grupos de animales; dicha pérdida fue incrementándose durante la evolución del estudio en todos los grupos a excepción de los ratones tratados con la combinación de CY + OTZ + IL-2, en los cuales se produjo una recuperación significativa del peso hasta prácticamente el peso que presentaban al inicio del tratamiento [Tabla 23].

Tabla 23. Modificación del peso de los animales tratados con dosis letales de CY (500 mg/kg) sola y en combinación con IL-2, OTZ y OTZ + IL-2.

MODIFICACIÓN DEL PESO DEL ANIMAL (%)			
Tratamiento	MPA día 9/1	MPA día 30/1	MPP
CY 500 mg/Kg	-14.8 ± 4.3	-32.9 ± 9.1	32.9 ± 9.1
CY + IL-2	-14.3 ± 4.6	-29.0 ± 8.0	29.0 ± 8.0
CY + OTZ	-14.6 ± 3.4	-20.0 ± 14.7	20.0 ± 14.7
CY + OTZ + IL-2	-14.5 ± 3.8	-0.9 ± 4.2	14.5 ± 3.8

MPA: Modificación del peso del animal
MPP: Máxima pérdida de peso del animal

La valoración de los parámetros sanguíneos puso de manifiesto que el tratamiento aislado con CY produjo una disminución dosis dependiente del número de leucocitos (2.8, 6.7 y 16.8 veces respecto a los valores control con las dosis de 50, 250 y 500 mg/Kg, respectivamente; $p < 0.05$).

La adición de IL-2 y OTZ al tratamiento con CY redujo la toxicidad leucocitaria producida por la CY. De este modo, la administración conjunta de CY e IL-2 dio lugar a incrementos del 2.1, 1.7 y 1.8 veces ($p < 0.05$) en comparación a los valores obtenidos con los animales tratados con CY 50, 250 y 500 mg/kg, respectivamente. Cuando el tratamiento con CY se realizó en combinación con OTZ, dichos incrementos fueron del 1.6, 1.7 y 2.8 veces, respectivamente. Sin embargo, la adición de OTZ + IL-2 al tratamiento con CY dio lugar a una mayor protección contra la toxicidad inducida por este agente alquilante, aumentando el número leucocitario en 2.5, 2.5 y 4 veces respecto a los valores de los animales tratados con dosis bajas, altas y letales de CY sola, respectivamente.

V. 2. Resultados *in vivo*

Por otro lado, el tratamiento con CY produjo una disminución dosis dependiente ($r = -0.9$; $p < 0.001$) del número de hematíes, de la hemoglobina y del hematocrito. La adición de IL-2, OTZ u OTZ + IL-2 al tratamiento con CY no modificó, en cambio, de forma significativa dichos parámetros hematológicos con respecto a los obtenidos con el tratamiento con CY sola [Tablas 24-26].

Tabla 24. Parámetros hematológicos de los animales tratados con dosis bajas de CY (50 mg/kg) sola y en combinación con IL-2, OTZ y OTZ + IL-2.

PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS				
Tratamiento	Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Hematíes ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	Hemoglobina (gr/dl)	Hematocrito (%)
Control	10.1 ± 2.8	8.5 ± 0.4	14.2 ± 1.1	43.0 ± 3.5
CY 50 mg/Kg	3.6 ± 1.1^a	7.6 ± 0.3	13.1 ± 0.07	37.8 ± 2.8
CY + IL-2	7.7 ± 2.4^b	7.4 ± 0.2	14.0 ± 0.9	38.9 ± 0.3
CY + OTZ	5.9 ± 2.1	7.5 ± 0.2	13.1 ± 0.8	40.0 ± 7.1
CY + OTZ + IL-2	8.9 ± 2.7^b	7.0 ± 0.4	12.9 ± 0.2	36.3 ± 3.4

^a Diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$)

^b Diferencias significativas respecto al grupo tratado con CY sola ($p < 0.05$)

Tabla 25. Parámetros hematológicos de los animales tratados con dosis altas de CY (250 mg/kg) sola y en combinación con IL-2, OTZ y OTZ + IL-2.

PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS				
Tratamiento	Leucocitos (x10³/μl)	Hematíes (x10⁶/μl)	Hemoglobina (gr/dl)	Hematocrito (%)
Control	10.1 ± 2.8	8.5 ± 0.4	14.2 ± 1.1	43.0 ± 3.5
CY 250 mg/Kg	1.5 ± 0.1 ^a	6.6 ± 0.6	11.1 ± 0.6	32.4 ± 3.0 ^a
CY + IL-2	2.6 ± 0.6 ^b	6.8 ± 1.7	12.3 ± 0.5	35.2 ± 8.3
CY + OTZ	2.5 ± 0.7 ^b	6.9 ± 0.2	11.7 ± 0.9	33.5 ± 0.6 ^a
CY + OTZ + IL-2	3.7 ± 0.1 ^b	6.0 ± 0.7	12.0 ± 0.4	31.0 ± 5.3 ^a

^a Diferencias significativas respecto al control (p<0.05)^b Diferencias significativas respecto al grupo tratado con CY sola (p<0.05)**Tabla 26.** Parámetros hematológicos de los animales tratados con dosis letales de CY (500 mg/kg) sola y en combinación con IL-2, OTZ y OTZ + IL-2.

PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS				
Tratamiento	Leucocitos (x10³/μl)	Hematíes (x10⁶/μl)	Hemoglobina (gr/dl)	Hematocrito (%)
Control	10.1 ± 2.8	8.5 ± 0.4	14.2 ± 1.1	43.0 ± 3.5
CY 500 mg/Kg	0.6 ± 0.3 ^a	6.1 ± 0.01 ^a	10.1 ± 0.8 ^a	28.8 ± 0.7 ^a
CY + IL-2	1.1 ± 0.03 ^b	6.2 ± 0.3 ^a	11.4 ± 1.0	32.0 ± 2.3 ^a
CY + OTZ	1.7 ± 0.2 ^b	6.0 ± 0.4 ^a	10.1 ± 0.8 ^a	29.0 ± 2.0 ^a
CY + OTZ + IL-2	2.4 ± 0.1 ^b	5.6 ± 0.3 ^a	10.5 ± 0.4 ^a	28.3 ± 2.0 ^a

^a Diferencias significativas respecto al control (p<0.05)^b Diferencias significativas respecto al grupo tratado con CY sola (p<0.05)

V. 2. Resultados *in vivo*

El análisis conjunto de los resultados de los tratamientos ensayados sobre la supervivencia y la toxicidad de los animales, permitió valorar el efecto del OTZ e IL-2 sobre el IAT de la CY.

Como se puede observar en la figura 38, el tratamiento con CY sola dio lugar a un valor bajo de IAT, en particular con la dosis de 500 mg/kg (IAT = 0.4). La adición aislada de IL-2 u OTZ al tratamiento con 50 y 250 mg/kg de CY, si bien mejoró dicho valor, éste no alcanzó la unidad. En el caso de la dosis de 500 mg/kg de CY, la adición de IL-2 no mejoró el IAT obtenido con la CY sola, mientras que la combinación de OTZ + CY alcanzó un valor positivo de IAT (1.14).

Sin embargo, fue la adición conjunta de OTZ + IL-2 al tratamiento con CY la que permitió obtener el mejor índice terapéutico. Aún más, en relación a las diferentes dosis de CY utilizadas, el valor de IAT se incrementó de forma dosis dependiente, de manera que el valor más elevado se obtuvo con la dosis de 500 mg/kg de CY (IAT = 1.57).

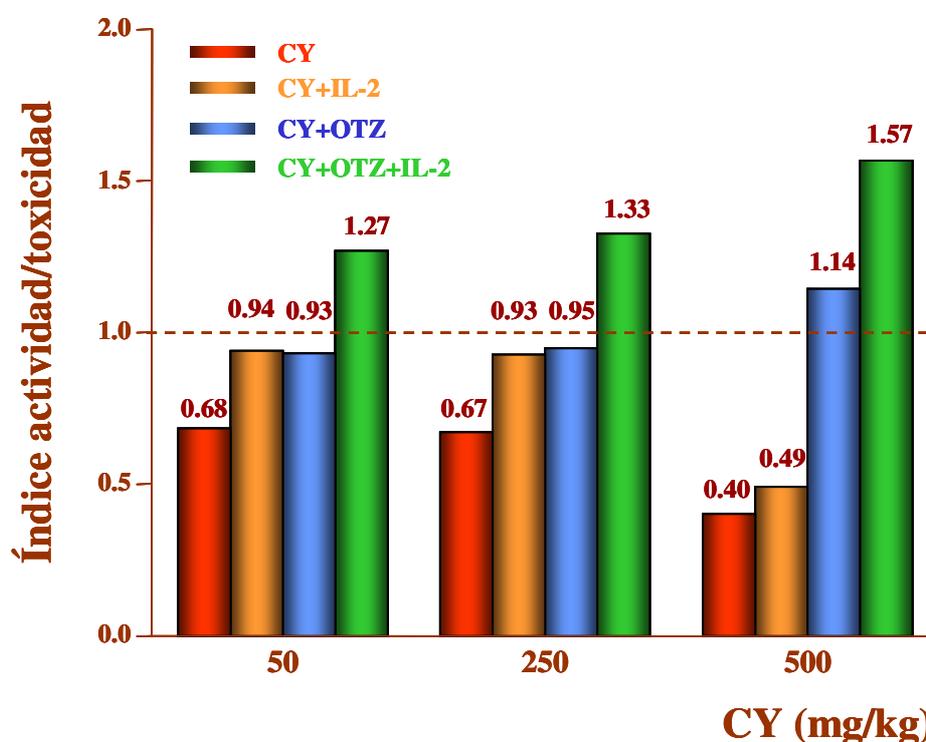


Figura 38. Índice actividad / toxicidad (IAT) de los tratamientos con CY, CY + IL-2, CY + OTZ y CY + OTZ + IL-2. Valores de IAT mayores de 1 indican un beneficio terapéutico.

VI. DISCUSIÓN

El melanoma maligno metastático constituye una entidad tumoral clínicamente relevante debido a que el índice de supervivencia de los pacientes que presentan dicha enfermedad no ha mejorado en los últimos 20 años, a pesar de la aparición de múltiples estrategias antineoplásicas. Esto ha motivado la búsqueda de nuevas modalidades terapéuticas basadas, sobre todo, en el conocimiento de la biología tumoral.

En base a las relevantes funciones biológicas del GSH en el particular metabolismo del melanoma, diversos estudios han centrado en este tripéptido la diana de una nueva estrategia terapéutica: la modulación de los niveles intracelulares de GSH.

Son múltiples los argumentos que justificarían esta forma de abordaje antitumoral. Por un lado, se ha demostrado que las células del melanoma presentan niveles elevados de GSH y que dichos niveles están relacionados no sólo con una mayor capacidad metastática, sino también con la inherente drogorresistencia que presenta este tipo de tumor (Prezioso, 1992; Serafino, 1998; Serrone, 1999). Estos datos, junto a la importante implicación del GSH en la síntesis de melanina –participa en la detoxificación de los productos tóxicos, como la dopaquinona, producidos durante la síntesis de este pigmento– hacen de este tripéptido un elemento biológico fundamental en la evolución del melanoma.

De hecho, se ha descrito que la disminución farmacológica de los niveles de GSH reduce la capacidad proliferativa de dichas células tumorales (Meister, 1983; Hutter, 1997), tal y como hemos observado también en el presente estudio en las células del melanoma murino B16F10 y melanoma humano A375.

En la actualidad, una de las modalidades antitumorales más utilizadas en el melanoma metastático, la quimioinmunoterapia o bioquimioterapia, presenta como uno de los principales inconvenientes la elevada toxicidad que producen la mayoría de los protocolos ensayados en la clínica. Dentro de las sustancias farmacológicas empleadas, los agentes alquilantes como representante quimioterápico, y la IL-2 como representante bioterápico, son unos de los mayores exponentes utilizados en dicha bioquimioterapia.

En relación con los primeros, es conocida la significativa disminución del GSH inducida por los agentes alquilantes, como la CY, en células hepáticas, células de la mucosa vesical, linfocitos, etc. Esto explica, en parte, la toxicidad producida por estos citostáticos, observándose, inmunosupresión, náuseas, vómitos, alopecia, neumonitis y fibrosis pulmonar, cardiotoxicidad, disfunción gonadal, cistitis hemorrágica y toxicidad hepática (Gershwin, 1974; Segura, 2001; McDonald, 2002). Dicha toxicidad reduce considerablemente la calidad de vida de los pacientes y limita de forma importante la posibilidad de administrar dosis de intensificación, lo que permitiría aumentar su respuesta terapéutica (McBride, 1987). En el caso particular de la CY, en este estudio hemos observado la importante reducción intracelular del GSH y la significativa leucopenia dosis-dependiente que produce este fármaco.

La CY –N,N-bis(β -cloroetil)-N',O-propilen ácido fosfórico éster diamida– (Gershwin, 1974) es un agente antineoplásico utilizado, desde 1960, en el tratamiento de una gran variedad de tumores humanos como meduloblastomas (Friedman, 1986; Zia, 2002), leucemias (Robak, 2002), linfomas (Sparano, 2002), adenocarcinoma de próstata (Bayani, 2002), carcinomas de mama (Colozza, 2002), pulmón (Ardizzoni, 2002) y ovario (Harper, 2002), además del melanoma (Mitchell, 1989; Curti, 1998; Bass, 1998; Berd, 2001; Mitchell, 2003).

Aunque este citostático no es un agente habitual en la quimioterapia del melanoma, ha sido utilizado en estudios de experimentación animal y en el tratamiento quimioinmunoterápico del melanoma humano, debido a la existencia, según algunos autores, de sinergia en la actividad antitumoral de la CY y la IL-2 (Dray, 1989; Ueno, 1994; Mastrangelo, 1996; Bass, 1998).

Son conocidas las propiedades inmunosupresoras de los agentes quimioterápicos; sin embargo, se ha observado, tanto en ensayos en animales como en estudios humanos, que algunos citostáticos, como la CY, administrados a dosis bajas, potencian la respuesta inmune (Berd, 1988; Mitchell, 1992). Este hecho puede ser debido a que la CY mejora la inmunidad debido a la inhibición selectiva de las células T supresoras o de sus progenitores (Livingston, 1987; Bass, 1998).

La CY es un agente que necesita ser metabolizado por las enzimas microsomales hepáticos para poder ejercer su efecto antitumoral. Por acción de la citocromo P450, la CY se convierte en 4-hidroxíciclofosfamida, la cual está en equilibrio tautomérico con la aldofosfamida; ésta por intermedio del GSH es convertida en fosforamida mustard –el metabolito más importante de la actividad antineoplásica de la CY– y acroleína [Figura 39]. A este último se le considera el principal metabolito responsable de la reducción del contenido de GSH producido por la CY y, en consecuencia, de la toxicidad producida por este agente antitumoral (Friedman, 1990; Ramu, 1995; Kehrer, 2000). De hecho, el GSH es la diana más importante de la acroleína, la cual disminuye el contenido intracelular de este tripéptido mediante la conjugación no enzimática con el grupo tiol (DeLeve, 1996).

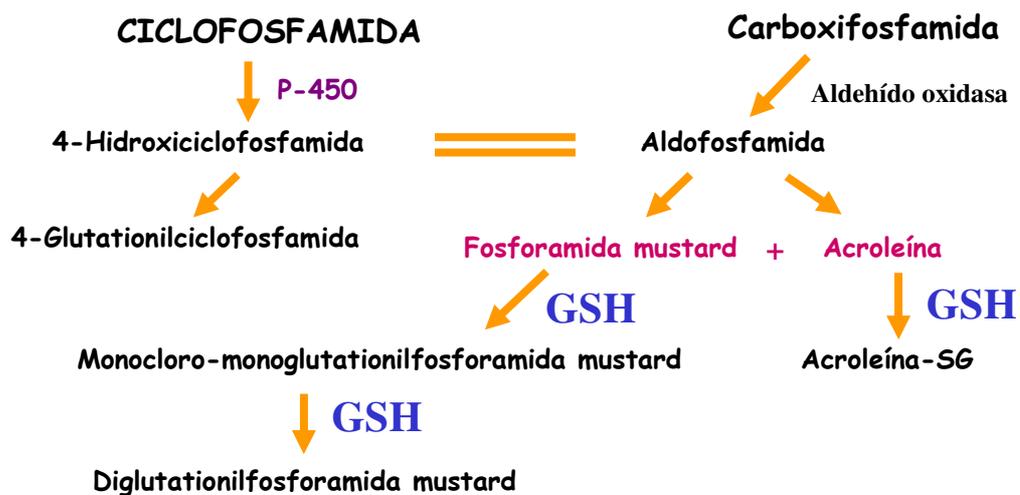


Figura 39. Metabolismo de la CY.

Tal y como hemos observado en los estudios *in vitro*, la acroleína produce también una disminución importante de GSH en las líneas de melanoma B16F10 y A375, lo que en consecuencia, reduce la capacidad proliferativa de estas células tumorales.

VI. Discusión

La disminución de la capacidad tumorigénica fue observada también en los estudios *in vivo*, en donde el efecto antitumoral de la CY dio lugar a un aumento significativo de la supervivencia de los animales con metástasis hepáticas del melanoma B16F10. Dicho incremento fue dosis-dependiente como pudo observarse con las dosis de 50 y 250 mg/kg, siendo 500 mg/kg una dosis letal en el 100% de los animales.

Al igual que los agentes alquilantes, la administración de IL-2 produce, también, un amplio abanico de efectos tóxicos, entre los que cabe destacar la hipotensión, la toxicidad del sistema nervioso central, cardiorrespiratoria, renal, hepática, hematológica (Kammula, 1998; Mavroukakis, 2001; Eklund, 2004) e incluso mortalidad en un 2% de los pacientes tratados (Keilholz, 2000; Atkins, 2002), lo que limita sustancialmente su utilización terapéutica.

La utilización de la IL-2 en la terapia antitumoral se fundamenta en ser el factor de crecimiento más potente de las células T. Una vez que las células T CD4⁺ o CD8⁺ han sido activadas a través del receptor de la célula T (TCR), la existencia de IL-2 exógena es suficiente para inducir por un factor de mil su expansión clonal (Smith, 1980). La IL-2 ejerce sus efectos estimuladores –activación, proliferación y supervivencia– de las células del sistema inmunitario del huésped a través de su receptor específico (IL-2R), expresado en la membrana de las células inmunes.

En las células normales, existen dos tipos de receptor para la IL-2, el receptor de intermedia afinidad y el receptor de alta afinidad. El receptor de intermedia afinidad es un complejo heterodimérico formado por las subunidades IL-2R β (p75; también conocido como CD122) e IL-2R γ (p64; conocido también como CD132), el cual se expresa de manera constitutiva en diversos tipos celulares, entre los que están los linfocitos T, células NK, eosinófilos basófilos y neutrófilos. Cuando la célula es activada por antígenos, mitógenos y algunas citocinas, se expresa el IL-2R α (p55; también conocido como CD25), que en asociación con el receptor de intermedia afinidad darán lugar a la forma de heterotrimérica llamada complejo de alta afinidad (Taniguchi, 1993; Gómez, 1998) [Figura 40].

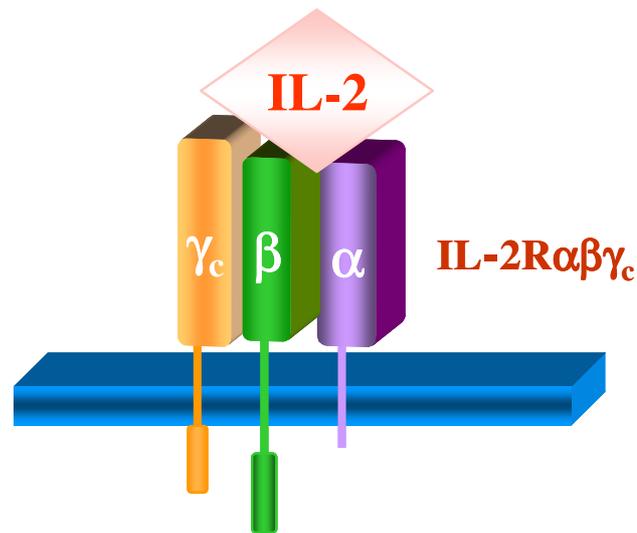


Figura 40. Interleucina-2 (IL-2) y su receptor (IL-2R).

Está demostrado que el IL-2R α es el principal responsable de la unión específica de la IL-2 para la formación del complejo de alta afinidad y, en consecuencia, del estímulo de las funciones de los linfocitos dependientes de esta interleucina. Es conocido que en ausencia de IL-2, las subunidades del IL-2R no se encuentran acopladas en la superficie de la célula T. Como se ha comentado anteriormente, en las células T activadas, se produce un alto nivel de expresión del IL-2R α , y es la unión de IL-2 al IL-2R α la que permite el acoplamiento de esta subunidad con las unidades IL-2 β y IL-2 γ , para dar lugar a la forma heterotrimérica estable y al inicio de la transducción de la señal. De este modo, es la expresión del IL-2R α y su unión a la IL-2 lo que limita la funcionalidad del IL-2R de alta afinidad en estas poblaciones celulares (Malek, 2004).

Igualmente, en los linfocitos T citotóxicos dependientes de IL-2, el reconocimiento y la posterior unión de la IL-2 al receptor α , activa la formación del complejo de alta afinidad, iniciándose así, la cascada de señales celulares (Droge, 1994; Liu, 1996).

VI. Discusión

En este estudio, hemos comprobado que el 70.2% y 96.3% de las PBMCs estimulados con el mitógeno PHA-M durante 4 h y 24 h, respectivamente, expresan el IL-2R α . Sin embargo, la expresión de dicho receptor no es exclusiva de las células normales sino que también es expresado por las células de determinados tumores sólidos, entre otros, algunos adenomas, carcinomas renales, fibrosarcomas, tumores de mama y melanoma (Plaisance, 1993; Doucet, 1997; García-Vázquez, 2000).

En el caso particular del melanoma, se ha descrito que algunas líneas de melanoma humano, en condiciones de cultivo normales, presentan la capacidad de secretar IL-2 de forma autocrina.

Por otro lado, diversos estudios han demostrado que el tratamiento con esta interleucina produce además un incremento de la proliferación de las células del melanoma (Alileche, 1993; Boyano, 1997; García-Vázquez, 2000). Dicho efecto protumoral de la IL-2 ha sido comprobado también en nuestro estudio con las líneas del melanoma B16F10 y A375, las cuales expresan, efectivamente, el receptor para dicha citocina.

En este trabajo hemos observado además, que la administración de IL-2 en estas líneas de melanoma lleva consigo un rápido incremento de los niveles de GSH previo al aumento de su capacidad proliferativa. En este sentido, se debe tener en cuenta que el contenido intracelular de GSH influye de manera importante en el efecto de la IL-2. De hecho, en estudios realizados en linfocitos, se ha observado que dicho tripéptido interviene en la regulación de la unión, internalización y degradación celular de esta citocina, afectando también, al crecimiento y diferenciación linfocitaria, como se ha demostrado en los linfocitos T citotóxicos (Liang, 1989, 1991). En estos estudios se ha demostrado, asimismo, que la disminución de los niveles de GSH induce una supresión de la proliferación celular causando importantes disfunciones inmunes (Smyth, 1991). Dicha disfunción puede estar motivada por alteraciones en diferentes señales de transducción de la IL-2, en los que igualmente participa el GSH.

Entre las señales importantes en la transducción del estímulo biológico de esta interleucina se encuentra la proteína quinasa C –PKC– (Gómez, 1995; Isakov, 2002) y el factor de transcripción nuclear kappa B –NFκB– (Gómez, 1997).

La PKC es una serina/treonina quinasa citoplasmática, dependiente de fosfolípidos, cuya activación es uno de los sucesos más rápidos en la cascada de señales de transducción. La PKC es una familia de isoenzimas que son fosforiladas o activadas en respuesta a factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores y citocinas (Lahn, 2004). Esta proteína participa en importantes funciones celulares como el crecimiento celular, la diferenciación, la expresión génica (Mellor, 1998; Isakov, 2002), además de la activación de los linfocitos T (Berry, 1990; Isakov, 2002). En este último caso, la estimulación de las células T se produce como resultado de la transcripción de algunos genes y de la expresión de una variedad de moléculas entre las que se encuentran las citocinas y sus receptores, como es el caso de la IL-2 e IL-2R (Szamel, 1998; Isakov, 2002).

Se ha observado que alteraciones en el estado redox están implicados en una gran variedad de funciones bioquímicas entre la que se encuentra la actividad de dicha proteína quinasa y otras enzimas implicadas en las señales de transducción (Anderson, 1983; Bauskin, 1991). De esta manera, la actividad PKC puede ser susceptible de ser regulada por los niveles intracelulares de GSH, habiéndose sugerido que la disminución de dichos niveles podría interrumpir las funciones esta enzima, alterando así, el proceso de la proliferación celular (Ward, 1998).

Entre las diferentes isoenzimas de la PKC, se ha observado niveles anormales de PKC α en muchas líneas celulares transformadas y en varios tumores humanos, asociándose esta expresión a una motilidad e invasividad alta de las células tumorales.

Asimismo, en algunas células tumorales epiteliales de hígado de rata, se ha observado que el aumento de la PKC α puede activar el NF- κ B, dando lugar a la proliferación tumoral y, a su vez, a una reducción de la apoptosis de dichas células tumorales (Lahn, 2004).

De este modo, el NF- κ B es otro de los factores importantes en el metabolismo celular, participando en funciones relacionadas con la diferenciación funcional de las células inmunes, resistencia ante la inducción de la apoptosis, la transformación celular y el crecimiento tumoral (Baeuerle, 1996; Janssen-Heininger, 2000).

En las células no estimuladas, el NF- κ B se encuentra en el citoplasma en su forma no activa mediante su interacción, entre otros, con inhibidores específicos como son las proteínas de la familia I κ B – α , β , γ y ϵ –.

La activación del NF- κ B se produce cuando este factor se disocia de su inhibidor (I κ B), pudiendo translocarse al núcleo (Miyamoto, 1994; Arlt, 2002). Algunas quinasas, como RNA-quinasa activada –PKR– (Kumar, 1994), Raf-I (Li, 1993) y las isoformas de PKC, ξ PKC y ϵ PKC (Genot, 1995) e I κ B quinasa (IKK), están implicadas en dicha activación del NF- κ B, siendo esta última proteína quinasa, fundamental en la activación del factor de transcripción en respuesta a la citocinas proinflamatorias (DiDonato, 1997).

De hecho, el NF- κ B está implicado en la inducción de la transcripción de genes de gran importancia inmunológica, como los relacionados con el TNF- α , antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad, el IL-2R y la IL-2 (Gómez, 1997). En este sentido, el promotor del gen de la IL-2 y el IL-2R α contiene una secuencia con sitios de unión para el NF- κ B (Grant, 1992; Droge, 1994). Los estudios realizados sugieren que la activación de la IL-2 mediante el NF- κ B podría ocurrir a través de las quinasas Rho y ξ PKC (Baeuerle, 1996) y que la unión del NF- κ B a su secuencia de reconocimiento está influida por el ambiente redox (Hutter, 2000; Dominici, 2003). De hecho, Liu y cols. (2000) sugieren un modelo bifásico que explicaría el requerimiento dual de un estado de oxidación-reducción celular en la activación del NF- κ B. En dicho modelo, se propone que el GSSG citosólico sería necesario para la activación del NF- κ B, mientras que el GSH nuclear estaría implicado en la unión óptima del NF- κ B a su secuencia [Figura 41].

El requerimiento dual del estado redox anteriormente citado se ha comprobado en ensayos realizados *in vitro*, observándose que, por un lado, alteraciones en los niveles de GSSG citoplasmáticos provocados, por ejemplo, por el incremento de los niveles de H₂O₂ celulares, activa el factor NF- κ B y que, por otro lado, el aporte de antioxidantes como la cisteína, NAC o vitamina E produce la inhibición de su activación (Meyer, 1993; Droge, 1994; Hutter, 2000).

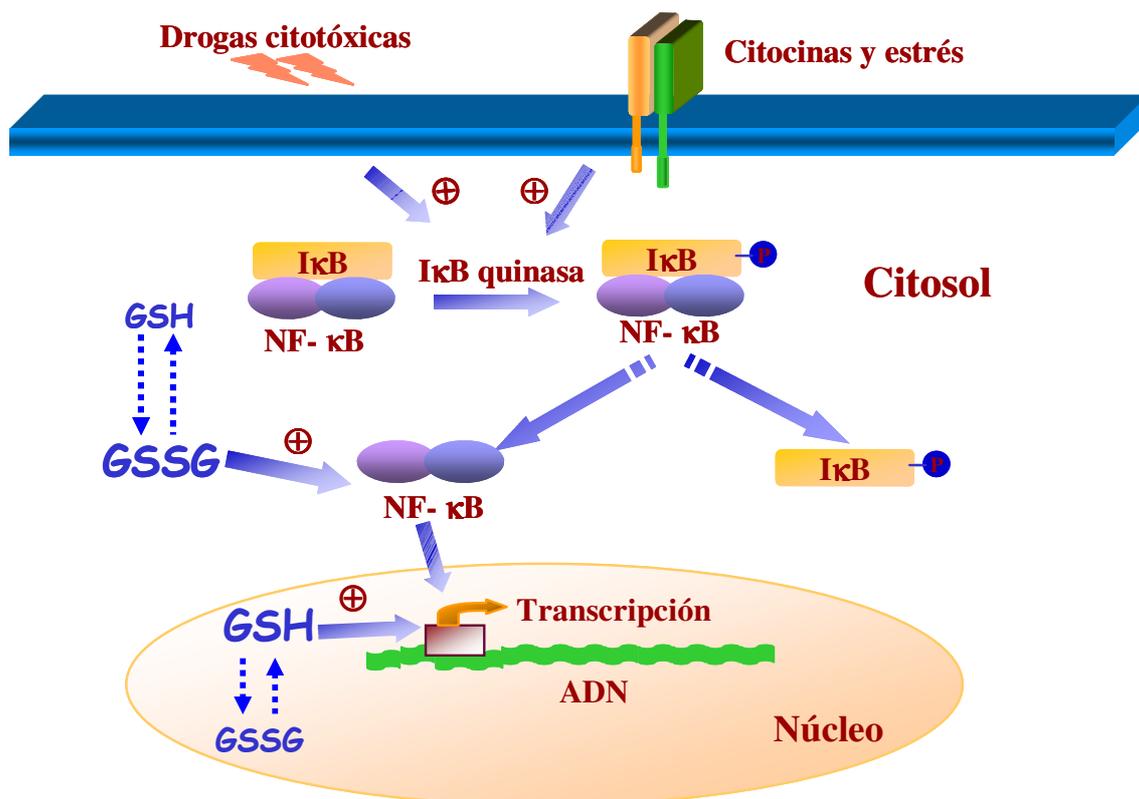


Figura 41. Estado de oxidación-reducción celular necesario para la activación del NF- κ B.

Por otra parte, la activación del NF- κ B en las células del melanoma se puede producir de manera espontánea, sin estímulo exógeno (Liu, 2000). Esta activación del NF- κ B ha sido descrita en un gran número de tumores sólidos y permite, no sólo la transformación maligna y la progresión tumoral, sino que también proporciona a la célula tumoral mecanismos que le hacen escapar de la vigilancia del sistema inmune y de las terapias antitumorales (Ravi, 2004).

De esta manera, se ha observado que la inhibición del NF- κ B puede aumentar la sensibilidad de las células tumorales a los agentes antineoplásicos y, en consecuencia, se ha propuesto la inhibición de este factor de transcripción en las células tumorales como diana terapéutica.

Sin embargo, tal y como se ha señalado anteriormente, el NF- κ B es un factor importante en la respuesta inmune y se ha observado que los inhibidores de este factor de transcripción –antiinflamatorios, glucocorticoides y antioxidantes, entre otros– no son selectivos ya que, igualmente, inhiben el NF- κ B en las células del sistema inmune (Arlt, 2002).

Todos estos datos sugieren, que la acción de la IL-2 depende, en gran medida, del contenido existente de GSH intracelular. Por lo tanto, en el tratamiento de los animales llevado a cabo en nuestros estudios con la combinación de CY + IL-2, la disminución de GSH observada en los PBMCs tras la administración del agente alquilante impediría llevar a cabo un efecto estimulador adecuado de la IL-2 sobre dichas células inmunes. De hecho, hemos observado que la adición de IL-2 al tratamiento con CY no produce ningún beneficio terapéutico, e incluso da lugar a un IAT inferior a la unidad en los animales tratados con dicha terapia combinada.

Con el objetivo final de aumentar el índice terapéutico del tratamiento bioquimioterápico en el melanoma, en el presente trabajo se ha llevado a cabo una modulación farmacológica selectiva del GSH con los siguientes objetivos particulares:

1. Aumentar el contenido de GSH en las células normales, que tenga efecto citoprotector contra la toxicidad inducida por el tratamiento quimioinmunoterápico.
2. Disminuir simultáneamente el contenido de GSH en las células del melanoma, consiguiendo un efecto quimiosensibilizador al tratamiento quimioterápico.

3. En base al cumplimiento de los objetivos previos, llevar a cabo tratamientos quimioterápicos *in vivo* con dosis de intensificación, sin aumento de la toxicidad limitante.
4. Revertir el efecto protumoral de la IL-2, manteniendo su acción estimuladora del sistema inmune.
5. Aumentar la respuesta antitumoral de la bioquimioterapia consiguiendo incrementar la supervivencia con una toxicidad aceptable.

Esta modulación selectiva de los niveles de GSH de forma simultánea en el tejido normal y tumoral ha sido posible gracias a la utilización de OTZ. Los efectos de esta prodroga de cisteína han sido comparados con los producidos por la NAC y BSO, dos agentes que han sido ampliamente utilizados en estudios preclínicos y clínicos para la modulación del GSH.

La NAC es una prodroga de cisteína desarrollada para evitar la importante toxicidad que produce la administración directa de este aminoácido, el cual es un elemento esencial para la síntesis de GSH. Desde 1984, se están realizando estudios con esta sustancia por su utilidad en la prevención de enfermedades relacionadas con alteraciones del estado redox y en procesos tumorales (Zafarullah, 2003).

Los mecanismos de protección de este tiol frente a la mutagénesis y la carcinogénesis están relacionados con un importante número de efectos biológicos, entre los que destacan la actividad antioxidante, participación en los mecanismos de reparación del ADN, la modulación de la expresión génica y de las señales de transducción, efectos inmunológicos, la regulación de la supervivencia celular y de la apoptosis, la inhibición de la transformación celular, de la invasión y metástasis y de la actividad angiogénica, entre otras (Albini, 1995; Morini, 1999; De Flora, 2001).

Debido a todos estos efectos, la NAC ha sido utilizado en clínica para el tratamiento de diferentes patologías asociadas con niveles deficientes de GSH como el síndrome distrés respiratorio (Bernard, 1997), enfermedad broncopulmonar crónica (Grandjean, 2000; Stey, 2000), daño hepático producido por el acetaminofeno y el SIDA.

En esta última enfermedad, caracterizada por los bajos niveles de GSH en el plasma y en las PBMCs infectadas por el virus, la administración continuada de NAC aumenta los niveles de GSH en dichas células, pudiendo realizar éstas sus funciones inmunes, además de suprimir la expresión del virus VIH (Kalebic, 1991; Mihm, 1991; Droge, 1993).

En relación al tratamiento antitumoral, la inducción del incremento de la síntesis de GSH por la NAC ha motivado su utilización, principalmente, como agente quimioprotector empleado junto con agentes alquilantes, como por ejemplo, contra la urotoxicidad asociada a la CY o la nefrotoxicidad relacionada con el tratamiento con cisplatino (Gosland, 1996; Khuri, 2000).

Sin embargo, dicho incremento de los niveles de GSH por la NAC no es específico de las células normales, ya que, como hemos observado, su acción estimuladora se produce también en las células del melanoma B16F10, aumentando su capacidad proliferativa y protegiendo a las mismas contra la acción citotóxica de la acroleína. Por otro lado, se debe tener en cuenta que el tratamiento con la NAC produce también una serie de efectos secundarios como náuseas, vómitos, diarreas y broncoespasmo (Flanagan, 1991).

En lo referente al BSO, la eficacia del tratamiento con este inhibidor de la γ -GCS ha sido demostrada tanto en los estudios preclínicos como en ensayos clínicos, habiendo sido utilizado, principalmente, con la finalidad de –a través de la reducción de los niveles de GSH– incrementar la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento con radiaciones ionizantes (Leung, 1993; Yi, 1994; Tobi, 2000) y drogas citostáticas como los agentes alquilantes (Russo, 1986; O'Dwyer, 1996; Bailey, 1997).

Los estudios que hemos llevado a cabo con este agente modulador para el tratamiento de las células del melanoma B16F10 están en consonancia con lo descrito en la bibliografía. Los ensayos realizados *in vitro* nos permitieron observar que la importante reducción de GSH (97%) producida por el BSO dio lugar a una significativa inhibición de la proliferación de las células B16F10.

Asimismo, esta reducción del GSH mediada por el BSO produjo un incremento en la citotoxicidad inducida por la acroleína, observándose un efecto sinérgico en el resultado antiproliferativo producido con la combinación de ambos tratamientos (FMD = 1.8).

Estos efectos antiproliferativos demostrados *in vitro*, se extendieron a los ensayos *in vivo*, donde la administración aislada de BSO incrementó la supervivencia de los animales (IS = 115%) y su combinación con CY demostró mayor eficacia antitumoral que el tratamiento con el citostático de forma aislada (IS = 200% con el BSO + CY y 177% con CY, respectivamente).

Sin embargo, dicha eficacia antitumoral se acompañó de un incremento de la toxicidad, en comparación a la producida por el tratamiento único con el agente alquilante. En particular, se produjo un aumento significativo de la pérdida de peso, anemia y, sobre todo, un incremento de la leucopenia. Este efecto tóxico ha sido también previamente descrito en estudios clínicos, en donde, por ejemplo, se ha observado que la asociación de melfalán con BSO incrementa significativamente la mielosupresión (Bailey, 1998).

Dicha toxicidad es debida a que el BSO no ejerce su actividad de forma selectiva, reduciendo los niveles de GSH tanto en las células tumorales como en las células sanas y sensibilizando, en consecuencia, ambas poblaciones celulares al efecto tóxico de los agentes alquilantes. En este sentido, en nuestros estudios hemos observado que el tratamiento *in vivo* con BSO produce una disminución (51%) significativa del contenido intracelular de GSH de las PBMCs.

Igualmente, otros autores han demostrado en estudios *in vitro*, que el BSO da lugar a una reducción de la capacidad proliferativa linfocitaria en respuesta a la IL-2, a través de la reducción del contenido intracelular de GSH y la inactivación del NF- κ B, entre otros mecanismos (Droge, 1994).

Además de la toxicidad a nivel del sistema inmune, el tratamiento con BSO produce también, entre otros efectos secundarios, toxicidad gastrointestinal, urinaria y del sistema nervioso central (O'Dwyer, 1996; Bailey, 1998).

La consecución de la modulación selectiva del GSH como estrategia terapéutica depende, según diversos estudios, del conocimiento de las diferencias fisiológicas existentes entre las células sanas y tumorales en la síntesis y metabolismo del GSH, así como del nivel de expresión de las enzimas relacionadas con el GSH.

En este sentido, se ha demostrado una menor expresión de la enzima 5-OPasa en algunas líneas de células tumorales en relación a las células sanas, por lo que ha sido considerada como un factor importante para obtener dicha modulación selectiva del GSH (Chen, 1998).

La 5-OPasa cataliza la hidrólisis de la 5-oxo-L-prolina a L-glutamato –uno de los tres aminoácidos que forman parte en la síntesis del GSH– uniendo de esta forma las reacciones de síntesis y metabolismo del GSH en el ciclo γ -glutamilo (Van Der Werf, 1975). Se ha observado que el OTZ –análogo de la 5-oxo-L-prolina– actúa también como sustrato de la 5-OPasa, la cual convierte a esta prodroga de cisteína en S-carboxicisteína, hidrolizándose, posteriormente, a cisteína y CO₂ (Meister, 1983; Baruchel, 1995; Chen, 1998).

Algunos estudios han demostrado que, al contrario de lo que ocurre con el NAC y el BSO, el tratamiento con OTZ presenta el beneficio de la selectividad, incrementando los niveles de GSH en el tejido sano y disminuyéndolo, paradójicamente, en el tejido tumoral (Russo, 1986; Baruchel, 1995; Wang, 1996; Chen, 1998).

Dichos estudios sugieren que el OTZ, actuando en competencia con la 5-oxo-L-prolina por la 5-OPasa, podría ejercer dos efectos diferentes sobre los niveles de GSH, dependiendo del nivel de expresión de la enzima 5-OPasa y de la cantidad de aminoácidos necesarios para la síntesis de GSH (Meister, 1983; Srivenugopal, 1997; Chen, 1998). De este modo, el OTZ incrementaría los niveles intracelulares de GSH de las células sanas a través de un aumento del aporte de cisteína –en condiciones normales el aminoácido limitante de la síntesis de GSH en dichas células– (Williamson, 1982; Meister, 1983; Baruchel, 1995), y reduciría el contenido de GSH de las células tumorales mediante la inhibición de la síntesis de glutamato a partir de la 5-oxo-L-prolina.

De hecho, se ha observado que en las células tumorales y en otras células en condiciones de estrés oxidativo, el glutamato es el factor limitante de la síntesis de GSH (Matsuno, 1992; Kang, 1993).

Este efecto selectivo de la modulación del GSH por el OTZ ha sido observado también en nuestros estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*. Entre los resultados obtenidos destaca el hecho de que el efecto terapéutico del OTZ depende tanto de la concentración utilizada como del tiempo de exposición a dicho agente.

En los ensayos *in vitro* observamos que la administración del OTZ reduce significativamente el contenido intracelular de GSH en los dos modelos de melanoma utilizados, siendo máxima dicha reducción –alrededor del 50%– una hora tras la exposición a la procisteína. Sin embargo, este efecto no se produce de forma dosis-dependiente, sino a una concentración óptima específica –1 mM en el melanoma B16F10 y 2.5 mM en el melanoma A375–, de manera que dosis superiores o inferiores a ésta anula su efecto terapéutico.

Otros estudios llevados a cabo en diferentes modelos tumorales, han descrito que la administración de OTZ no produce ninguna modificación o incluso incrementa los niveles de GSH (Sugimoto, 1996).

En este sentido, otros autores señalan que la administración de dosis altas de OTZ puede producir una inhibición prácticamente total del metabolismo de la 5-oxoprolina, lo que daría lugar a una acumulación de ésta, y la consecuente saturación de la 5-OPasa (Williamson, 1981; Anderson, 1998). Si este es el caso, es posible que tenga lugar una vía alternativa para la biosíntesis de GSH a través de las enzimas pertenecientes al ciclo γ -glutamilo, la γ -GT y la GSH sintetasa, que actuarían como by-pass de la GCS, tal y como se ha demostrado en algunas líneas celulares con el tratamiento con BSO (van Klaveren, 1997). Estas discrepancias revelan el hecho de la importancia de la concentración y tiempo de exposición al OTZ, así como del tipo de línea tumoral sobre la que se realiza el estudio.

En nuestro caso, la reducción del contenido intracelular del GSH producido por el OTZ dio lugar no sólo a una reducción de la proliferación de las células del melanoma B16F10 y A375, sino que incrementó de manera significativa su sensibilidad a la citotoxicidad inducida por la acroleína, produciéndose de este modo un efecto sinérgico entre el OTZ y dicho metabolito de la CY (FMD = 1.3) en el caso del melanoma B16F10, y un efecto aditivo (FMD = 0.8) en el caso del melanoma A375.

Otro aspecto importante del OTZ en ambas líneas celulares fue la anulación del efecto protumoral que sobre las mismas produce la IL-2, de manera que la exposición a dicha procisteína previo al tratamiento con IL-2, inhibe el aumento de los niveles de GSH inducido por la interleucina, y da lugar a una mayor reducción de la proliferación celular que la obtenida con el tratamiento aislado de OTZ. Este efecto podría ser debido a una inhibición de la unión de la IL-2 a su receptor presente en la superficie celular de las células de melanoma utilizadas.

En este sentido, en el presente estudio se ha investigado el efecto del OTZ sobre la expresión del IL-2R α en las células del melanoma A375, el cual está presente en un 81.5% de la población celular. De esta manera, pudimos observar que mientras el tratamiento con OTZ disminuye la expresión del IL-2R α , la exposición de las células a la IL-2 aumenta significativamente la densidad del mismo, lo cual puede ser producido a partir de la señalización intracelular tras la unión del complejo IL-2/IL-2R.

Sin embargo, la exposición previa a OTZ reduce el efecto de la IL-2, de manera que la densidad del receptor es menor a la observada tras el tratamiento con IL-2 sola. Este efecto puede ser debido a que el tratamiento con OTZ altera la señalización de la IL-2, bien dificultando la unión de la interleucina a su receptor, o bien obstaculizando la síntesis de los receptores para su posterior internalización. La disminución de dicha internalización podría estar relacionada, también, con un descenso de la actividad PKC y del NF- κ B que, como se ha señalado anteriormente, son dependientes del estado redox intracelular y sensibles, por lo tanto, a una disminución del contenido intracelular de GSH como la producida por el OTZ.

Acorde con estos datos, resulta también evidente el hecho de que se produzca una menor utilización y secreción de la IL-2 por parte de las células del melanoma A375 cuando éstas han sido previamente tratadas con OTZ. Así, mientras en los cultivos de A375 control y en los tratados con OTZ no se detecta la presencia de IL-2 en el sobrenadante, en las células tratadas con IL-2, una vez producido el consumo inicial, es posible detectar niveles superiores de IL-2 a los añadidos inicialmente. Estos resultados sugieren que, si bien las células del melanoma A375 expresan constitutivamente el IL-2R, son capaces de sintetizar IL-2 de forma autocrina y utilizan el complejo IL-2/IL-2R para su proliferación, este sistema no es funcional hasta que se produce la unión de IL-2 exógena al IL-2R y la posterior internalización de la señal del complejo IL-2/IL-2R. Es lógico pensar que la presencia de dicha IL-2 exógena puede provenir de la secretada por las propias células del sistema inmune o de la suministrada como droga antitumoral durante la terapia del melanoma. De este modo, el propio tratamiento con IL-2 activaría el mecanismo de estimulación autocrina de dicha citocina, lo que permitiría su utilización y posterior secreción por parte de las células del melanoma, induciendo así, un aumento de su proliferación celular. Este hecho enfatiza, más aún si cabe, la importancia de la modulación selectiva de la actividad de la IL-2 en las células sanas y tumorales, lo cual puede ser llevado a cabo con el tratamiento con OTZ.

VI. Discusión

En el caso de las células del melanoma A375, el mecanismo de secreción autocrina de IL-2 se encontraría reducido ante la presencia de OTZ, dado que la concentración de IL-2 detectada en el sobrenadante de los cultivos tratados con OTZ + IL-2 es significativamente inferior respecto a las células tratadas con IL-2 sola.

Respecto al efecto del OTZ en las PBMCs, nuestros resultados muestran que, al contrario de lo que ocurre en las células de melanoma A375, la exposición previa de OTZ a la IL-2 da lugar a una mayor expresión del IL-2R α . Así, hemos observado que, a las 4 horas después del tratamiento, si bien los tratamientos aislados con OTZ e IL-2 aumentan el IL-2R α (18.7% y 39.0%, en comparación al control, respectivamente), la exposición a OTZ + IL-2 indujo una mayor expresión de dicho receptor (45.6%). Este efecto es de gran importancia dado que la expresión de dicho receptor es fundamental para la expansión clonal posterior de las células linfocitarias (Cheng, 2002).

Sin embargo, a las 24 horas del tratamiento, mientras la exposición con IL-2 mantiene aumentada la expresión del receptor, el tratamiento con OTZ solo y la combinación OTZ + IL-2 provoca una disminución de dicho receptor, si bien con el tratamiento combinado no se producen diferencias en comparación al control.

En concordancia con estos resultados, el estudio de la proliferación indica que los tratamientos de las PBMCs con OTZ, IL-2 y OTZ + IL-2 dan lugar a un aumento significativo de la proliferación celular a las 24 horas, aunque después de este tiempo únicamente la exposición a IL-2 sola mantiene una expansión clonal continua a las 48 y 72 h. De este modo, resulta importante señalar que en las primeras horas de tratamiento, el aumento de los niveles intracelulares de GSH, como el inducido por OTZ, es señal suficiente capaz de aumentar inicialmente (y con la misma intensidad que lo produce el tratamiento con IL-2 sola) el índice proliferativo sin la presencia de IL-2. Otros autores han señalado también que la proliferación *in vitro* de las células T puede ocurrir de forma independiente al complejo IL-2/IL-2R (Razi-Wolf, 1996). Estos resultados enfatizan el hecho de que uno de los acontecimientos moleculares más precoces que se producen de forma previa al aumento de la división celular linfocitaria es el incremento de los niveles intracelulares de GSH.

De hecho, tal y como se ha comentado anteriormente, ya a los cinco minutos de la administración de OTZ se produce el aumento de este tripéptido. Pero el tratamiento único con OTZ es incapaz de mantener la expansión clonal después de las 24 horas, y en ausencia de IL-2 disminuye de forma muy acusada la población celular –seguramente a través de un proceso apoptótico–, incluso por debajo de los niveles del control. Sin embargo, con la exposición al tratamiento combinado OTZ + IL-2 se produce una menor disminución de la población celular, no existiendo diferencias significativas respecto a las células control. Estos datos, por un lado, confirman la necesaria presencia de IL-2 para una mayor expansión clonal a más largo plazo de las células previamente estimuladas, lo cual ha sido demostrado también por otros autores (Malek, 2004); por otro lado, sugieren el hecho de que quizás el aumento de los niveles de GSH previo al tratamiento con IL-2 acelere el proceso de expansión clonal, diferenciación y posterior entrada en apoptosis de las células linfocitarias y, en definitiva, induzca una renovación acelerada de dicha población celular.

Esta posible explicación coincidiría con los resultados observados en los estudios *in vivo*, en donde el tratamiento con ambos agentes OTZ + IL-2, administrado en combinación con CY, es el que mejor resultado produce en términos de mayor supervivencia global y menor toxicidad, permitiendo incluso la administración de dosis letales del citostático.

En dichos estudios *in vivo*, pudimos observar que el OTZ demuestra en sí mismo actividad antitumoral, incrementando significativamente la supervivencia de los animales tratados –días 0 al 8– respecto al grupo control. Al igual que en la experimentación *in vitro*, el efecto terapéutico del OTZ se produce de manera no dosis dependiente, siendo máximo (IS = 123%) con la concentración de 2.5 mmol/kg, mientras concentraciones diferentes dan lugar a mínimas o nulas diferencias respecto al control. Resulta importante reseñar, además, que dicho tratamiento no produjo toxicidad significativa en los animales. En estudios clínicos realizados con la administración de OTZ en otras patologías, la aplicación de este fármaco tan sólo produjo sofocos, pruritos y mareos (Kalayjian, 1994; Moberly, 1998).

VI. Discusión

La actividad antitumoral propia del OTZ depende, por un lado, de su actividad antiproliferativa de las células del melanoma mediado por la disminución del contenido intracelular de GSH en dichas células; por otro lado, a través del aumento de dicho tripéptido en las PBMCs, lo que como hemos demostrado en los estudios *in vitro*, resulta ser un estímulo para su expansión clonal inicial. El incremento máximo (174%) de los niveles de GSH en las PBMCs se produce a las 2 horas del tratamiento con OTZ, tras el cual se produce un retorno paulatino a los niveles control.

Está demostrado que los agentes alquilantes utilizados en el tratamiento antitumoral reducen rápidamente los niveles de GSH de las células inmunes y, por ello, presenta gran dificultad el mantenimiento de los niveles óptimos de GSH/GSSG necesarios para la protección y funcionalidad de estas células. Por ello, resulta de gran importancia la protección contra la disminución del GSH inducidas por estos agentes antitumorales.

En nuestro estudio, hemos observado que el incremento de los niveles de GSH en los PBMCs producido por el OTZ, permite obtener dicho efecto citoprotector de estas células inmunes contra la acción mielosupresora de la CY. Así, la adición de OTZ al tratamiento con CY da lugar a una menor reducción de los niveles de GSH (20%) respecto al tratamiento con CY sola (50%). Gracias a este efecto, disminuye significativamente la leucopenia inducida por este agente alquilante. Sin embargo, el tratamiento con OTZ no previene la anemia producida por la CY, lo cual puede estar en relación con el hecho de que los eritrocitos no poseen la enzima 5-OPasa (Williamson, 1982), necesaria para el metabolismo del OTZ.

La citoprotección ejercida por el OTZ permitió llevar a cabo la administración de dosis de intensificación de CY. Así, fue posible administrar a los animales el doble de la dosis máxima tolerable por los mismos, esto es, la dosis letal de 500 mg/kg.

De este modo, la adición de OTZ a esta dosis letal de CY produjo un incremento muy significativo de la supervivencia (IS = 279%) con una toxicidad aceptable que permitió proteger al 80% de los animales de la toxicidad letal. Dicho tratamiento combinado aumentó, en consecuencia, de forma importante el beneficio terapéutico de la CY (IAT = 1.14).

En la actualidad, uno de los objetivos en el tratamiento antitumoral es la posibilidad de incrementar la dosis de los agentes quimio o radioterápicos –dosis de intensificación– que permita obtener un mayor control de la enfermedad neoplásica. Uno de los principales inconvenientes, observada en la mayoría de los ensayos clínicos, para conseguir dicha finalidad es la mielosupresión producida por dicha dosis de intensificación.

Con el fin de paliar los efectos secundarios, en la terapia antitumoral se han introducido diferentes sustancias como son los factores de crecimiento hematopoyético –el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófago (GM-CSF)– y la amifostina.

Los factores de crecimiento hematopoyético G-CSF y GM-CSF son glucoproteínas que regulan la proliferación y diferenciación de las células progenitoras y la función de las células sanguíneas, a través de la interacción con sus receptores localizados en la superficie de las membranas celulares de los granulocitos y macrófagos (Groopman, 1989; Nicola, 1997; Thomas, 2002).

Sin embargo, dichos factores no son agentes citoprotectores en sí mismos, no siendo eficaces en prevenir la disminución inicial del efecto citotóxico producido por la quimioterapia sobre los leucocitos. La acción de estos agentes se realiza a través de una amplificación de los progenitores mieloides, acelerando su proceso de maduración y liberación a la circulación sanguínea, acortando en consecuencia, la duración de la neutropenia (Bregni, 1996; Johnston, 1998; Janik, 2001).

Por el contrario, la amifostina [WR-2721; S-2(3-aminopropilamino) ácido etilfosforotioico] es un tiofosfato que está considerado como un citoprotector contra la toxicidad ejercida por diferentes agentes antineoplásicos sin pérdida del efecto antitumoral de los mismos, motivo por el cual está siendo utilizado en ensayos clínicos –en particular en combinación con agentes quimioterápicos como el cisplatino, la CY y la radioterapia– (Mohr, 1998; Murray, 2000; Merlin, 2002; Anne, 2002). Debido a este efecto citoprotector, la FDA ha aprobado la utilización de la amifostina en pacientes con cáncer de ovario frente a la nefrotoxicidad de cisplatino y para prevenir la xerostomía provocada por las radiaciones en la terapia del cáncer de cabeza y cuello (Brizel, 2003).

La amifostina, a través de una desfosforilación llevada a cabo por la enzima fosfatasa alcalina de la membrana celular, se transforma en su metabolito activo WR-1065, una molécula tiólica que mediante simple difusión penetra al interior celular (Koukourakis, 2002). El mecanismo citoprotector de la amifostina es complejo, incluyendo la detoxificación directa de los agentes alquilantes y la protección del ADN frente a los radicales libres. Se ha señalado que dicho agente protector ejerce su acción de forma selectiva en las células sanas (Kemp, 1996; Alberts, 1999), lo cual puede ser debido, entre otros mecanismos, a una disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina en las células tumorales, a la existencia de una hipovascularidad y acidificación del ambiente tumoral (Koukourakis, 2002), o también a una modulación de los niveles de GSH intracelular (Uma Devi, 1990; Bhanumathi, 1994; Belkacemi, 2001). Sin embargo, algunos autores señalan que el aumento de los niveles de GSH inducido por la amifostina y, en consecuencia, la protección frente a los agentes citotóxicos, se puede producir no sólo en las células sanas, sino también en las células tumorales (Smouluk, 1988; Issels, 1989).

Además, otros estudios recientemente publicados indican que la amifostina no previene la mielosupresión inducida por los agentes citotóxicos (Freyer, 2002), señalando además, la presencia de efectos secundarios producidos por este agente como náuseas, vómitos, hipotensión, hipocalcemia y reacciones alérgicas (Hospers, 1999; Gradishar, 2001; Vardy, 2002).

Todo este conjunto de resultados obtenidos con el tratamiento con OTZ, demostrando que esta procisteína es capaz de revertir el efecto protumoral de la IL-2 y sensibilizar a las células tumorales a la CY, protegiendo de forma simultánea a las células sanas, nos sugería que la modulación ejercida por el OTZ podría ser considerada una buena estrategia terapéutica para optimizar el tratamiento bioquimioterápico con CY e IL-2.

En primer lugar, observamos que la combinación *in vivo* de OTZ e IL-2 produjo un incremento significativo de la supervivencia (IS = 126%) respecto a los animales control, e igualmente superior al tratamiento con IL-2 sola (IS = 119%). Tal y como ha sido señalado anteriormente, la pauta de administración del OTZ en combinación con la IL-2 resulta determinante para que se produzca dicha respuesta antitumoral. Así, mientras el tratamiento diario de OTZ (días 3-8) en combinación con la IL-2 no produjo ningún efecto terapéutico, la administración discontinua de dicha procisteína (días 3, 6 y 8) en combinación con el tratamiento diario de IL-2, fue la pauta que demostró obtener un efecto terapéutico, sin producción de toxicidad, aumentando, de esta modo, el índice terapéutico (IAT = 1.26).

La diferencia establecida por la pauta terapéutica puede venir determinada por el hecho de que las células inmunes necesitan unos niveles óptimos de GSH/GSSG para poder realizar todas sus funciones, entre ellas, la acción antitumoral (Messina, 1989; Droge, 1994). Ensayos realizados por Kinscherf y cols. (1994) sugieren que el sistema inmune es extremadamente sensible, no sólo a la deficiencia de GSH o de cisteína, sino también al exceso de estos dos compuestos. De esta manera, la administración continua de OTZ podría modificar el nivel óptimo de GSH/GSSG requerido por los linfocitos para llevar a cabo su acción antitumoral.

En segundo lugar, múltiples referencias bibliográficas señalan que los pacientes con melanoma metastático tratados con la combinación de IL-2 y quimioterapia presentan un mayor número respuestas objetivas respecto a los tratados sólo con quimioterapia. Sin embargo, no existen estudios concluyentes que demuestren que dicha combinación produzca un aumento significativo de la supervivencia de los pacientes, incrementando, eso sí, considerablemente la toxicidad.

Igualmente, en nuestros estudios hemos observado que la combinación de IL-2 + CY no produce diferencias significativas en la supervivencia de los animales respecto a la administración aislada del agente alquilante, si bien, la adición de IL-2 al tratamiento con CY tampoco dio lugar a un aumento significativo en la toxicidad. Este resultado es comprensible si se tiene en cuenta que la IL-2 fue administrada a dosis bajas, concentración utilizada en base a la demostración por otros autores, de que incluso dosis bajas de IL-2 son capaces de potenciar la actividad antitumoral de las células T, reduciéndose de forma considerable la toxicidad de dicha interleucina (Lindemann, 1993; Meropol, 1996).

Sin embargo, y en concordancia con los resultados previos, la adición de OTZ + IL-2 al tratamiento quimioterápico con CY fue la combinación terapéutica que dio lugar al mayor efecto antitumoral. Efectivamente, la respuesta al tratamiento con CY se vio beneficiada del efecto cooperativo de la bioterapia combinada OTZ + IL-2, llegando a aumentar la supervivencia de los animales con cualquiera de las dosis de CY administradas (135%, 221% y 320% con las dosis de 50, 250 y 500 mg/kg). Además, resulta importante señalar que el 100% de los animales tratados con la dosis letal de 500 mg/kg obtuvieron un largo tiempo de supervivencia (>50 días), que en ningún caso fue obtenido con las dosis altas de CY sola ni con las combinaciones de CY + OTZ o CY + IL-2.

El incremento de la actividad antitumoral de la CY obtenido gracias a la administración de OTZ + IL-2 puede ser debido a dos razones principales. Por un lado, al efecto antitumoral que en sí mismo produce dicha combinación, tal y como ha sido señalado anteriormente. Por otro lado, resulta evidente el aumento en el efecto citoprotector producido por la combinación OTZ + IL-2 respecto a la ejercida por dichos agentes de forma aislada. De hecho, la administración conjunta de estos fármacos reduce significativamente la leucopenia y la pérdida de peso de los animales inducida por la CY, e incluso anula completamente la toxicidad letal cuando este agente es administrado con la dosis de 500 mg/kg.

Aún más, el tratamiento OTZ + IL-2 permitió que tras la administración de dichas dosis letales, los animales obtuvieran una rápida recuperación de la pérdida de peso hasta niveles previos al inicio del tratamiento, lo que indica una mejora en la calidad de vida de los mismos.

La valoración conjunta de esta reducción de la toxicidad y el elevado incremento de la supervivencia permite obtener un importante aumento en el beneficio terapéutico (IAT = 1.6) producido por la adición de OTZ a la bioquimioterapia con CY + IL-2 en el tratamiento del melanoma metastático B16F10 que, sin lugar a duda, es la principal finalidad de cualquier enfoque terapéutico antitumoral.

Los resultados obtenidos *in vitro* con la línea del melanoma humano A375 son semejantes a los del modelo de melanoma murino B16F10, lo cual resulta prometedor en el sentido que los datos obtenidos *in vivo* en el modelo murino podrían ser también extrapolables al modelo humano.

VII. CONCLUSIONES

1. La IL-2 produce un efecto protumoral en el melanoma. Este efecto es evidenciable por: a) el aumento de los niveles intracelulares de GSH y la proliferación de las células de melanoma murino B16F10 y del melanoma humano A375, y b) el estímulo de la expresión del IL-2R α y de la secreción endógena de IL-2 por las células A375, inducido por la administración exógena de IL-2.
2. El OTZ produce un efecto antimelanoma. Este efecto es evidenciable por: a) la disminución de los niveles de GSH y la reducción de la proliferación de las células B16F10 y A375, y b) la disminución de la expresión del IL-2R α y de la secreción endógena de IL-2 por las células A375 inducida por la administración exógena de IL-2, revirtiendo, de este modo, el efecto protumoral de esta citocina.
3. El OTZ aumenta los niveles de GSH y la proliferación de las células mononucleares de sangre periférica, y produce un efecto citoprotector de estas células frente a la acción citotóxica de la ciclofosfamida.
4. En ratones C57Bl6 con metástasis hepáticas del melanoma B16F10, la administración a dosis óptima y en pauta discontinua de OTZ, mejora el beneficio terapéutico de la IL-2 y de la CY, permitiendo además una intensificación de dosis de este agente alquilante por encima de la dosis máxima de tolerancia.
5. En dicho modelo tumoral, la adición de OTZ reduce la toxicidad producida por el tratamiento quimio-inmunoterápico con dosis letales de CY + IL-2 y permite casi duplicar la supervivencia obtenida por dicho tratamiento combinado administrado a dosis de tolerancia.
6. En consecuencia, el efecto antimelanoma y citoprotector de las PBMCs producido por el OTZ aumenta la eficacia y el índice terapéutico de la bioquimioterapia con CY + IL-2.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

A

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.

Adrover E. Tratamiento adyuvante del melanoma maligno cutáneo. *Rev. Cáncer* 2001; 15:70-3.

Agarwala SS, Kirkwood JM. Adjuvant interferon treatment for melanoma. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 1998; 12:823-33.

Agarwala SS, Kirkwood JM. Interferons in melanoma. *Curr. Opin. Oncol.* 1996; 8:167-74.

Agarwala SS, Kirkwood JM. Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. *Oncologist* 2000; 5:144-51.

Agarwala SS, Kirkwood JM. Update on the role of adjuvant interferon for high risk melanoma. *Forum (Genova)* 2000; 10:230-9.

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

Ahrens T, Assmann V, Fieber C, Termeer C, Herrlich P, Hofmann M, Simon JC. CD44 is the principal mediator of hyaluronic-acid-induced melanoma cell proliferation. *J. Invest. Dermatol.* 2001; 116:93-101.

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.

VIII. Bibliografía

Alaoui-Jamali M, Wang T, Chen DZ, Mayer LD, Batist G. Effect of tumor grafts on doxorubicin host toxicity cell. *Pharmacol.* 1995; 2:29-33.

Alberts DS. Protection by amifostine of cyclophosphamide induced myelosuppression. *Semin. Oncol.* 1999; 26:37-40.

Albini A, D'Agostini F, Giunciuglio D, Paglieri I, Balansky R, De Flora S. Inhibition of invasion, gelatinase activity tumor take and metastasis of malignant cells by N-acetylcysteine. *Int. J. Cancer* 1995; 61:121-9.

Alileche A, Plaisance S, Han DS, Rubinstein E, Mingari C, Bellomo R, Jasmin C, Azzarone B. Human melanoma cell line M14 secretes a functional interleukin 2. *Oncogene* 1993; 8:1791-6.

Anderson CM, Buzaid AC, Legha SS. Systemic treatments for advanced cutaneous melanoma. *Oncology (Huntingt)* 1995; 9:1149-58.

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

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

Anderson ME, Meister A. Transport and direct utilization of gamma-glutamylcysteine for glutathione synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983; 80:707-11.

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

Anne PR, Curran WJ Jr. A phase II trial of subcutaneous amifostine and radiation therapy in patients with head and neck cancer. *Semin. Radiat. Oncol.* 2002; 12:18-9.

Ardizzoni A, Tjan-Heijnen VC, Postmus PE, Buchholz E, Biesma B, Karnicka-Mlodkowska H, Dziadziuszko R, Burghouts J, Van Meerbeeck JP, Gans S, Legrand C, Debruyne C, Giaccone G, Manegold C. European Organization for Research and Treatment of Cancer-Lung Cancer Group. Standard versus intensified chemotherapy with granulocyte colony-stimulating factor support in small-cell lung cancer: a prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer-Lung Cancer Group Phase III Trial-08923. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20:3947-55.

Arlt A, Schafer H. NFkappaB-dependent chemoresistance in solid tumors. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2002; 40:336-47.

Atallah E, Flaherty L. Treatment of metastatic malignant melanoma. *Curr. Treat Options Oncol.* 2005; 6:185-93.

Atkins MB, Lee S, Flaherty LE, Sosman JA, Sondak VK, Kirkwood JM. A prospective randomized phase III trial of concurrent biochemotherapy (BCT) with cisplatin, vinblastine, dacarbazine (CVD), IL-2 and interferon alpha-2b (IFN) versus CVD alone in patients with metastatic melanoma (E3695): An ECOG-coordinated intergroup trial. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2003; 22:708 (abstr).

Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, Abrams J, Sznol M, Parkinson D, Hawkins M, Paradise C, Kunkel L, Rosenberg SA. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17:2105-16.

Atkins MB, O'Boyle KR, Sosman JA, Weiss GR, Margolin KA, Ernest ML, Kappler K, Mier JW, Sparano JA, Fisher RI. Multiinstitutional phase II trial of intensive combination chemoimmunotherapy for metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1994; 12:1553-60.

Atkins MB. Interleukin-2: clinical applications. *Semin. Oncol.* 2002; 29:12-7.

Atzpodien J, Neuber K, Kamanabrou D, Fluck M, Brocker EB, Neumann C, Runger TM, Schuler G, von den Driesch P, Muller I, Paul E, Patzelt T, Reitz M. Combination chemotherapy with or without s.c. IL-2 and IFN-alpha: results of a prospectively randomized trial of the Cooperative Advanced Malignant Melanoma Chemoimmunotherapy Group (ACIMM). *Br. J. Cancer* 2002; 86:179-84.

B

Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996; 87:13-20.

Bailey HH, Ripple G, Tutsch KD, Arzoomanian RZ, Alberti D, Feierabend C, Mahvi D, Schink J, Pomplun M, Mulcahy RT, Wilding G. Phase I study of continuous-infusion L-S,R-buthionine sulfoximine with intravenous melphalan. *J. Natl. Cancer Inst.* 1997; 89:1789-96.

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

Bajetta E, Del Vecchio M, Vitali M, Martinetti A, Ferrari L, Queirolo P, Sertoli MR, Cainelli T, Cellerino R, Cascinelli N. A feasibility study using polychemotherapy (cisplatin + vindesine + dacarbazine) plus interferon-alpha or monochemotherapy with dacarbazine plus interferon-alpha in metastatic melanoma. *Tumori* 2001; 87:219-22.

Bajetta E, Di Leo A, Zampino MG, Sertoli MR, Comella G, Barduagni M, Giannotti B, Queirolo P, Tribbia G, Bernengo MG. Multicenter randomized trial of dacarbazine alone or in combination with two different doses and schedules of interferon alfa-2a in the treatment of advanced melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1994; 12:806-11.

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2001; 19:3635-48.

Barditch-Crovo P, Noe D, Skowron G, Lederman M, Kalayjian RC, Borum P, Buier R, Rowe WB, Goldberg D, Lietman P. A phase I/II evaluation of oral L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid in asymptomatic patients infected with human immunodeficiency virus. *J. Clin. Pharmacol.* 1998; 38:357-63.

Baruchel S, Wang T, Farah R, Jamali M, Batist G. *In vivo* selective modulation of tissue glutathione in a rat mammary carcinoma model. *Biochem. Pharmacol.* 1995; 50:1505-8.

Bass KK, Mastrangelo MJ. Immunopotential with low-dose cyclophosphamide in the active specific immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 1998; 47:1-12.

Bauskin AR, Alkalay I, Ben-Neriah Y. Redox regulation of a protein tyrosine kinase in the endoplasmic reticulum. *Cell* 1991; 66:685-96.

Bayani N, Rugina M, Haddad-Vergnes L, Lelong F. High-titer acquired factor V inhibitor responsive to corticosteroids and cyclophosphamide in a patient with two malignant tumors. *Am. J. Hematol.* 2002; 71:33-6.

Beitner H. Epidemiología y etiología del melanoma maligno. *Rev. Cáncer* 2001; 15:45-50.

Belkacemi Y, Rat P, Piel G, Christen MO, Touboul E, Warnet JM. Lens epithelial cell protection by aminothiols WR-1065 and anetholedithiolethione from ionizing radiation. *Int. J. Cancer* 2001; 96:15-26

Benathan M. Glutathione efflux associated with a low gamma-glutamyl transpeptidase activity in human melanoma cells. *Br. J. Dermatol.* 1997; 137:721-7.

Berd D, Mastrangelo MJ. Active immunotherapy of human melanoma exploiting the immunopotentiating effects of cyclophosphamide. *Cancer Invest.* 1988; 6:337-49.

Berd D, Sato T, Cohn H, Maguire HC Jr, Mastrangelo MJ. Treatment of metastatic melanoma with autologous hapten-modified melanoma vaccine: regression of pulmonary metastases. *Int. J. Cancer* 2001; 94:531-9.

VIII. Bibliografía

Bernard GR, Wheeler AP, Arons MM, Morris PE, Paz HL, Russell JA, Wright PE. A trial of antioxidants N-acetylcysteine and procysteine in ARDS. The Antioxidant in ARDS Study Group. *Chest* 1997; 112:164-72.

Berry N, Nishizuka Y. Protein kinase C and T cell activation. *Eur. J. Biochem.* 1990; 189:205-14.

Bhanumathi P, Devi PU. Modulation of glutathione depletion and lipid peroxidation by WR-77913 an 2-mercaptopropionylglycine in cyclophosphamide chemotherapy. *Indian J. Exp. Biol.* 1994; 32:562-4.

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

Bleehen NM, Newlands ES, Lee SM, Thatcher N, Selby P, Calvert AH, Rustin GJ, Brampton M, Stevens MF. Cancer Research Campaign phase II trial of temozolomide in metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1995; 13:910-3.

Bosserhoff AK, Dreau D, Hein R, Landthaler M, Holder WD, Buettner R. Melanoma inhibitory activity (MIA), a serological marker of malignant melanoma. *Recent Results Cancer Res.* 2001; 158:158-68.

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.

Boyano MD, García de Galdeano A, Smith-Zubiaga I, Cañavate ML. IL-2 treatment of B16F10 melanoma cells stimulates metastatic colonization in the liver. *Anticancer Res.* 1997; 17:1135-41.

Boyum A. Isolation of leucocytes from human blood. A two-phase system for removal of red cells with methylcellulose as erythrocyte-aggregating agent. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 1968; 97:9-29.

Bregni M, Siena S, Di Nicola M, Dodero A, Peccatori F, Ravagnani F, Danesini G, Laffranchi A, Bonadonna G, Gianni AM. Comparative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor after high-dose cyclophosphamide cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* 1996; 14:628-35.

Briollais L, Chompret A, Guilloud-Bataille M, Bressac de Paillerets B, Avril MF, Demenais F. Patterns of familial aggregation of three melanoma risk factors: great number of naevi, light phototype and high degree of sun exposure. *Int. J. Epidemiol.* 2000; 29:408-15.

Brizel DM, Overgaard J. Does amifostine have a role in chemoradiation treatment?. *Lancet Oncol.* 2003; 4:378-81.

Buzaid AC, Ross MI, Balch CM, Soong S, McCarthy WH, Tinoco L, Mansfield P, Lee JE, Bedikian A, Eton O, Plager C, Papadopoulos N, Legha SS, Benjamin RS. Critical analysis of the current American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma and proposal of a new staging system. *J. Clin. Oncol.* 1997; 15:1039-51.

Buzaid AC. Biochemotherapy for advanced melanoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2002; 44:103-8.

Buzaid AC. Strategies for combining chemotherapy and biotherapy in melanoma. *Cancer Control* 2000; 7:185-97.

C

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.

VIII. Bibliografía

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.

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.

Chang WK, Yang KD, Shaio MF. Lymphocyte proliferation modulated by glutamine: involved in the endogenous redox reaction. *Clin. Exp. Immunol.* 1999; 117:482-8.

Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, Saxman S, Destro AN, Panageas KS, Begg CB, Agarwala SS, Schuchter LM, Ernstoff MS, Houghton AN, Kirkwood JM. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17:2745-51.

Chen Q, Daniel V, Maher DW, Hersey P. Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int. J. Cancer* 1994; 56:755-60.

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

Chen X, Carystinos GD, Batist G. Potential for selective modulation of glutathione in cancer chemotherapy. *Chem. Biol. Interact.* 1998; 111:263-75.

Chen X, Schechter RL, Griffith OW, Hayward MA, Alpert LC, Batist G. Characterization of 5-oxo-L-prolinase in normal and tumor tissues of humans and rats: a potential new target for biochemical modulation of glutathione. *Clin. Cancer Res.* 1998; 4:131-8.

Cheng LE, Ohlen C, Nelson BH, Greenberg PD. Enhanced signalling through the IL-2 receptor in CD8⁺ T cells regulated by antigen recognition results in preferential proliferation and expansion of responding CD8⁺ T cells rather than promotion of cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002; 99:3001-6

Chin L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nature Rev.* 2003; 3:559-70

Chowdhury S, Vaughan MM, Gore ME. New approaches to the systemic treatment of melanoma. *Cancer Treat. Rev.* 1999; 25:259-70.

Cocconi G, Bella M, Calabresi F, Tonato M, Canaletti R, Boni C, Buzzi F, Ceci G, Corgna E, Costa P. Treatment of metastatic malignant melanoma with dacarbazine plus tamoxifen. *N. Engl. J. Med.* 1992; 327:516-23.

Colozza M, Bisagni G, Mosconi AM, Gori S, Boni C, Sabbatini R, Frassoldati A, Passalacqua R, Bian AR, Rodino C, Rondini E, Algeri R, Di Sarra S, De Angelis V, Cocconi G, Tonato M. Epirubicin versus CMF as adjuvant therapy for stage I and II breast cancer: a prospective randomised study. *Eur. J. Cancer* 2002; 38:2279-88.

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

Conrad CT, Ernst NR, Dummer W, Brocker EB, Becker JC. Differential expression of transforming growth factor beta 1 and interleukin 10 in progressing and regressing areas of primary melanoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 1999; 18:225-32.

Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, Engelhard VH, Hunt DF, Slingluff CL Jr. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 1994; 264:716-9.

Creagan ET, Ahmann DL, Frytak S, Long HJ, Chang MN, Itri LM. Phase II trials of recombinant leukocyte A interferon in disseminated malignant melanoma: results in 96 patients. *Cancer Treat. Rep.* 1986; 70:619-24.

VIII. Bibliografía

Cudkowicz ME, Sexton PM, Ellis T, Hayden DL, Gwilt PR, Whalen J, Brown RH Jr. The pharmacokinetics and pharmaco-dynamics of procysteine in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1999; 52:1492-4.

Curriel-Lewandrowski C, Demierre MF. Advances in specific immunotherapy of malignant melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2000; 43:167-85.

Curti BD, Ochoa AC, Powers GC, Kopp WC, Alvord WG, Janik JE, Gause BL, Dunn B, Kopreski MS, Fenton R, Zea A, Dansky-Ullmann C, Strobl S, Harvey L, Nelson E, Sznol M, Longo DL. Phase I trial of anti-CD3-stimulated CD4⁺ T cells, infusional interleukin-2 and cyclophosphamide in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* 1998; 16:2752-60.

D

Danen EH, de Vries TJ, Morandini R, Ghanem GG, Ruiter DJ, van Muijen GN. E-cadherin expression in human melanoma. *Melanoma Res.* 1996; 6:127-31.

Danen EH, van Muijen GN, van de Wiel-van Kemenade E, Jansen KF, Ruiter DJ, Figdor CG. Regulation of integrin-mediated adhesion to laminin and collagen in human melanocytes and in non-metastatic and highly metastatic human melanoma cells. *Int. J. Cancer* 1993; 54:315-21.

De Fabo EC, Noonan FP, Fears T, Merlino G. Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma. *Cancer Res.* 2004; 64:6372-6.

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.

de Galdeano AG, Boyano MD, Cañavate ML. Effect induced by interleukin-1 on the behaviour of B16F10 melanoma cells. *Oncol. Rep.* 1999; 6:225-8.

de Gast GC, Batchelor D, Kersten MJ, Vyth-Dreese FA, Sein J, van de Kastele WF, Nooijen WJ, Nieweg OE, de Waal MA, Boogerd W. Temozolomide followed by combined immunotherapy with GM-CSF, low-dose IL2 and IFN alpha in patients with metastatic melanoma. *Br. J. Cancer*. 2003; 88:175-80.

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.

Del Vecchio M, Bajetta E, Vitali M, Gattinoni L, Santinami M, Daponte A, Sertoli MR, Queirolo P, Bernengo MG, Cascinelli N. Multicenter phase III randomized trial of cisplatin, vindesine and dacarbazine (CVD) versus CVD plus subcutaneous (sc) interleukin-2 (IL-2) and interferon-alpha-2b (IFN) in metastatic melanoma patients. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol*. 2003; 22:709 (abstr).

DeLeve LD. Cellular target of cyclophosphamide toxicity in the murine liver: role of glutathione and site of metabolic activation. *Hepatology* 1996; 24:830-7.

Demchak PA, Mier JW, Robert NJ, O'Brien K, Gould JA, Atkins MB. Interleukin-2 and high-dose cisplatin in patients with metastatic melanoma: a pilot study. *J. Clin. Oncol*. 1991; 9:1821-30.

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.

DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 1997; 388:548-54.

VIII. Bibliografía

Dillman RO, Oldham RK, Barth NM, Cohen RJ, Minor DR, Birch R, Yannelli JR, Maleckar JR, Sferruzza A, Arnold J. Continuous interleukin-2 and tumor-infiltrating lymphocytes as treatment of advanced melanoma. A national biotherapy study group trial. *Cancer* 1991; 68:1-8.

Dominici S, Visvikis A, Pieri L, Paolicchi A, Valentini MA, Comporti M, Pompella A. Redox modulation of NF-kappaB nuclear translocation and DNA binding in metastatic melanoma. The role of endogenous and gamma-glutamyl transferase-dependent oxidative stress. *Tumori* 2003; 89:426-33.

Dorval T, Negrier S, Chevreau C, Avril MF, Baume D, Cupissol D, Oskam R, de Peuter R, Vinke J, Herrera A, Escudier B. Randomized trial of treatment with cisplatin and interleukin-2 either alone or in combination with interferon-alpha-2a in patients with metastatic melanoma: a Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer Multicenter, parallel study. *Cancer* 1999; 85:1060-6.

Dorval T, Palangie T, Jouve M, García-Giralt E, Israel L, Falcoff E, Schwab D, Pouillart P. Clinical phase II trial of recombinant DNA interferon (interferon alpha 2b) in patients with metastatic malignant melanoma. *Cancer* 1986; 58:215-8.

Doucet C, Meazza R, Pottin-Clemenceau C, Scudeletti M, Brouty-Boye D, Ferrini S, Alileche A, Taoufik Y, Jasmin C, Azzarone B, Indiveri F. Role of interleukin IL-2 and IL-15 in the tumour progression of a melanoma cell line MELP derived from an IL-2 progressor patient. *Melanoma Res.* 1997; 7:7-17.

Dray S, Mokyr MB. Cyclophosphamide and melphalan as immunopotentiating agents in cancer therapy. *Med. Oncol. Tumor Pharmacother.* 1989; 6:77-85.

Droge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S, Galter D, Schenk H, Eck HP, Roth S, Gmunder H. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J.* 1994; 8:1131-8.

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

Dutcher JP, Creekmore S, Weiss GR, Margolin K, Markowitz AB, Roper M, Parkinson D, Ciobanu N, Fisher RI, Boldt DH. A phase II study of interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells in patients with metastatic malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1989; 7:477-85.

Dutcher JP, Gaynor ER, Boldt DH, Doroshow JH, Bar MH, Sznol M, Mier J, Sparano J, Fisher RI, Weiss G. A phase II study of high-dose continuous infusion interleukin-2 with lymphokine-activated killer cells in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1991; 9:641-8.

E

Eklund JW, Kuzel TM. A review of recent findings involving interleukin-2-based cancer therapy. *Curr. Opin. Oncol.* 2004; 16:542-6.

el Kassas H, Kirkwood JM. Adjuvant application of interferons. *Semin. Oncol.* 1996; 23:737-43.

Eliceiri BP, Cheresh DA. Role of alpha v integrins during angiogenesis. *Cancer J.* 2000; 6:245-9.

Ellis DL, King LE Jr, Nanney LB. Increased epidermal growth factor receptors in melanocytic lesions. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1992; 27:539-46.

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.

Eton O, Buzaid AC, Bedikian AY, Smith TM, Papadopoulos NE, Ellerhorst JA, Hibberts JL, Legha SS, Benjamin RS. A phase II study of decrescendo interleukin-2 plus interferon-alpha-2a in patients with progressive metastatic melanoma after chemotherapy. *Cancer* 2000; 88:1703-9.

VIII. Bibliografía

Eton O, Legha SS, Bedikian AY, Lee JJ, Buzaid AC, Hodges C, Ring SE, Papadopoulos NE, Plager C, East MJ, Zhan F, Benjamin RS. Sequential biochemotherapy versus chemotherapy for metastatic melanoma: results from a phase III randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20:2045-52.

F

Falkson CI, Falkson G, Falkson HC. Improved results with the addition of interferon alfa-2b to dacarbazine in the treatment of patients with metastatic malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1991; 9:1403-8.

Falkson CI, Ibrahim J, Kirkwood JM, Coates AS, Atkins MB, Blum RH. Phase III trial of dacarbazine versus dacarbazine with interferon alpha-2b versus dacarbazine with tamoxifen versus dacarbazine with interferon alpha-2b and tamoxifen in patients with metastatic malignant melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* 1998; 16:1743-51.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, versión 1.0. IARC Cancer Base n° 5. Lyon: IARC Press, 2001.

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

Fidler IJ. Selection of successive tumor lines for metastasis. *Nat. New. Biol.* 1973; 242:148-9.

Fidler IJ. The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation* 2002; 70:498-505.

Flaherty LE, Atkins M, Sosman J, Weiss G, Clark JI, Margolin K, Dutcher J, Gordon MS, Lotze M, Mier J, Sorokin P, Fisher RI, Appel C, Du W. Outpatient biochemotherapy with interleukin-2 and interferon alfa-2b in patients with metastatic malignant melanoma: results of two phase II cytokine working group trials. *J. Clin. Oncol.* 2001; 19:3194-202.

Flaherty LE, Redman BG, Chabot GG, Martino S, Gualdoni SM, Heilbrun LK, Valdivieso M, Bradley EC. A phase I-II study of dacarbazine in combination with outpatient interleukin-2 in metastatic malignant melanoma. *Cancer* 1990; 65:2471-7.

Flaherty LE, Robinson W, Redman BG, González R, Martino S, Kraut M, Valdivieso M, Rudolph AR. A phase II study of dacarbazine and cisplatin in combination with outpatient administered interleukin-2 in metastatic malignant melanoma. *Cancer* 1993; 71:3520-5.

Flanagan RJ, Meredith JJ. Use of N-acetylcysteine in clinical toxicology. *Am. J. Med.* 1991; 91:131-9.

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.

Franco E. Chemotherapy of disseminated melanoma with bleomycin, vincristine, CCNU and DTIC (BOLD regimen). *Cancer* 1989; 63:1676-80.

Franzke A, Probst-Kepper M, Buer J, Duensing S, Hoffmann R, Wittke F, Volkenandt M, Ganser A, Atzpodien J. Elevated pretreatment serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule 1 and lactate dehydrogenase as predictors of survival in cutaneous metastatic malignant melanoma. *Br. J. Cancer* 1998; 78:40-5.

Freyer G, Hennebert P, Awada A, Gil T, Kerger J, Selleslags J, Brassinne C, Piccart M, de Valeriola D. Influence of amifostine on the toxicity and pharmacokinetics of docetaxel in metastatic breast cancer patients: a pilot study. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8:95-102.

Friedman HS, Colvin OM, Aisaka K, Popp J, Bossen EH, Reimer KA, Powell JB, Hilton J, Gross SS, Levi R. Glutathione protects cardiac and skeletal muscle from cyclophosphamide induced toxicity. *Cancer Res.* 1990; 50:2455-62.

VIII. Bibliografía

Friedman HS, Mahaley MS Jr, Schold SC Jr, Vick NA, Falletta JM, Bullard DE, D'Souza BJ, Khandekar JD, Lew S, Oakes WJ. Efficacy of vincristine and cyclophosphamide in the therapy of recurrent medulloblastoma. *Neurosurgery* 1986; 18:335-40.

Fukagawa NK, Hercules E, Ajami AM. L-2-[¹³C]oxothiazolidine-4-carboxylic acid: a probe for precursor mobilization for glutathione synthesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000; 278:171-6.

G

Gajewski TF. Temozolomide for melanoma: new toxicities and new opportunities. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22:1-2.

García de Galdeano A, Boyano MD, Smith-Zubiaga I, Cañavate ML. B16F10 murine melanoma cells express interleukin-2 and a functional interleukin-2 receptor. *Tumour Biol.* 1996; 17:155-67.

García-Vázquez MD, Boyano MD, Cañavate ML, Gardeazabal J, de Galdeano AG, López-Michelena T, Ratón JA, Izu R, Díaz-Ramón JL, Díaz-Pérez JL. Interleukin-2 enhances the growth of human melanoma cells derived from primary but not from metastatic tumours. *Eur. Cytokine. Netw.* 2000; 11:654-61.

Genot EM, Parker PJ, Cantrell DA. Analysis of the role of protein kinase C alpha, epsilon and zeta in T cell activation. *J. Biol. Chem.* 1995; 270:9833-9.

Gershtein ES, Medvedeva SV, Babkina IV, Kushlinskii NE, Trapeznikov NN. Tissue and urokinase-type plasminogen activators and type 1 plasminogen activator inhibitor in melanomas and benign skin pigment neoplasms. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2001; 132:670-4.

Gershwin ME, Goetzl EJ, Steinberg AD. Cyclophosphamide: use in practice. *Ann. Intern. Med.* 1974; 80:531-40.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 1973; 51:1417-23.

Guilbaud N, Kraus-Berthier L, Saint-Dizier D, Rouillon MH, Burbridge M, Visalli M, Bisagni E, Pierre A, Atassi G. *In vivo* antitumor activity of S 16020-2, a new olivacine derivate. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1996; 38:513-21.

Goedegebuure PS, Douville LM, Li H, Richmond GC, Schoof DD, Scavone M, Eberlein TJ. Adoptive immunotherapy with tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in patients with metastatic malignant melanoma and renal cell carcinoma: a pilot study. *J. Clin. Oncol.* 1995; 13:1939-49.

Goldstein AM, Falk RT, Fraser MC, Dracopoli NC, Sikorski RS, Clark WH Jr, Tucker MA. Sun-related risk factors in melanoma-prone families with CDKN2A mutations. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998; 90:709-11.

Gómez J, González A, Martínez-AC, Rebollo A. IL-2-induced cellular events. *Crit. Rev. Immunol.* 1998; 18:185-220.

Gómez J, Pitton C, García A, Martínez de Aragón A, Silva A, Rebollo A. The zeta isoform of protein kinase C controls interleukin-2-mediated proliferation in a murine T cell line: evidence for an additional role of protein kinase C epsilon and beta. *Exp. Cell Res.* 1995; 218:105-13.

Gómez J, García-Domingo D, Martínez-AC, Rebollo A. Role of NF-kappaB in the control of apoptotic and proliferative responses in IL-2-responsive T cells. *Front. Biosci.* 1997; 2:49-60.

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

Gosland M, Lum B, Schimmelpfennig J, Baker J, Doukas M. Insights into mechanisms of cisplatin resistance and potential for its clinical reversal. *Pharmacotherapy* 1996; 16:16-39.

VIII. Bibliografía

Gradishar WJ, Stephenson P, Glover DJ, Neuberger DS, Moore MR, Windschitl HE, Piel I, Abeloff MD. A Phase II trial of cisplatin plus WR-2721 (amifostine) for metastatic breast carcinoma: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E8188). *Cancer* 2001; 92:2517-22.

Graeven U, Rodeck U, Karpinski S, Jost M, Philippou S, Schmiegel W. Modulation of angiogenesis and tumorigenicity of human melanocytic cells by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Cancer Res.* 2001; 61:7282-90.

Grandjean EM, Berthet P, Ruffmann R, Leuenberger P. Efficacy of oral long-term N-acetylcysteine in chronic bronchopulmonary disease: a meta-analysis of published double-blind, placebo-controlled clinical trials. *Clin. Ther.* 2000; 22:209-21.

Grant AJ, Roessler E, Ju G, Tsudo M, Sugamura K, Waldmann TA. The interleukin 2 receptor (IL-2R): the IL-2R alpha subunit alters the function of the IL-2R beta subunit to enhance IL-2 binding and signaling by mechanisms that do not require binding of IL-2 to IL-2R alpha subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992; 89:2165-9.

Gray CP, Franco AV, Arosio P, Hersey P. Immunosuppressive effects of melanoma derived heavy chain ferritin are dependent on stimulation of IL-10 production. *Int. J. Cancer* 2001; 92:843-50.

Gray RJ, Pockaj BA, Kirkwood JM. An update on adjuvant interferon for melanoma. *Cancer Control* 2002; 9:16-21.

Green RJ, Schuchter LM. Systemic treatment of metastatic melanoma with chemotherapy. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 1998; 12:863-75.

Groopman JE, Molina JM, Scadden DT. Hematopoietic growth factors. Biology and clinical applications. *N. Engl. J. Med.* 1989; 321:1449-59.

Gross CL, Giles KC, Smith WJ. L-oxothiazolidine 4-carboxylate pretreatment of isolated human peripheral blood lymphocytes reduces sulfur mustard cytotoxicity. *Cell Biol. Toxicol.* 1997; 13:167-73.

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.

Gunthert U, Schwarzler C, Wittig B, Laman J, Ruiz P, Stauder R, Bloem A, Smadja-Joffe F, Zoller M, Rolink A. Functional involvement of CD44, a family of cell adhesion molecules, in immune responses, tumour progression and haematopoiesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998; 451:43-9.

H

Haghnegahdar H, Du J, Wang D, Strieter RM, Burdick MD, Nanney LB, Cardwell N, Luan J, Shattuck-Brandt R, Richmond A. The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma. *J. Leukoc. Biol.* 2000; 67:53-62.

Hahka-Kemppinen M, Muhonen T, Virolainen M, Jekunen A, Asko-Seljavaara S, Pyrhonen S. Response of subcutaneous and cutaneous metastases of malignant melanoma to combined cytostatic plus interferon therapy. *Br. J. Dermatol.* 1995; 132:973-7.

Hall HI, Jamison P, Fulton JP, Clutter G, Roffers S, Parrish P. Reporting cutaneous melanoma to cancer registries in the United States. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2003; 49:624-30.

Harper P. Current clinical practices for ovarian cancers. *Semin. Oncol.* 2002; 29:3-6.

Hersey P, Hasic E, MacDonald M, Edwards A, Spurling A, Coates AS, Milton GW, McCarthy WH. Effects of recombinant leukocyte interferon (rIFN-alpha A) on tumour growth and immune responses in patients with metastatic melanoma. *Br. J. Cancer* 1985; 51:815-26.

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.

VIII. Bibliografía

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

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 1976; 74:214-26.

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.

Hopkins, FG. On an autoxidisable constituent of the cell. *Biochem. J.* 1921; 15:286-305.

Hospers GA, Eisenhauer EA, de Vries EG. The sulfhydryl containing compounds WR-2721 and glutathione as radio and chemoprotective agents. A review, indications for use and prospects. *Br. J. Cancer* 1999; 80:629-38.

Huang S, De Guzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis and metastasis of human melanoma cells in nude mice. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6:2573-81.

Huang TS, Rauth S, Das Gupta TK. Overexpression of EGF receptor is associated with spontaneous metastases of a human melanoma cell line in nude mice. *Anticancer Res.* 1996; 16:3557-63.

Huncharek M, Caubet JF, McGarry R. Single-agent DTIC versus combination chemotherapy with or without immunotherapy in metastatic melanoma: a meta-analysis of 3273 patients from 20 randomized trials. *Melanoma Res.* 2001; 11:75-81.

Hutter DE, Greene JJ. Influence of the cellular redox state on NF-kappaB regulated gene expression. *J. Cell Physiol.* 2000; 183:45-52.

Hutter DE, Till BG, Greene JJ. Redox state changes in density-dependent regulation of proliferation. *Exp. Cell Res.* 1997; 232:435-8.

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.

Iimuro Y, Bradford BU, Yamashina S, Rusyn I, Nakagami M, Enomoto N, Kono H, Frey W, Forman D, Brenner D, Thurman RG. The glutathione precursor L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid protects against liver injury due to chronic enteral ethanol exposure in the rat. *Hepatology* 2000; 31:391-8.

International Academy of Patology News, 2002. Volume 43, N° 1.
<http://www.iaphomepage.org/int102/no102pg2.html>

International Association of Cancer Registries, IACR. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Globocan 2002.
<http://www-depdb.iarc.fr/globocan/GLOBOframe.htm>

Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc. Roy. Soc. (London)* 1957; 147:258-67.

Isakov N, Altman A. Protein kinase C theta in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20:761-94.

Issels RD, Nagele A. Promotion of cystine uptake increase of glutathione biosynthesis and modulation of glutathione status by S-2-(3-aminopropylamino)ethyl phosphorothioic acid (WR-2721) in Chinese hamster cells. *Cancer Res.* 1989; 49:2082-6.

J

Janik JE, Miller LL, Korn EL, Stevens D, Curti BD, Smith JW II, Sznol M, Conlon KC, Sharfman W, Urba WJ, Gause BL, Longo DL. A prospective randomized phase II trial of GM-CSF priming to prevent topotecan induced-neutropenia in chemotherapy-naive patients with malignant melanoma or renal cell carcinoma. *Blood* 2001; 97:1942-6.

Janji B, Melchior C, Gouon V, Vallar L, Kieffer N. Autocrine TGF-beta-regulated expression of adhesion receptors and integrin-linked kinase in HT-144 melanoma cells correlates with their metastatic phenotype. *Int. J. Cancer* 1999; 83:255-62.

Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappa B. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28:1317-27.

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.

Johnson JP, Rummel MM, Rothbacher U, Sers C. MUC18: A cell adhesion molecule with a potential role in tumor growth and tumor cell dissemination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996; 213:95-105.

Johnson JP. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 1999; 18:345-57.

Johnson TM, Smith JW, Nelson BR, Chang A. Current therapy for cutaneous melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1995; 32:689-707.

Johnston EM, Crawford J. Hematopoietic growth factors in the reduction of chemotherapeutic toxicity. *Semin. Oncol.* 1998; 25:552-61.

Jonasch E, Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications and toxicities. *Oncologist* 2001; 6:34-55.

Jungnelius U, Ringborg U, Aamdal S, Mattsson J, Stierner U, Ingvar C, Malmstrom P, Andersson R, Karlsson M, Willman K, Wist E, Bjelkengren G, Westberg R. Dacarbazine-vindesine versus dacarbazine-vindesine-cisplatin in disseminated malignant melanoma. A randomised phase III trial. *Eur. J. Cancer* 1998; 34:1368-74.

K

Kalayjian RC, Skowron G, Emgushov RT, Chance M, Spell SA, Borum PR, Webb LS, Mayer KH, Jackson JB, Yen-Lieberman B, Story KO, Rowe WB, Thompson K, Goldberg D, Trimbo S, Lederman MM. A phase I/II trial of intravenous L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid (procysteine) in asymptomatic HIV-infected subjects. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1994; 7:369-74.

Kalebic T, Kinter A, Poli G, Anderson ME, Meister A, Fauci AS. Suppression of human immunodeficiency virus expression in chronically infected monocytic cells by glutathione, glutathione ester and N-acetylcysteine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991; 88:986-90.

Kamencic H, Lyon A, Paterson PG, Juurlink BH. Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Anal. Biochem.* 2000; 286:35-7.

Kammula US, White DE, Rosenberg SA. Trends in the safety of high dose bolus interleukin-2 administration in patients with metastatic cancer. *Cancer* 1998; 83:797-805.

VIII. Bibliografía

Kang YJ. Buthionine sulfoximine spares intracellular glutamate: a possible mechanism for cell growth stimulation. *Cell Mol. Biol. Res.* 1993; 39:675-84.

Kaplan EL, Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 1958; 53:457-81.

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.

Kehrer JP, Biswal SS. The molecular effects of acrolein. *Toxicol. Sci.* 2000; 57:6-15.

Keilholz U, Conradt C, Legha SS, Khayat D, Scheibenbogen C, Thatcher N, Goey SH, Gore M, Dorval T, Hancock B, Punt CJ, Dummer R, Avril MF, Brocker EB, Benhammouda A, Eggermont AM, Pritsch M. Results of interleukin-2 based treatment in advanced melanoma: a case record-based analysis of 631 patients. *J. Clin. Oncol.* 1998; 16:2921-9.

Keilholz U, Eggermont AM. The role of interleukin-2 in the management of stage IV melanoma: the EORTC melanoma cooperative group program. *Cancer J. Sci. Am.* 2000; 6:99-103.

Keilholz U, Goey SH, Punt CJ, Proebstle TM, Salzmann R, Scheibenbogen C, Schadendorf D, Lienard D, Enk A, Dummer R, Hantich B, Geueke AM, Eggermont AM. Interferon alfa-2a and interleukin-2 with or without cisplatin in metastatic melanoma: a randomized trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Melanoma Cooperative Group. *J. Clin. Oncol.* 1997; 15:2579-88.

Kemp G, Rose P, Lurain J, Berman M, Manetta A, Rouillet B, Homesley H, Belpomme D, Glick J. Amifostine pretreatment for protection against cyclophosphamide induced and cisplatin induced toxicities: results of a randomized control trial in patients with advanced ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* 1996; 14:2101-12.

Keshavarzian A, Fields JZ. A radical perspective on ulcerative colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1995; 10:208-9.

Khuri FR, Lippman SM. Lung cancer chemoprevention. *Semin. Surg. Oncol.* 2000; 18:100-5.

Kilbridge KL, Weeks JC, Sober AJ, Haluska FG, Slingluff CL, Atkins MB, Sock DE, Kirkwood JM, Nease RF. Patient preferences for adjuvant interferon alfa-2b treatment. *J. Clin. Oncol.* 2001; 19:812-23.

Kim CJ, Taubenberger JK, Simonis TB, White DE, Rosenberg SA, Marincola FM. Combination therapy with interferon-gamma and interleukin-2 for the treatment of metastatic melanoma. *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.* 1996; 19:50-8.

Kinscherf R, Fischbach T, Mihm S, Roth S, Hohenhaus-Sievert E, Weiss C, Edler L, Bartsch P, Droge W. Effect of glutathione depletion and oral N-acetyl-cysteine treatment on CD4⁺ and CD8⁺ cells. *FASEB J.* 1994; 8:448-51.

Kirkwood JM, Ernstoff MS, Davis CA, Reiss M, Ferraresi R, Rudnick SA. Comparison of intramuscular and intravenous recombinant alpha-2 interferon in melanoma and other cancers. *Ann. Intern. Med.* 1985; 103:32-6.

Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sondak VK, Ernstoff MS, Ross M. Interferon alfa-2a for melanoma metastases. *Lancet* 2002; 359:978-9.

Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sondak VK, Richards J, Flaherty LE, Ernstoff MS, Smith TJ, Rao U, Steele M, Blum RH. High and low dose interferon alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190. *J. Clin. Oncol.* 2000; 18:2444-58.

Klein CE, Dressel D, Steinmayer T, Mauch C, Eckes B, Krieg T, Bankert RB, Weber L. Integrin alpha 2 beta 1 is upregulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen I fibrils. *J. Cell Biol.* 1991; 115:1427-36.

VIII. Bibliografía

Klimek VM, Wolchok JD, Chapman PB, Houghton AN, Hwu WJ. Systemic chemotherapy. *Clin. Plast. Surg.* 2000; 27:451-61.

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.

Koukourakis MI. Amifostine in clinical oncology: current use and future applications. *Anticancer Drugs* 2002; 13:181-209.

Kramer RH, Vu MP, Cheng YF, Ramos DM, Timpl R, Waleh N. Laminin-binding integrin alpha 7 beta 1: functional characterization and expression in normal and malignant melanocytes. *Cell Regul.* 1991; 2:805-17.

Krasagakis K, Tholke D, Farthmann B, Eberle J, Mansmann U, Orfanos CE. Elevated plasma levels of transforming growth factor TGF-beta1 and TGF-beta2 in patients with disseminated malignant melanoma. *Br. J. Cancer* 1998; 77:1492-4.

Kruger-Krasagakes S, Krasagakis K, Garbe C, Schmitt E, Huls C, Blankenstein T, Diamantstein T. Expression of interleukin 10 in human melanoma. *Br. J. Cancer* 1994; 70:1182-5.

Kruit WH, Goey SH, Monson JR, Stahel RA, Calabresi F, Mertelsmann R, Holdener EE, Eggermont AM, Bolhuis RL, de Mulder PH. Clinical experience with the combined use of recombinant interleukin-2 (IL-2) and interferon alfa-2a (IFN alpha) in metastatic melanoma. *Br. J. Haematol.* 1991; 79:84-6.

Kumar A, Haque J, Lacoste J, Hiscott J, Williams BR. Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994; 91:6288-92.

L

Lahn M, Paterson BM, Sundell K, Ma D. Papel de la proteincinasa C-alfa (PKC- α) en las enfermedades malignas del tracto gastrointestinal. *Eur. J. Cancer* 2004; 40:10-20.

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.

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. Radiation Oncology Biol. Phys.* 1989; 16:1315-19.

Legha SS. The role of interferon alfa in the treatment of metastatic melanoma. *Semin. oncol.* 1997; 24:24-31.

Legha SS, Gianan MA, Plager C, Eton OE, Papadopoulos NE. Evaluation of interleukin-2 administered by continuous infusion in patients with metastatic melanoma. *Cancer* 1996; 77:89-96.

Legha SS, Papadopoulos NE, Plager C, Ring S, Chawla SP, Evans LM, Benjamin RS. Clinical evaluation of recombinant interferon alfa-2a (Roferon-A) in metastatic melanoma using two different schedules. *J. Clin. Oncol.* 1987; 5:1240-6.

Legha SS, Ring S, Bedikian A, Plager C, Eton O, Buzaid AC, Papadopoulos N. Treatment of metastatic melanoma with combined chemotherapy containing cisplatin, vinblastine and dacarbazine (CVD) and biotherapy using interleukin-2 and interferon-alpha. *Ann. Oncol.* 1996; 7:827-35.

VIII. Bibliografía

Legha SS, Ring S, Eton O, Bedikian A, Buzaid AC, Plager C, Papadopoulos N. Development of a biochemotherapy regimen with concurrent administration of cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interferon alfa and interleukin-2 for patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1998; 16:1752-9.

Legha SS, Ring S, Eton O, Bedikian A, Plager C, Papadopoulos N. Development and results of biochemotherapy in metastatic melanoma: the University of Texas M.D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer J. Sci. Am.* 1997; 3:9-15.

Legha SS, Ring S, Papadopoulos N, Plager C, Chawla S, Benjamin R. A prospective evaluation of a triple-drug regimen containing cisplatin, vinblastine and dacarbazine (CVD) for metastatic melanoma. *Cancer* 1989; 64:2024-9.

Leung SW, Mitchell JB, al-Nabulsi I, Friedman N, Newsome J, Belldegrun A, Kasid U. Effect of L-buthionine sulfoximine on the radiation response of human renal carcinoma cell lines. *Cancer* 1993; 71:2276-85.

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.

Li S, Sedivy JM. Raf-1 protein kinase activates the NF-kappaB transcription factor by dissociating the cytoplasmic NF-kappaB - I kappaB complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993; 90:9247-51.

Liang CM, Lee N, Cattell D, Liang SM. Glutathione regulates interleukin-2 activity on cytotoxic T-cells. *J. Biol. Chem.* 1989; 264:13519-23.

Liang SM, Liang CM, Hargrove ME, Ting CC. Regulation by glutathione of the effect of lymphokines on differentiation of primary activated lymphocytes. Influence of glutathione on cytotoxic activity of CD3-AK-. *J. Immunol.* 1991; 146:1909-13.

Lindemann A, Brossart P, Hoffken K, Flasshove M, Voliotis D, Diehl V, Hecker G, Wagner H, Mertelsmann R. Immunomodulatory effects of ultra-low-dose interleukin-2 in cancer patients: a phase-IB study. *Cancer Immunol. Immunother.* 1993; 37:307-15.

Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001; 411:375-9.

Liu KD, Greene WC, Goldsmith MA. The alpha chain of the IL-2 receptor determines the species specificity of high-affinity IL-2 binding. *Cytokine* 1996; 8:613-21.

Liu TZ, Hu CCA, Chen YH, Stern A, Cheng JT. Differentiation status modulates transcription factor NF- κ B activity in unstimulated human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Lett.* 2000; 151:49-56

Livingston PO, Cunningham-Rundles S, Marfleet G, Gnecco C, Wong GY, Schiffman G, Enker WE, Hoffman MK. Inhibition of suppressor cell activity by cyclophosphamide in patients with malignant melanoma. *J. Biol. Response Mod.* 1987; 6:392-403.

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.

Loir B, Bouchard B, Morandini R, del Marmol V, Deraemaeker R, García-Borrón JC, Ghanem G. Immunoreactive alpha-melanotropin as an autocrine effector in human melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* 1997; 244:923-30.

Lomaestro BM, Malone M. Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. *Ann. Pharmacother.* 1995; 29:1263-73.

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.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RS. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193:265-75.

VIII. Bibliografía

Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* 1999; 13:1169-83.

Luan J, Shattuck-Brandt R, Haghnegahdar H, Owen JD, Strieter R, Burdick M, Nirodi C, Beauchamp D, Johnson KN, Richmond A. Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *J. Leukoc. Biol.* 1997; 62:588-97.

Luikart SD, Kennealey GT, Kirkwood JM. Randomized phase III trial of vinblastine, bleomycin and cis-dichlorodiammine-platinum versus dacarbazine in malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1984; 2:164-8.

M

Malek TR, Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4:665-74.

Manola J, Atkins M, Ibrahim J, Kirkwood J. Prognostic factors in metastatic melanoma: a pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. *J. Clin. Oncol.* 2000; 18:3782-93.

Manten-Horst E, Danen EH, Smit L, Snoek M, Le Poole IC, Van Muijen GN, Pals ST, Ruiter DJ. Expression of CD44 splice variants in human cutaneous melanoma and melanoma cell lines is related to tumor progression and metastatic potential. *Int. J. Cancer* 1995; 64:182-8.

Mapelli E, Banfi P, Sala E, Sensi M, Supino R, Zunino F, Gambetta RA. Effect of protein kinase C inhibitors on invasiveness of human melanoma clones expressing different levels of protein kinase C isoenzymes. *Int. J. Cancer* 1994; 57:281-6.

Margolin K, Atkins M, Sparano J, Sosman J, Weiss G, Lotze M, Doroshow J, Mier J, O'Boyle K, Fisher R, Campbell E, Rubin J, Federighi D, Bursten S. Prospective randomized trial of lisofylline for the prevention of toxicities of high-dose interleukin 2 therapy in advanced renal cancer and malignant melanoma. *Clin. Cancer Res.* 1997; 3:565-72.

Marincola FM, White DE, Wise AP, Rosenberg SA. Combination therapy with interferon alfa-2a and interleukin-2 for the treatment of metastatic cancer. *J. Clin. Oncol.* 1995; 13:1110-22.

Marsh D, Zori R. Genetic insights into familial cancers update and recent discoveries. *Cancer Lett.* 2002; 181:125-64.

Martínez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* 1995; 77:147-61.

Masback A, Olsson H, Westerdahl J, Ingvar C, Jonsson N. Prognostic factors in invasive cutaneous malignant melanoma: a population-based study and review. *Melanoma Res.* 2001; 11:435-45.

Masci P, Borden EC. Malignant melanoma: treatments emerging but early detection is still key. *Cleveland Clinic J. Med.* 2002; 69:529-45.

Massuti B. Melanoma: tratamiento de la enfermedad avanzada. *Rev. Cáncer* 2001; 15:74-80.

Mastrangelo MJ, Maguire HC Jr, Sato T, Nathan FE, Berd D. Active specific immunization in the treatment of patients with melanoma. *Semin. Oncol.* 1996; 23:773-81.

Matsuno T, Goto I. Glutaminase and glutamine synthetase activities in human cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 1992; 52:1192-4.

Mavroukakis SA, Muehlbauer PM, White RL Jr, Schwartzenuber DJ. Clinical pathways for managing patients receiving interleukin 2. *Clin. J. Oncol. Nurs.* 2001; 5:207-17.

McBride WH, Hoon DB, Jung T, Naungayan J, Nizze A, Morton DL. Cyclophosphamide induced alterations in human monocyte functions. *J. Leukoc. Biol.* 1987; 42:659-66.

VIII. Bibliografía

McDonald GB, Slattery JT, Bouvier ME, Ren S, Batchelder AL, Kalthorn TF, Schoch HG, Anasetti C, Gooley T. Cyclophosphamide metabolism, liver toxicity and mortality following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2002; 101:2043-8.

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.

Mellor H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 1998; 332:281-92.

Merlin JL, Marchal S, Ramacci C, Berlion M, Poullain MG. Enhancement of fotemustine (Muphoran R) cytotoxicity by amifostine in malignant melanoma cell lines. *Anticancer Drugs* 2002; 13:141-7.

Meropol NJ, Porter M, Blumenson LE, Lindemann MJ, Pérez RP, Vaickus L, Loewen GM, Creaven PJ, Wilkes KA, Giedlin MA, Caligiuri MA. Daily subcutaneous injection of low-dose interleukin 2 expands natural killer cells *in vivo* without significant toxicity. *Clin. Cancer Res.* 1996; 2:669-77.

Messina JP, Lawrence DA. Cell cycle progression of glutathione-depleted human peripheral blood mononuclear cells is inhibited at S phase. *J. Immunol.* 1989; 143:1974-81.

Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* 1993; 12:2005-15.

Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S, Gore M, Aamdal S, Cebon J, Coates A, Dreno B, Henz M, Schadendorf D, Kapp A, Weiss J, Fraass U, Statkevich P, Muller M, Thatcher N. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2000; 18:158-66.

Middleton MR, Lorigan P, Owen J, Ashcroft L, Lee SM, Harper P, Thatcher N. A randomized phase III study comparing dacarbazine, BCNU, cisplatin and tamoxifen with dacarbazine and interferon in advanced melanoma. *Br. J. Cancer* 2000; 82:1158-62.

Mier JW. Immunotherapy with low-dose IL-2 in combination with GM-CSF. *J. Immunother.* 2003; 26:95-6.

Mihm S, Ennen J, Pessara U, Kurth R, Droge W. Inhibition of HIV-1 replication and NF-kappa B activity by cysteine and cysteine derivatives. *AIDS* 1991; 5:497-503.

Mitchell MS, Kempf RA, Harel W, Shau H, Boswell WD, Lind S, Dean G, Moore J, Bradley EC. Low-dose cyclophosphamide and low-dose interleukin-2 for malignant melanoma. *Bull. N.Y. Acad. Med.* 1989; 65:128-44.

Mitchell MS. Chemotherapy in combination with biomodulation: a 5-year experience with cyclophosphamide and interleukin-2. *Semin. Oncol.* 1992; 19:80-7.

Mitchell MS. Immunotherapy as part of combinations for the treatment of cancer. *Int. Immunopharmacol.* 2003; 3:1051-9.

Miyamoto S, Chiao PJ, Verma IM. Enhanced I kappa B alpha degradation is responsible for constitutive NF-kappa B activity in mature murine B-cell lines. *Mol. Cell Biol.* 1994; 14:3276-82.

Moberly JB, Logan J, Borum PR, Story KO, Webb LE, Jassal SV, Mupas L, Rodela H, Alghamdi GA, Moran JE, Wolfson M, Martis L, Oreopoulos DG. Elevation of whole-blood glutathione in peritoneal dialysis patients by L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate, a cysteine prodrug (Procysteine). *J. Am. Soc. Nephrol.* 1998; 9:1093-9.

VIII. Bibliografía

Mohr P, Makki A, Breitbart E, Schadendorf D. Combined treatment of stage IV melanoma patients with amifostine and fotemustine, a pilot study. *Melanoma Res.* 1998; 8:166-9.

Moretti S, Pinzi C, Spallanzani A, Berti E, Chiarugi A, Mazzoli S, Fabiani M, Vallecchi C, Herlyn M. Immunohistochemical evidence of cytokine networks during progression of human melanocytic lesions. *Int. J. Cancer* 1999; 84:160-8.

Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 1976; 193:1007-8.

Morini M, Cai T, Aluigi MG, Noonan DM, Masiello L, De Flora S, D'Agostini F, Albini A, Fassina G. The role of the thiol N-acetylcysteine in the prevention of tumor invasion and angiogenesis. *Int. J. Biol. Markers* 1999; 14:268-71.

Morton DB, Abbot D, Barclay R, Close BS, Ewbank R, Gask D, Heath M, Mattic S, Poole T, Seamer J, Southee J, Thompson A, Trussell B, West C, Jennings M. Removal of blood from laboratory mammals and birds. *Laboratory Animals* 1993; 27: 1-22.

Moslen MT, Whitehead RF, Ferguson AE, Kanz MF. Protection by L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate, a cysteine prodrug, against 1,1-dichloroethylene hepatotoxicity in rats is associated with decreases in toxin metabolism and cytochrome P-450. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989; 248:157-63.

Mouawad R, Benhammouda A, Rixe O, Antoine EC, Borel C, Weil M, Khayat D, Soubrane C. Endogenous interleukin-6 levels in patients with metastatic malignant melanoma: correlation with tumor burden. *Clin. Cancer Res.* 1996; 2:1405-9.

Murray D, Rosenberg E, Allalunis-Turner MJ. Protection of human tumor cells of differing radiosensitivity by WR-1065. *Radiat. Res.* 2000; 154:159-62.

N

Nagai Y, Ishikawa O, Miyachi Y, Watanabe H. Expression of autocrine motility factor receptor in cutaneous malignant melanoma. *Dermatology* 1996; 192:8-11.

Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. Redox Imbalance and its control in HIV infection. *Antioxid. Redox Signal* 2002; 4:455-64.

Natali PG, Hamby CV, Felding-Habermann B, Liang B, Nicotra MR, Di Filippo F, Giannarelli D, Temponi M, Ferrone S. Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res.* 1997; 57:1554-60.

Newlands ES, Stevens MF, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat. Rev.* 1997; 23:35-61.

Nicola NA, Smith A, Robb L, Metcalf D, Begley CG. The structural basis of the biological actions of the GM-CSF receptor. *Ciba. Found. Symp.* 1997; 204:19-27.

Nishiuch Y, Sasaki M, Nakayasu M, Oikawa A. Cytotoxicity of cysteine in culture media. *In Vitro* 1976; 12:635-8.

Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 1995; 9:484-96.

Norton ND, Mamiya BM, Kehrer JP. Relationships between cell density, glutathione and proliferation of A549 human lung adenocarcinoma cells treated with acrolein. *Toxicology* 1997; 122:111-22.

O

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.

VIII. Bibliografía

O'Day SJ, Boasberg PD, Piro L, Kristedja TS, Wang HJ, Martin M, Deck R, Ames P, Shinn K, Kim H, Fournier P, Gammon G. Maintenance biotherapy for metastatic melanoma with interleukin-2 and granulocyte macrophage-colony stimulating factor improves survival for patients responding to induction concurrent biochemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8:2775-81.

O'Day SJ, Gammon G, Boasberg PD, Martin MA, Kristedja TS, Guo M, Stern S, Edwards S, Fournier P, Weisberg M, Cannon M, Fawzy NW, Johnson TD, Essner R, Foshag LJ, Morton DL. Advantages of concurrent biochemotherapy modified by decrescendo interleukin-2, granulocyte colony-stimulating factor and tamoxifen for patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17:2752-61.

O'Day SJ, Kim CJ, Reintgen DS. Metastatic melanoma: chemotherapy to biochemotherapy. *Cancer Control* 2002; 9:31-8.

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.

O'Dwyer PJ, Hamilton TC, Yao K-S, Tew KD, Ozols RF. Modulation of glutathione and related enzymes in reversal of resistance to anticancer drugs. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 1995; 9:383-96.

Ordóñez A, González Barón M. Factores pronóstico en el melanoma maligno cutáneo. *Rev. Cáncer* 2001; 15:58-64.

Oritani K, Kincade PW, Zhang C, Tomiyama Y, Matsuzawa Y. Type I interferons and limitin: a comparison of structures, receptors and functions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001; 12:337-48.

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, Alonso-Varona A, Barberá-Guillem E. The addition of IL-2 to cyclophosphamide therapy can facilitate tumor growth of B16 melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 1995; 40:292-98.

Parkinson DR, Abrams JS, Wiernik PH, Rayner AA, Margolin KA, Van Echo DA, Sznol M, Dutcher JP, Aronson FR, Doroshow JH. Interleukin-2 therapy in patients with metastatic malignant melanoma: a phase II study. *J. Clin. Oncol.* 1990; 8:1650-6.

Pellicer JA, Lasso de la Vega MC, Obrador E, Navarro J, Estrela JM. Metabolismo del glutatión en células tumorales. *Oncología* 1994; 17:437-47.

Phan GQ, Attia P, Steinberg SM, White DE, Rosenberg SA. Factors associated with response to high-dose interleukin-2 in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2001; 19:3477-82.

Philip PA, Flaherty L. Treatment of malignant melanoma with interleukin-2. *Semin. Oncol.* 1997; 24:32-8.

Piepkorn M. Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressors. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2000; 42:705-22.

Pileblad E, Magnusson T. Increase in rat brain glutathione following intracerebroventricular administration of gamma-glutamylcysteine. *Biochem. Pharmacol.* 1992; 44:895-903.

Plaisance S, Rubinstein E, Alileche A, Han DS, Sahraoui Y, Mingari MC, Bellomo R, Rimoldi D, Colombo MP, Jasmin C. Human melanoma cells express a functional interleukin-2 receptor. *Int. J. Cancer* 1993; 55:164-70.

VIII. Bibliografía

Plummer JL, Smith BR, Sies H, Bend JR. Chemical depletion of glutathione *in vivo*. *Methods Enzymol.* 1981; 77:50-9.

Porta P, Aebi S, Summer K, Lauterburg BH. L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid, a cysteine prodrug: pharmacokinetics and effects on thiols in plasma and lymphocytes in human. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991; 257:331-4.

Prezioso JA, FitzGerald GB, Wick MM. Melanoma cytotoxicity of buthionine sulfoximine (BSO) alone and in combination with 3,4-dihydroxybenylamine and melphalan. *J. Invest. Dermatol.* 1992; 99:289-93.

Prezioso JA, Shields D, Wang N, Rosenstein M. Role of gamma-glutamyltranspeptidase-mediated glutathione transport on the radiosensitivity of B16 melanoma variant cell lines. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1994; 30:373-81.

Punt CJ, van Herpen CM, Jansen RL, Vreugdenhil G, Muller EW, de Mulder PH. Chemoimmunotherapy with bleomycin, vincristine, lomustine, dacarbazine (BOLD) plus interferon alpha for metastatic melanoma: a multicentre phase II study. *Br. J. Cancer* 1997; 76:266-9.

Puri RN, Roskoski R Jr. Reaction of low molecular weight aminothiols with o-phthalaldehyde. *Anal. Biochem.* 1988; 173:26-32.

Q

Queirolo P, Acquati M. Biochemotherapy in metastatic melanoma: *quo vadis?*. *Melanoma Res.* 2005; 15:471-3.

Queirolo P, Acquati M, Kirkwood JM, Eggermont AMM, Rocca A, Testori A. Update: current management issues in malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2005; 15:319-24.

R

Ramu K, Fraiser LH, Mamiya B, Ahmed T, Kehrer JP. Acrolein mercapturates: synthesis, characterization and assessment of their role in the bladder toxicity of cyclophosphamide. *Chem. Res. Toxicol.* 1995; 8:515-24.

Ravi R, Bedi A. NF-kappaB in cancer-a friend turned foe. *Drug Resist. Updat.* 2004; 7:53-67.

Razi-Wolf Z, Hollander GA, Reiser H. Activation of CD4⁺ T lymphocytes from interleukin 2-deficient mice by costimulatory B7 molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93:2903-8.

Richards JM, Gale D, Mehta N, Lestingi T. Combination of chemotherapy with interleukin-2 and interferon alfa for the treatment of metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17:651-7.

Richards JM, Mehta N, Ramming K, Skosey P. Sequential chemoimmunotherapy in the treatment of metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1992; 10:1338-43.

Robak T, Blonski JZ, Kasznicki M, Gora-Tybor J, Dwilewicz-Trojaczek J, Stella-Holowiecka B, Wolowiec D. Cladribine combined with cyclophosphamide is highly effective in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. J.* 2002; 3:244-50.

Rodeck U, Bossler A, Graeven U, Fox FE, Nowell PC, Knabbe C, Kari C. Transforming growth factor beta production and responsiveness in normal human melanocytes and melanoma cells. *Cancer Res.* 1994; 54:575-81.

Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods* 1991; 142:257-65.

VIII. Bibliografía

Rofstad EK, Halsor EF. Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts. *Cancer Res.* 2000; 60:4932-8.

Rose DM, Hochwald SN, Harrison LE, Burt M. Selective glutathione repletion with oral oxothiazolidine carboxylate (OTZ) in the radiated tumor-bearing rat. *J. Surg. Res.* 1996; 62:224-8.

Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, Matory YL, Skibber JM, Shiloni E, Vetto JT. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 1985; 313:1485-92.

Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Linehan WM, Seipp C, Calabro S, Karp SE, Sherry RM, Steinberg S, White DE. Combination therapy with interleukin-2 and alpha-interferon for the treatment of patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* 1989; 7:1863-74.

Rosenberg SA, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, Parkinson DR, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA* 1994; 271:907-13.

Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, Parkinson DR, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J. Natl. Cancer Inst.* 1994; 86:1159-66.

Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 1997; 275:1790-2.

Ruiz A, Puig S, Malveyh J, Lázaro C, Lynch M, Giménez-Arnau AM, Puig L, Sánchez-Conejo J, Estivill X, Castel T. CDKN2A mutations in Spanish cutaneous malignant melanoma families and patients with multiple melanomas and other neoplasia. *J. Med. Genet.* 1999; 36:490-3.

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

Safron J, Rice D, Gordon D, Leaf C, White R. Protective effects of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate treatment on cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *J. Urol.* 1997; 157:1946-50.

Sanders DS, Blessing K, Hassan GA, Bruton R, Marsden JR, Jankowski J. Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours. *Mol. Pathol.* 1999; 52:151-7.

Schadendorf D, Heidel J, Gawlik C, Suter L, Czarnetzki BM. Association with clinical outcome of expression of VLA-4 in primary cutaneous malignant melanoma as well as P-selectin and E-selectin on intratumoral vessels. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995; 87:366-71.

Schrader AJ. Combined chemoimmunotherapy in metastatic melanoma is there a need for the double?. *Anticancer Drugs* 2000; 11:143-8.

Schwartz RN, Stover L, Dutcher J. Managing toxicities of high-dose interleukin-2. *Oncology (Huntingt)* 2002; 16:11-20.

Segura A, Yuste A, Cercos A, López-Tendero P, Girones R, Pérez-Fidalgo JA, Herranz C. Pulmonary fibrosis induced by cyclophosphamide. *Ann. Pharmacother.* 2001; 35: 894-7.

VIII. Bibliografía

Serafino A, Sinibaldi-Vallebona P, Gaudiano G, Koch TH, Rasi G, Garaci E, Ravagnan G. Cytoplasmic localization of anthracycline antitumor drugs conjugated with reduced glutathione: a possible correlation with multidrug resistance mechanisms. *Anticancer Res.* 1998; 18:1159-66.

Serrone L, Hersey P. The chemoresistance of human malignant melanoma: an update. *Melanoma Res.* 1999; 9:51-8.

Serrone L, Zeuli M, Sega FM, Cognetti F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2000; 19:21-34.

Sertoli MR, Bernengo MG, Ardizzoni A, Brunetti I, Falcone A, Vidili MG, Cusimano MP, Appino A, Doveil G, Fortini C. Phase II trial of recombinant alpha-2b interferon in the treatment of metastatic skin melanoma. *Oncology* 1989; 46:96-8.

Sertoli MR, Queirolo P, Bajetta E, Del Vecchio M, Comella G, Barduagni L, Bernengo MG, Vecchio S, Criscuolo D, Bufalino R, Morabito A, Cascinelli N. Multi-institutional phase II randomized trial of integrated therapy with cisplatin, dacarbazine, vindesine, subcutaneous interleukin-2, interferon alpha2a and tamoxifen in metastatic melanoma. BREMIM (Biological Response Modifiers in Melanoma). *Melanoma Res.* 1999; 9:503-9.

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.

Shrieve DC, Bump EA, Rice GC. Heterogeneity of cellular glutathione among cells derived from a murine fibrosarcoma or a human renal cell carcinoma detected by flow cytometric analysis. *J. Biol. Chem.* 1988; 263:14107-14.

Simonetti O, Lucarini G, Brancorsini D, Nita P, Bernardini ML, Biagini G, Offidani A. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 in cutaneous melanocytic lesions. *Cancer* 2002; 95:1963-70.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990; 82:1107-12.

Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T, Schirner M, Wolf GL, Alitalo K, Detmar M. Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am. J. Pathol.* 2001; 159:893-903.

Slominski A, Wortsman J, Carlson AJ, Matsuoka LY, Balch CM, Mihm MC. Malignant melanoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2001; 125:1295-306.

Smith KA. T-cell growth factor. *Immunol. Rev.* 1980; 51:337-57.

Smoluk GD, Fahey RC, Calabro-Jones PM, Aguilera JA, Ward JF. Radioprotection of cells in culture by WR-2721 and derivatives: form of the drug responsible for protection. *Cancer Res.* 1988; 48:3641-7.

Smyth MJ. Glutathione modulates activation-dependent proliferation of human peripheral blood lymphocyte populations without regulating their activated function. *J. Immunol.* 1991; 146:1921-7.

Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 2001; 409:207-11.

Sparano JA, Fisher RI, Sunderland M, Margolin K, Ernest ML, Sznol M, Atkins MB, Dutcher JP, Micetich KC, Weiss GR. Randomized phase III trial of treatment with high-dose interleukin-2 either alone or in combination with interferon alfa-2a in patients with advanced melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1993; 11:1969-77.

VIII. Bibliografía

Sparano JA, Weller E, Nazeer T, Habermann T, Traynor AE, Manalo J, Cassileth P. Phase II trial of infusional cyclophosphamide, doxorubicin and etoposide in patients with poor-prognosis intermediate-grade non-Hodgkin lymphoma: an Eastern Cooperative Oncology Group trial (E3493). *Blood* 2002; 100:1634-40.

Srivenugopal KS, Ali-Osman F. Activity and distribution of the cysteine prodrug activating enzyme, 5-oxo-L-prolinase, in human normal and tumor tissues. *Cancer Lett.* 1997; 117:105-11.

Stables G, Doherty V, MacKie R. Nine years' experience of BELD combination chemotherapy (bleomycin, vindesine, CCNU and DTIC) for metastatic melanoma. *Br. J. Dermatol.* 1992; 127:505-8.

Stahl A, Mueller BM. Melanoma cell migration on vitronectin: regulation by components of the plasminogen activation system. *Int. J. Cancer* 1997; 71:116-22.

Stein ME, Bernstein Z, Tsalic M, Drumea K, Steiner M, Sklar Z, Haim N. Chemoimmunohormonal therapy with carmustine, dacarbazine, cisplatin, tamoxifen and interferon for metastatic melanoma: a prospective phase II study. *Am. J. Clin. Oncol.* 2002; 25:460-3.

Stenzinger W, Bruggen J, Macher E, Sorg C. Tumor angiogenic activity (TAA) production *in vitro* and growth in the nude mouse by human malignant melanoma. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1983; 19:649-56.

Stevens MF, Hickman JA, Stone R, Gibson NW, Baig GU, Lunt E, Newton CG. Antitumor imidazotetrazines. Synthesis and chemistry of 8-carbamoyl-3-(2-chloroethyl)imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one, a novel broad-spectrum antitumor agent. *J. Med. Chem.* 1984; 27:196-201.

Stey C, Steurer J, Bachmann S, Medici TC, Tramer MR. The effect of oral N-acetylcysteine in chronic bronchitis: a quantitative systematic review. *Eur. Respir. J.* 2000; 16:253-62.

Stoter G, Shiloni E, Aamdal S, Cleton FJ, Iacobelli S, Bijman JT, Palmer P, Franks CR, Rodenhuis S. Sequential administration of recombinant human interleukin-2 and dacarbazine in metastatic melanoma. A multicentre phase II study. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1989; 25:41-3.

Sugimoto C, Matsukawa S, Fujieda S, Noda I, Tanaka N, Tsuzuki H, Saito H. Involvement of intracellular glutathione in induction of apoptosis by cisplatin in a human pharyngeal carcinoma cell line. *Anticancer Res.* 1996; 16:675-80.

Szamel M, Appel A, Schwinzer R, Resch K. Different protein kinase C isoenzymes regulate IL-2 receptor expression or IL-2 synthesis in human lymphocytes stimulated via the TCR. *J. Immunol.* 1998; 160:2207-14.

T

Taniguchi T, Minami Y. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell* 1993; 73:5-8.

Taylor CW, Chase EM, Whitehead RP, Rinehart JJ, Neidhart JA, González R, Bunn PA, Hersh EM. A Southwest Oncology Group Phase I study of the sequential combination of recombinant interferon-gamma and recombinant interleukin-2 in patients with cancer. *J. Immunother.* 1992; 11:176-83.

Teicher BA. Malignant cells, directors of the malignant process: role of transforming growth factor-beta. *Cancer Metastasis Rev.* 2001; 20:133-43.

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.

Thomas J, Liu F, Link DC. Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Curr. Opin. Hematol.* 2002; 9:183-9.

VIII. Bibliografía

Thompson J, Menzies S, Shaw H, Scolyer R, Kefford R. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005; 365:2004-5.

Thompson JA, Gold PJ, Fefer A. Outpatient chemoimmunotherapy for the treatment of metastatic melanoma. *Semin. Oncol.* 1997; 24:44-8.

Thomson DB, Adena M, McLeod GR, Hersey P, Gill PG, Coates AS, Olver IN, Kefford RF, Lowenthal RM, Beadle GF. Interferon-alpha 2a does not improve response or survival when combined with dacarbazine in metastatic malignant melanoma: results of a multi-institutional Australian randomized trial. *Melanoma Res.* 1993; 3:133-8.

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.

Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351: 998-1012.

Tobi SE, Paul N, McMillan TJ. Glutathione modulates the level of free radicals produced in UVA-irradiated cells. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2000; 57:102-12.

U

Ueno Y, Kohgo Y, Sakamaki S, Itoh Y, Takahashi M, Hirayama Y, Niitsu Y. Immunochemotherapy in B16-melanoma-cell-transplanted mice with combinations of interleukin-2, cyclophosphamide and PSK. *Oncology* 1994; 51:296-302.

Ugurel S, Rapp G, Tilgen W, Reinhold U. Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. *J. Clin. Oncol.* 2001; 19:577-83.

Uma Devi P, Prasanna PG. Radioprotective effect of combinations of WR-2721 and mercaptopropionylglycine on mouse bone marrow chromosomes. *Radiat. Res.* 1990; 124:165-70.

United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia. *Br. J. Cancer* 1998; 77:1-10.

V

Van Der Werf P, Meister A. The metabolic formation and utilization of 5-oxo-L-proline (L-pyroglutamate, L-pyrrolidone carboxylate). *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1975; 43:519-56.

van Klaveren RJ, Hoet PH, Pype JL, Demedts M, Nemery B. Increase in gamma-glutamyltransferase by glutathione depletion in rat type II pneumocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 22:525-34.

van Muijen GN, Danen EH, de Vries TJ, Quax PH, Verheijen JH, Ruiter DJ. Properties of metastasizing and nonmetastasizing human melanoma cells. *Recent Results Cancer Res.* 1995; 139:105-22.

van Zandwijk N. N-acetylcysteine for lung cancer prevention. *Chest* 1995; 107:1437-41.

Vardy J, Wong E, Izard M, Clifford A, Clarke SJ. Life-threatening anaphylactoid reaction to amifostine used with concurrent chemoradiotherapy for nasopharyngeal cancer in a patient with dermatomyositis: a case report with literature review. *Anticancer Drugs* 2002; 13:327-30.

Vaughan MM, Moore J, Riches PG, Johnston SR, A'Hern RP, Hill ME, Eisen T, Ayliffe MJ, Thomas JM, Gore ME. GM-CSF with biochemotherapy (cisplatin, DTIC, tamoxifen, IL-2 and interferon-alpha): a phase I trial in melanoma. *Ann. Oncol.* 2000; 11:1183-9.

Verschraegen CF, Kleeberg UR, Mulder J, Rumke P, Truchetet F, Czarnetzki B, Rozenzweig M, Thomas D, Suciú S. Combination of cisplatin, vindesine and dacarbazine in advanced malignant melanoma. A Phase II Study of the EORTC Malignant Melanoma Cooperative Group. *Cancer* 1988; 62:1061-5.

VIII. Bibliografía

Vita JA, Frei B, Holbrook M, Gokce N, Leaf C, Keaney JF Jr. L-2-Oxothiazolidine-4-carboxylic acid reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J. Clin. Invest.* 1998; 101:1408-14.

Vuoristo MS. Complete responses and survival after polychemotherapy plus interferon-alpha for patients with metastatic melanoma. *Melanoma Res.* 1996; 6:331-6.

W

Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. TNF and cancer therapy induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappa B. *Science* 1996; 274:784-7.

Wang T, Chen X, Schecter RL, Baruchel S, Alaoui-Jamali M, Melnychuk D, Batist G. Modulation of glutathione by a cysteine pro-drug enhances *in vivo* tumor response. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996; 276:1169-73.

Ward NE, Pierce DS, Chung SE, Gravitt KR, O'Brian CA. Irreversible inactivation of protein kinase C by glutathione. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:12558-66.

Westphal JR, Van't Hullenaar R, Peek R, Willems RW, Crickard K, Crickard U, Askaa J, Clemmensen I, Ruitter DJ, De Waal RM. Angiogenic balance in human melanoma: expression of VEGF, bFGF, IL-8, PDGF and angiostatin in relation to vascular density of xenografts *in vivo*. *Int. J. Cancer* 2000; 86:768-76.

White AC, Thannickal VJ, Fanburg BL. Glutathione deficiency in human disease. *J. Nutr. Biochem.* 1994; 5:218-26.

Williamson JM, Boettcher B, Meister A. Intracellular cysteine delivery system that protects against toxicity by promoting glutathione synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1982; 79:6246-9.

Williamson JM, Meister A. Stimulation of hepatic glutathione formation by administration of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate, a 5-oxo-L-prolinase substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981; 78:936-9.

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.

Wollina U, Hipler UC, Knoll B, Graefe T, Kaatz M, Kirsch K. Serum matrix metalloproteinase-2 in patients with malignant melanoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2001; 127:631-5.

Wollina U, Karte K, Hipler UC, Olbertz K. Soluble ICAM-1 seems to be related to prognosis in malignant melanoma. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 1999; 12:264-6.

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 2004; 134:489-92.

Y

Yamanishi DT, Graham M, Buckmeier JA, Meyskens FL Jr. The differential expression of protein kinase C genes in normal human neonatal melanocytes and metastatic melanomas. *Carcinogenesis* 1991; 12:105-9.

Yi X, Ding L, Jin Y, Ni C, Wang W. The toxic effects, GSH depletion and radiosensitivity by BSO on retinoblastoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1994; 29:393-6.

York RM, Foltz AT. Bleomycin, vincristine, lomustine and DTIC chemotherapy for metastatic melanoma. *Cancer* 1988; 61:2183-6.

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.

VIII. Bibliografía

Young AM, Marsden J, Goodman A, Burton A, Dunn JA. Prospective randomized comparison of dacarbazine (DTIC) versus DTIC plus interferon-alpha (IFN-alpha) in metastatic melanoma. *Clin. Oncol.* 2001; 13:458-65.

Young DW, Lever RS, English JS, MacKie RM. The use of BELD combination chemotherapy (bleomycin, vindesine, CCNU and DTIC) in advanced malignant melanoma. *Cancer* 1985; 55:1879-81.

Yung WK. Future directions for temozolomide therapy. *Semin. Oncol.* 2001; 28:43-6.

Z

Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol. Life Sci.* 2003; 60:6-20.

Zia MI, Forsyth P, Chaudhry A, Russell J, Stewart DA. Possible benefits of high dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation for adults with recurrent medulloblastoma. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 30:565-9.

Nota: las direcciones de las páginas web que figuran en la bibliografía han sido validadas hasta la fecha de entrega de esta Tesis Doctoral.