



**universidad
de león**

Departamento de Ciencias Biomédicas

Área de Fisiología

**Efecto de la administración de PPI-2458
sobre los procesos de proliferación
celular y apoptosis en un modelo *in
vitro* de hepatocarcinoma**



**Memoria presentada por el Licenciado Javier Martin Renedo para
la obtención del grado de Doctor por la Universidad de León**

León, 2011



universidad
de león

**INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

Los Dres. D. Javier González-Gallego y Jose Luis Mauriz Gutiérrez, como directores de la Tesis Doctoral titulada: “Efecto de la administración de PPI-2458 sobre los procesos de proliferación celular y apoptosis en un modelo *in vitro* de hepatocarcinoma” realizada por D. Javier Martin Renedo, en el Departamento de Ciencias Biomédicas, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa

Lo que firman, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 10 de septiembre de 2011.

Los directores de la Tesis Doctoral

Fdo.: Javier González-Gallego

Fdo.: Jose Luis Mauriz Gutiérrez



universidad
de león

**ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y
norma 7ª de las Complementarias de la ULE)**

El Departamento de Ciencias Biomédicas en su reunión celebrada el día 3 de Junio de 2011 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada: “Efecto de la administración de PPI-2458 sobre los procesos de proliferación celular y apoptosis en un modelo *in vitro* de hepatocarcinoma”, dirigida por los Dres. D. Javier González-Gallego y Jose Luis Mauriz Gutiérrez, y elaborada por D. Javier Martin Renedo, cuyo título en inglés es: *“Effect of treatment with PPI-2458 on cell proliferation and apoptosis processes in an in vitro model of Hepatocarcinoma”*.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 10 de Septiembre de 2011.

VºBº

El Director del Departamento,

La secretaria,

Fdo.: Dr. Juan José García Vieitez

Fdo.: Dra. Pilar Sánchez Collado

A mis padres y amigos

“Desaprender la mayor parte de las cosas que nos han enseñado es más importante que aprender”

Eduard Punset

AGRADECIMIENTOS

Tras cinco años de carrera, me he dedicado durante 6 años a hacer esta tesis y demás cosas. Hay que ver cómo pasa el tiempo. Todavía me acuerdo cuando empecé la carrera y estaba, bueno hablo por todos mis compañeros de clase, estábamos perdidos recién llegados del instituto. Durante mi periplo por la Facultad, conocí a José Luis, y no sé cómo me lió para que cuando terminara hiciera una tesis. Y aquí estamos, seis años después y casi para presentarla.

Una vez caído en el Departamento mi mundo cambió, conocí a mucha gente. El primero de ellos José Luis, del que he aprendido todo y que se ha convertido en más que un director de Tesis, en un amigo y al que tengo que agradecer muchísimas cosas.

Tras él Javier, que me dejó realizar la Tesis en el Departamento, aunque luego me trasladara a nuestro querido Instituto con pierna y media. Me sorprende su gran capacidad y rapidez al corregir, nunca he visto a nadie tan rápido leyendo, y en inglés. ¡Ay madre!

Otras dos personas a las que tengo que agradecer muchas cosas, esos días de cine, dejar de ser compañeras de trabajo y convertirse en amigas, por divertirme y aguantarme, son Sonia y Vicky, muchas gracias, aunque sé de buena tinta que al principio no me aguantabais mucho, vamos que os parecía un *petardo*.

A Mari José tampoco le caí muy bien en mis principios, y con el trato ya me conoció y ya le gusté, y si no lo disimula muy bien. Vaya parladas que nos hemos echado.

De Mar no puedo decir nada malo, aunque en mis principios me daba miedo ir a pedirla algo, luego ya empezamos a llevarnos bien, y ahora cada vez que nos encontramos nos ponemos a charlar de cualquier cosa. Gracias por tu risa, y de nada por probarte todas las puntas y demás reactivos.

En cuanto a Chus, gracias por tratarme tan bien, ser tan agradable y tener esa jovialidad.

Muchas gracias también al resto de profesores del Departamento.

Gracias a Irene, que me enseñó a cultivar células, algo que siempre la agradeceré. Elena te echamos de menos, nunca olvidaré esos estreses que teníamos los dos con todo. En cuanto a Sara me encanta como eres, no cambies nunca. Sandra, me gusta ese sentido de la desconfianza que tienes hacia todo, y esa capacidad tuya de enrollarte como las persianas, aunque te sigo debiendo dos comidas y una cena.

Rodrigo, espero verte pronto, gracias por el apoyo que me diste, por recibirme en tu casa y en tu vida.

Gracias al resto de *becaris* y compañeros que me han rodeado a lo largo de estos años: Bea, Nané, Christiano, Guillermo, Raquel, Susana...

I want to thank Ulla, my Swedish boss, I am very gratefull to her, for accepting me and letting me being there working in her group. Thank you to all of your group, Erica, Aram, Kristian, Ilona, Lauy, Magda and Sandeep. Thank you for teaching me a lot of techniques and your kindness, happyness, and sauna parties.

Me gustaría dar mil gracias de todo corazón todos mis amigos y amigas, todavía no sé ni cómo me aguantan, por apoyarme en los momentos difíciles. A mis padres, a los que junto a mis amigos dedico esta Tesis, muchas gracias por dejarme hacer lo que he querido, por apoyarme, por quererme, por todo.

Parte de los resultados expuestos en la presente Memoria han sido objeto de las siguientes publicaciones y comunicaciones:

Reducción en la viabilidad y parada del ciclo celular en líneas celulares derivadas de hepatocarcinoma humano tras la administración de PPI-2458. Martín-Renedo J, Carbajo S, Piva M, Mauriz JL, González-Gallego J XXXV Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH) Madrid, España, 2010.

Cell cycle arrest and apoptosis induction in human hepatocarcinoma HepG2 cells by administration of methionine aminopeptidase-2 inhibitor PPI-2458. Mauriz JL, Martín-Renedo J, Carbajo-Pescador S, Piva M, García-Palomo A, González Gallego J. IV Jornadas Científicas del CIBERehd. Barcelona, España, 2010.

Efecto de la administración de un inhibidor de la metionina aminopeptidasa-2 sobre el ciclo celular y la apoptosis en células de la línea HepG2. Martín-Renedo J, Carbajo S, Piva M, Mauriz JL, González-Gallego J. XXXV Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). Madrid, España, 2011.

Martín-Renedo J, Carbajo S, Piva M, Culebras JM, Ordoñez R, Mauriz JL, González-Gallego J. Cell cycle arrest induced by PPI-2458 on HepG2 hepatocarcinoma cells. XXIV European Congress on Surgical Infections (SIS-E). León, España, 2011. Surgical Infections 2,12, A-10. 2011

ABREVIATURAS UTILIZADAS

Ac-DEV-AMC	7-amino-4-metilcumarina N-acetil-L-aspartil-L-glutamil-L-valil-L-aspartico amida
Ac-IETD-AFC	7-amino-4-trifluorometilcumarina N-acetil-L-ileucil-L-glutamil-L-threonil-L-aspartico amida
Ac-LEHD-AMC	7-amino-4-metilcumarina N-acetil-L-leucil-L-glutamil-L-histidil-L-aspartico amida
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AIF	Factor inductor de apoptosis
AKT/PKB	Proteína quinasa B
ANOVA	Test de análisis de varianza
APC	Complejo promotor de la anafase/ciclosoma
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BRG1	Gen 1 relacionado con <i>Melanogaster brahma</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
CAK	Quinasa activadora de CDK
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
CKI	Proteínas inhibidoras de CDK
cols	Colaboradores
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CpG	Regiones del genoma con alta frecuencia de citosinas y guaninas
CUL1	Cullina 1
DD	Dominio de muerte
DEPC	Dietilpirocarbonato

DISC	Complejo de señalización de inducción de muerte
DNMT	ADN Metiltransferasa
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
E1	Enzima activadora de ubiquitina
E2	Enzima conjugadora de ubiquitina
E3	Ubiquitina ligasa
EDTA	Ácido etilén diamino tetra acético
EEM	Error estándar de la media
eIF-2	Factor eucariótico de iniciación 2
ERK	Quinasa regulada extracelularmente
FADD	Proteína asociada a Fas con el dominio de muerte
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
g	Gramo
G ₁	Fase del ciclo celular gap1
G ₂	Fase del ciclo celular gap2
GSTP1	Glutación S-transferasa pi-1
hBRM,	Proteína humana homóloga <i>Drosophila melanogaster brahma</i>
HBV	Virus de hepatitis B
HCC	Hepatocarcinoma
HCV	Virus de hepatitis C
HDAC	Histona deacetilasa
HIF	Factor inducible por hipoxia
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HUVEC	Células humanas endoteliales de la vena umbilical
IL	Interleucina

JAK	Quinasa asociada a Janus
JNK	Quinasa terminal c-Jun
kDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolisacárido
M	Fase del ciclo celular donde tiene lugar la mitosis
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MCM7	Proteína mantenimiento de minicromosomas 7
MetAP	Metionina aminopeptidasa
MMP	Metaloproteinasa
MYT1	Factor de transcripción de la mielina 1
NF-κB	Factor nuclear kappa B
nM	Nanomolar
nm	Nanómetro
PBS	Tampón fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fenilmetil-sulfonyl fluoruro
RB	Proteína del retinoblastoma
PPI-2458	[(1 R)-1-Carbamoil-2-metil-propil]-carbámico-(3R, 4S, 5S, 6R)-5-metoxi-4-[(2R,3R)-2-metil-3-(3-metil-but-2-enil)-oxirani]-1-oxa-espiro[2.5]oct-6-il ester
PTEN	Proteína homóloga de la fosfatasa y la tensina
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RASSF1A	Familia de dominio asociado a RAS
RBX1	Proteína 1 RING box
RT-PCR	Transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa
S	Fase del ciclo celular de síntesis

SCF	Complejo que contiene las proteínas Skp, Cullina y F-box
SDS	Dodecil sulfato sódico
SFRP1	Proteína secretada relacionada con <i>frizzled 1</i>
SKP1	Proteína quinasa 1 asociada a la fase S
SOSC-1	Proteína 1 supresora de la señalización de citocinas
STAT	Activador de la transcripción y transductor de señales
Stattic	6-Nitrobenzo[b]tiofeno 1,1-dioxido
SUV39H1	Histona-lisina N-metiltransferasa
TEMED	Tetrametiletilendiamida
TNFR	Receptor de factor de necrosis tumoral
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAIL	Ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF
UPS	Sistema ubiquitina proteasoma
V	Voltios
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
xg	Unidades de gravedad
XIAP	Proteína ligada a la apoptosis X
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar

ÍNDICE

1. - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
2. - REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 HEPATOCARCINOMA.....	9
2.2 PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA	10
2.3 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS Y GENÉTICAS DURANTE LA HEPATOCARCINOGENÉISIS.....	11
2.4 ALTERACIONES EPIGENÉTICAS DURANTE LA HEPATOCARCINOGENÉISIS.....	13
2.5 CICLO CELULAR	14
2.5.1 CDKs y ciclinas	15
2.5.2 Proteínas Inhibidoras de CDKs (CKI)	16
2.5.3 La vía de señalización RB/E2F.....	19
2.5.4 Fosforilación Positiva y Negativa de CDKs.....	21
2.5.5 Degradación Proteica	22
2.6 APOPTOSIS	24
2.6.1 Vía extrínseca o de los receptores.....	25
2.6.2 Vía Intrínseca.....	26
2.6.3 Smac/DIABLO.	27
2.6.4 Proteínas de la familia Bcl-2.	28
2.6.5 The BH3-only tribe.	30
2.6.6 La familia Bax.....	30
2.6.7 Apoptosis, AKT y MAPK	32
2.7 STAT3 Y CITOCINAS	33
2.8 PPI-2458 y METAP-2.....	35
2.8.1 Estructura de la Vasculatura Tumoral	37
2.8.2 Metionina aminopeptidasas.....	38
2.8.3 MetAP-2	39
2.8.4 PPI-2458	41
3. - MATERIAL Y MÉTODOS	53
3.1 ÁMBITO DE TRABAJO	55
3.2 LÍNEA CELULAR	55
3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	56
3.3.1 Grupos experimentales	56
3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	57
3.4.1. Viabilidad Celular (MTT)	57
3.4.2 Ciclo Celular (FACS)	58

3.4.3 Homogeneizado Total	59
3.4.4 Actividad de Caspasa-3, -8 y -9.....	60
3.4.5 Concentración de proteínas	61
3.4.6 Western Blot	62
3.4.7 Análisis de la expresión génica por retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-qPCR).....	66
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	72
4.- RESULTADOS	79
4.1 Efecto del fármaco PPI-2458 sobre la viabilidad celular de la línea derivada de hepatocarcinoma humano HepG2.....	81
4.2 Efecto del fármaco PPI-2458 sobre la cinética del ciclo celular y su regulación	82
4.2.2 Marcadores de ciclo celular	83
4.3 Vías de Señalización MAPK y AKT/PKB	89
4.4 Efecto del fármaco PPI-2458 sobre la actividad de caspasas y proteínas de la familia Bcl-2	92
4.5 Vía de señalización de STAT3	95
4.6 Citocinas y Factores de Crecimiento	98
5.- DISCUSIÓN.....	105
6.- SUMMARY	119
7.- CONCLUSIONS	141
CONCLUSIONES	141
FIRST CONCLUSION:	143
SECOND CONCLUSION:	143
THIRD CONCLUSION:	143
FOURTH CONCLUSION:	143
FIFTH CONCLUSION:	143
SIXTH CONCLUSION:.....	143
GENERAL CONCLUSION:	144
CONCLUSIÓN PRIMERA:	144
CONCLUSIÓN SEGUNDA:	144
CONCLUSIÓN TERCERA:	144
CONCLUSIÓN CUARTA:.....	145
CONCLUSIÓN QUINTA:	145
CONCLUSIÓN SEXTA:	145
CONCLUSIÓN GENERAL:	145
8.- BIBLIOGRAFÍA.....	145

1. - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El carcinoma hepatocelular (HCC) es el quinto tipo de tumor más frecuente y la segunda causa de muerte más común en el mundo debida al cáncer. La hepatitis viral, la cirrosis alcohólica y la esteatohepatitis no alcohólica explican el incremento del HCC en los países occidentales. Los fármacos utilizados en el tratamiento del HCC son citotóxicos y no específicos para el tratamiento de esta enfermedad, presentando un gran número de efectos secundarios. Desafortunadamente, no más del 30% de los pacientes son candidatos para las estrategias terapéuticas actuales, y la mayoría de ellos se enfrentan a un mal pronóstico. A pesar de los esfuerzos en investigación realizados en esta materia, todavía existen controversias en cuanto las aproximaciones terapéuticas más adecuadas para el tratamiento del HCC.

En los últimos años, se ha incrementado el interés en el uso potencial de los fármacos anti-angiogénicos en el tratamiento del cáncer. Este hecho se ha visto reflejado en el gran número de estudios que se han llevado a cabo utilizando este tipo de compuestos. Los fármacos o agentes anti-angiogénicos, han sido aprobados por la Administración Americana de Alimentos y Medicamentos (FDA), estando en desarrollo estudios clínicos en tercera fase que emplean este tipo de compuestos como tratamiento para el cáncer hepático o como adyuvantes.

La fumagilina, uno de los primeros compuestos descritos como inhibidor de la angiogénesis, es un metabolito del microorganismo *Aspergillus fumigatus fresenius*, con un potente efecto citostático sobre las células endoteliales *in vitro*. La fumagilina se une covalentemente a la metionina aminopeptidasa-2 y el tratamiento de células de mamífero con esta droga incrementa los niveles de esta proteína, evitando la renovación proteica. Desafortunadamente, la administración prolongada de la fumagilina está limitada por una gran pérdida de peso, explicando por qué no se ha utilizado en estudios clínicos. Este hecho ha

conducido a la síntesis de nuevos derivados con actividades anti-angiogénicas mejoradas y menores efectos secundarios.

Nuestro grupo ha demostrado previamente, en un modelo *in vivo*, que la administración del derivado de la fumagilina, TNP-470, es capaz de evitar la progresión del HCC induciendo la parada del ciclo celular y reduciendo el estrés oxidativo hepático. De cualquier forma, tras unos datos prometedores iniciales en humanos, el desarrollo clínico del TNP-470 se ha detenido, debido en parte a los problemas con el régimen de dosis para la administración intravenosa, toxicidad neuronal y vida media corta en el torrente sanguíneo.

Recientemente, se ha desarrollado el PPI-2458, un análogo oralmente activo de la fumagilina e inhibidor irreversible de la enzima MetAP-2. El fármaco, similar a la fumagilina y al TNP-470, muestra una potente actividad anti-angiogénica, pero no produce convulsiones. Aunque los estudios son todavía escasos, el beneficio potencial del PPI-2458 se ha probado en diferentes patologías tales como sinovitis, artritis reumatoide, melanoma y linfoma no-Hodking. Debido a que los datos de los efectos anti-tumorales en HCC no están disponibles todavía, en el presente estudio hemos investigado los efectos anti-proliferativos, oncostáticos y pro-apoptóticos del tratamiento del PPI-2458 sobre células HepG2 derivadas de hepatocarcinoma humano.

Contemplando todo lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo los objetivos específicos planteados, son los siguientes:

1. Evaluar el posible efecto anti-proliferativo del fármaco PPI-2458 sobre la línea celular derivada de hepatocarcinoma humano HepG2.

2. Determinar si la incubación con PPI-2458 puede retrasar o parar el avance del ciclo celular en células HepG2.
3. Conocer las causas de la posible detención del ciclo celular, determinando las proteínas involucradas en ello.
4. Estudiar la capacidad pro-apoptótica de la administración del fármaco PPI-2458 sobre las células HepG2.
5. Profundizar en el conocimiento de las vías de señalización activadas o reprimidas una vez que se produce la administración del derivado de la fumagilina.

2. - REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 HEPATOCARCINOMA

El carcinoma hepatocelular o hepatocarcinoma (HCC) es el principal tumor primario de hígado [1]. EL HCC es el quinto cáncer más frecuente y la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo [2], siendo capaz de causar anualmente alrededor de 600.000 muertes, principalmente en los países en vías de desarrollo, pero con una incidencia creciente en los países desarrollados [1].

Anualmente en Norteamérica y Europa occidental, se detectan alrededor de 10 por cada 100.000 habitantes, mientras que en África y Asia son entre 50 y 150 casos por cada 100.000 habitantes [3].

El HCC se desarrolla de forma más habitual a consecuencia de una enfermedad hepática subyacente y mayoritariamente asociado a la cirrosis [4]. Se han descrito una gran variedad de factores de riesgo asociados al HCC, destacando entre otros la exposición a virus hepáticos (Hepatitis B y C), cloruro de vinilo, tabaco, alimentos contaminados con aflatoxina B1, consumo crónico de alcohol, hígado graso no asociado al alcohol, diabetes, obesidad, dieta, contraceptivos orales y hemocromatosis [1,4-15]. La prevalencia de dichos factores de riesgo es diferente según la región geográfica que se analice. De este modo, la infección crónica por virus de la hepatitis B (HBV) es el principal agente relacionado con el HCC en países asiáticos y africanos, mientras que la infección por el virus de la hepatitis c (HCV) predomina en Japón, Estados Unidos y Europa [1].

Dada la heterogeneidad etiológica del HCC, junto con la existencia de posibles interrelaciones en la carcinogénesis, la complejidad de las funciones de los hepatocitos y la fase en la que

normalmente se detecta la enfermedad hacen difícil el estudio de los eventos moleculares implicados en el desarrollo de este tumor. El HCC aparece a partir de uno o la combinación de varios factores etiológicos que conducen al aumento del recambio celular hepático, debido a que producen inflamación y daño al ADN. El resultado final puede ser la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumor, que posiblemente se pueden acompañar de inestabilidad genómica, sobreexpresión de factores de crecimiento y pro-angiogénicos, junto con la activación de la telomerasa [3]. Durante el proceso de hepatocarcinogénesis, múltiples alteraciones genéticas van a conferir ventajas a las células tumorales, favoreciendo tanto la proliferación como la supervivencia. Así, durante el estado pre-neoplásico, existe una sobreexpresión de las vías mitogénicas celulares que conducen a la selección de ciertos clones de células displásicas. Estos clones, organizados como nódulos displásicos y rodeados por un septo fibroso de tejido conjuntivo, pueden evolucionar a un fenotipo maligno. Además, como ya hemos indicado, múltiples alteraciones genéticas pueden activar oncogenes o inactivar genes supresores de tumor por mecanismos moleculares todavía no bien elucidados [16].

2.2 PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA

Se cree que el desarrollo y la progresión del cáncer están acompañados por cambios complejos en los patrones de expresión de genes. Así, cuando se han comparado los patrones de expresión génica entre HCC y tejido hepático sano, utilizando microarrays de ADNc [17-19] se ha encontrado un incremento de la expresión de genes relacionados con la proliferación y división celular, junto con la expresión de algunos genes específicos de hepatocitos diferenciados [17-23]. Estas observaciones sugieren un incremento

de la proliferación celular junto con una disminución de la expresión de genes relacionados con la diferenciación celular, estando asociadas ambas a una desdiferenciación de las células cancerosas durante la progresión tumoral.

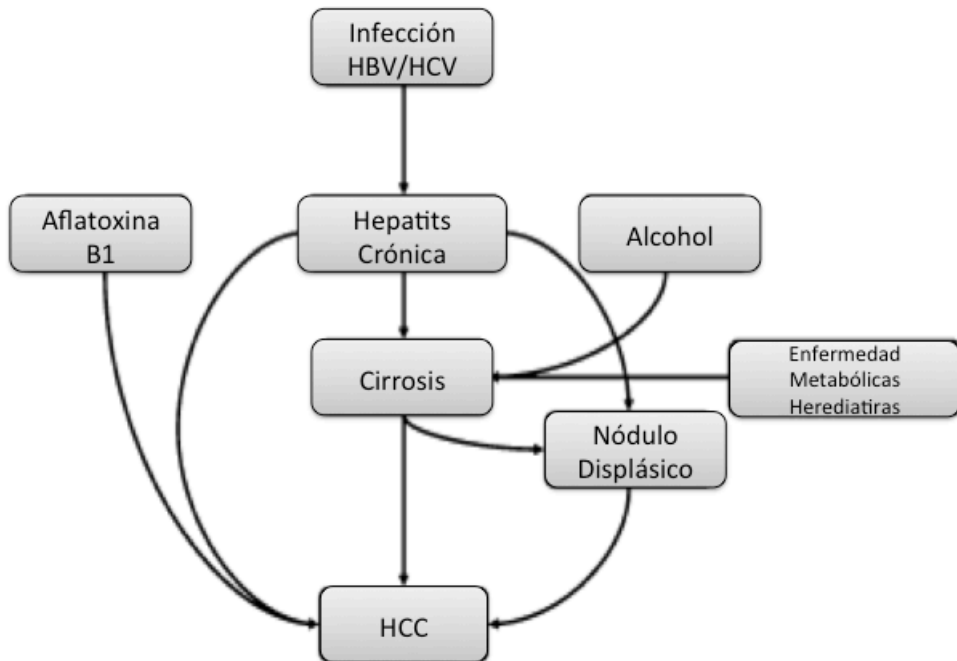


Figura 1. Hepatocarcinogénesis Multifactorial. En la mayor parte de los casos, el Carcinoma Hepatocelular (HCC) aparece debido que los pacientes presentan una enfermedad hepática crónica, como hepatitis crónica o cirrosis.

2.3 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS Y GENÉTICAS DURANTE LA HEPATOCARCINOGENESIS

La carcinogénesis es un proceso continuado en el cual se producen una acumulación de anormalidades cromosómicas, genéticas y epigenéticas que son capaces de conducir al mal funcionamiento de la célula. Evidencias recientes sugieren que la inestabilidad cromosómica aparece en un estadio temprano y se acumula durante la hepatocarcinogénesis, dando como resultado

la adquisición de un fenotipo tumoral. Estudios realizados de pérdida y ganancia cromosómicas, en tejidos que presentaban displasia nodular, reflejaron un patrón muy similar de alteraciones observadas también en HCC [24]. Este hecho parece indicar que la displasia nodular es una lesión precancerosa en el proceso de hepatocarcinogénesis [25].

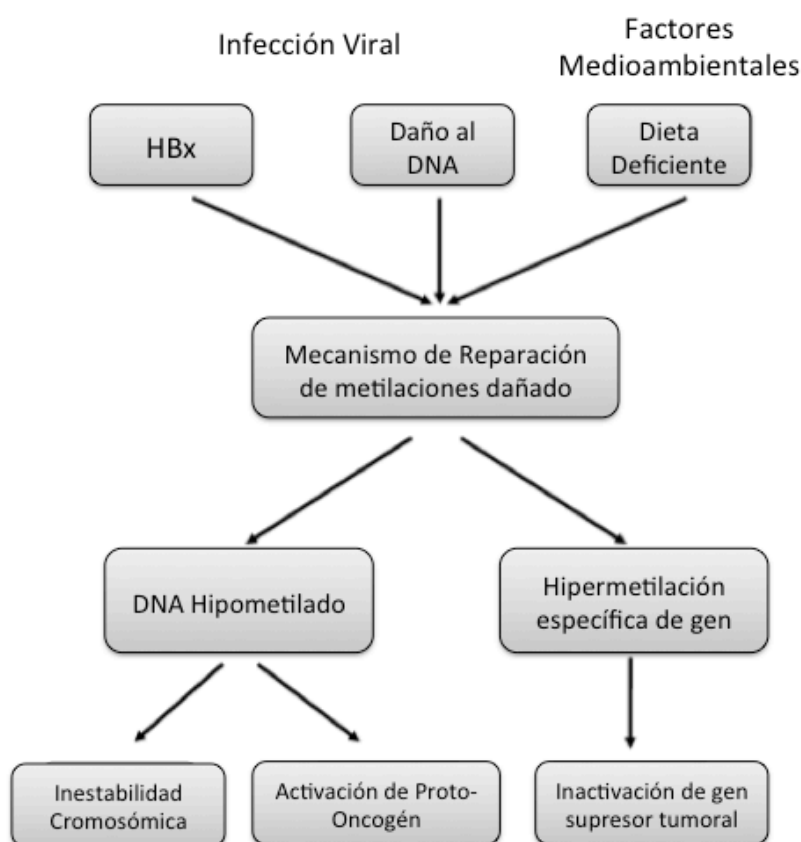


Figura 2 .Alteraciones Epigenéticas en HCC. El mal funcionamiento de la maquinaria de metilación del ADN causada por una infección viral u otros factores medioambientales, puede conducir a una hipometilación global del ADN y la hipermetilación específica de genes. Esta situación, puede resultar además en inestabilidad cromosómica, en la activación de oncogenes y el silenciamiento de genes supresores de tumor en el Hepatocarcinoma humano

2.4 ALTERACIONES EPIGENÉTICAS DURANTE LA HEPATOCARCINOGENÉISIS

Además de las alteraciones genéticas, distintas evidencias indican que las alteraciones epigenéticas juegan un papel importante en la carcinogénesis. Se denominan alteraciones epigenéticas a cambios heredables de la metilación del ADN y modificaciones de las histonas asociadas que modifican, de manera estable, la transcripción génica pero no la secuencia del ADN. Estas modificaciones parecen jugar un papel importante siendo esenciales para el desarrollo y la diferenciación [26]. Las más frecuentes están relacionadas con la metilación de las citosinas [27]. En mamíferos esta modificación se encuentra en los elementos CpG repetitivos o ligados a un promotor, siendo los más importantes aquellos que resultan en la inactivación del promotor, como ocurre en el HCC con los genes que codifican para la proteína del retinoblastoma (RB) y para p16 [28,29]. Otra alteración epigenética frecuente en el HCC es la hipermetilación que se encontrado en otros genes supresores de tumor que regulan distintas vías celulares en HCC como son E-cadherina [30], Familia del Dominio de Asociación a Ras (RASSF1A) [31], Glutatiión S-transferasa pi-1 (GTSP1) [32], Supresor de la Señalización de Citocinas (SOSC-1) [33], Proteína Soluble Asociada a Frizzled-1 (SFRP1) [34] y Homólogo a la Tensina y al Fosfato (PTEN) [35].

Distintos estudios revelan que la metilación del ADN que codifica para genes supresores de tumor en un proceso temprano durante la hepatocarcinogénesis y también puede encontrarse en tejido hepático no tumoral [36-38] hallándose incrementada a medida que el tumor se va desarrollando pasando por los estadios previos al mismo [39,40].

En células de mamífero la metilación del ADN se establece y mantiene debido a la existencia de unas enzimas denominadas

ADN metiltransferasas (DNMTs) DNMT3A y DNMT3B. Una tercera enzima de este tipo es la denominada DNMT1 encargada únicamente del mantenimiento de las metilaciones [41-43]. Diversos investigadores han puesto de manifiesto la existencia de la sobreexpresión de estas tres enzimas en HCC [44].

2.5 CICLO CELULAR

El ciclo celular es un proceso complejo por el cual una célula completa una serie ordenada de acontecimientos que culmina originando dos células hijas iguales. Para que dicho proceso tenga lugar, es necesario que la célula pase por las distintas fases del ciclo a saber, G_1 (gap 1), S (síntesis), G_2 (gap 2) y M (mitosis), conociéndose en conjunto G_1 , S y G_2 como interfase.

El ciclo celular es un proceso altamente especializado y controlado, existiendo tres puntos de control en el mismo, durante el establecimiento de la fase S, a la entrada y a la salida de mitosis [45].

Cuando una célula se halla en fase G_1 , dependiendo de las señales externas e internas que reciba, puede comprometerse y continuar el ciclo o por el contrario entrar de forma temporal o permanente en una fase denominada G_0 o de quiescencia. En general las señales extracelulares afectan a esta decisión solamente hasta que la célula llega al denominado punto de restricción. Es en este momento donde la progresión a lo largo del ciclo celular pasa a ser controlada únicamente por la maquinaria proteica del ciclo celular.

La progresión a través del ciclo celular está controlada por activación e inactivación de quinasas dependientes de ciclinas

(CDK), que desencadenan la transición a las siguientes fases del ciclo. Estas proteínas CDKs son proteínas quinasas específicas de serina/treonina que requieren la asociación con una ciclina para su activación. Para poder controlar la progresión del ciclo a través de las CDKs, estas proteínas están sometidas a una estricta regulación, como la expresión y destrucción de las ciclinas asociadas, activación y desactivación por fosforilación y defosforilación respectivamente., y expresión de proteínas inhibidoras que se asocian a las CDKs o al complejo ciclina CDK [46].

2.5.1 CDKs y ciclinas

La actividad de las CDKs requiere la unión de una proteína reguladora denominada ciclina. Las ciclinas se sintetizan y se destruyen en determinados momentos durante el ciclo celular, haciendo que las CDKs estén activas solo temporalmente [47]. De todas las ciclinas existentes, solo unas pocos complejos ciclina-CDK están involucrados en el control del ciclo [48]. Entre estas proteínas, están las tres CDKs de interfase (CDK2, CDK4 and CDK6), y de mitosis CDK (CDK1 también conocida como CDC) y diez ciclinas que pertenecen a cuatro diferentes clases (A, B, D y E). Durante la carcinogénesis es frecuente que se produzcan mutaciones que conduzcan a una desregulación de ciertos complejos ciclina-CDK, dando como consecuencia una proliferación continuada o una reentrada no programada en el ciclo celular [49].

Las señales que inducen proliferación y mitosis, son capaces en última instancia de inducir la expresión de las ciclinas de tipo D (D1, D2 and D3) que preferencialmente unen y activan CDK4 y CDK6 durante la fase G₁ durante la cual la célula se va a preparar para iniciar la síntesis de ADN [49]. La activación de estos complejos conduce a la inactivación parcial de la familia de proteínas RB (RB, p107 y p130), permitiendo la expresión de las ciclinas E (E1 y E2) que unen y activan CDK2 [50]. El complejo

CDK2–ciclina E fosforila a estas proteínas de la familia RB dando lugar a su inactivación total [50,51]. La disponibilidad de las ciclinas E durante el ciclo celular está estrechamente controlada y limitada hasta los primeros estadios de la síntesis de ADN, siendo este complejo esencial para controlar la transición entre G₁ y S [52]. Más tarde CDK2 es activada por la ciclina A, en los estadios tardíos de la replicación del ADN para conducir la transición entre la fase S y mitosis, periodo conocido como fase G₂. Finalmente la CDK1 es activada por la ciclina A, al final de la interfase para facilitar el establecimiento de la mitosis. Tras la destrucción de la membrana nuclear, la ciclina A se degrada, facilitando la formación de los complejos CDK1 ciclina B responsables de la conducción de la célula a través de la mitosis [47]. Así, cada fase del ciclo es llevada a cabo por CDKs específicas, existiendo distintos niveles de regulación para controlar la proliferación de los distintos tipos celulares, existiendo además otros tipos de regulación. Como la fosforilación de sustratos específicos [53].

2.5.2 Proteínas Inhibidoras de CDKs (CKI)

La progresión a través del ciclo celular está regulada por las actividades coordinadas de los complejos ciclina-CDK. Estos complejos están regulados de manera muy importante por la unión a los inhibidores de CDKs (CKIs) [54]. Existen dos familias de CKIs: INK4 y Cip/Kip. La primera de ellas, INK4, está compuesta por las proteínas p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c, y p19INK4d, mientras que la familia Cip/kip está compuesta por las proteínas p21, p27 y p57 [47].

Mientras que la familia INK4 solo es capaz de unirse a la CDK4 y CDK6 e inhibir su actividad quinasa interfiriendo con la unión a las ciclinas de tipo D [55], la familia Cip/Kip es capaz de

unirse tanto a las ciclinas como a las CDK, modulando la actividad de los complejos ciclina-CDK [56]. Así, la familia INK4 solo funciona durante la fase G₁, mientras que la familia de proteínas a la que pertenecen p21, p27 y p57 es capaz de funcionar durante todo el ciclo celular no estando restringido solamente a la fase G₁.

Las proteínas de la familia Cip/Kip, principalmente p21 y p27, también pueden ser reguladas por fosforilación, produciendo modificaciones en su localización y en su afinidad por complejos específicos ciclina-CDK. Dichas fosforilaciones también han sido relacionadas con la estabilización o inducción de la destrucción de p21 y p27; así por ejemplo, la fosforilación de p21 en Thr 145 y Ser 153 es capaz de inducir la retención citoplásmica de p21 [57-60].

Además, las proteínas de la familia Cip/Kip también son capaces de modular la progresión del ciclo celular, independiente de los complejos ciclina-CDK, a través de la inhibición de componentes de la maquinaria de replicación, siendo capaz p21 de unirse al antígeno de proliferación nuclear (PCNA), proteína cuya función principal es dar procesividad a la ADN polimerasa, lo que bloquea la síntesis de ADN [61]. Otro CKI de la misma familia, p57 también es capaz de unirse a PCNA bloqueando la replicación del ADN [62]. Aunque el tercer miembro de la familia, p27 no se ha demostrado que sea capaz de unirse a PCNA, puede bloquear la replicación por medio de la inhibición de la proteína mantenimiento de minicromosomas 7 (MCM7), subunidad de la helicasa de la horquilla de replicación [63].

Las CDK4 y CDK6, ambas CDKs correspondientes a la fase G₁, tienen un sustrato principal que es RB [64,65]. En células en proliferación, a medida que el ciclo progresa, la CDK4 forma complejos con ciclina D y p27 o p21, siendo p27 liberado de los complejos CDK2 ciclina E y CDK2 ciclina A por los complejos DK4 ciclina D, evento que hace que se produzca la activación del par

ciclina E CDK2 y ciclina A-CDK2. Así, el complejo ciclina E-CDK2 fosforila por un lado a p27, promoviendo su degradación, y por otro a RB lo que permite la progresión del ciclo hacia la fase S [66]. La unión directa de las proteínas CDK4 y CDK6 a la familia de proteínas INK4 bloquea los complejos catalíticamente activos de ciclina D-CDK [67]. Cuando existe una elevada expresión de proteínas de la familia INK se observa la parada del ciclo celular en G₁, siendo éste dependiente de la existencia de RB funcional [68].

Por otro lado p19 no es capaz de unir CDKs, pero interacciona con mdm2 siendo capaz de conducir a la parada del ciclo en G₁ y G₂ [69-72]. Tal interacción conduce a la relocalización de mdm2 mediada por estabilización de p53, desde el núcleo al nucleólo [71,73].

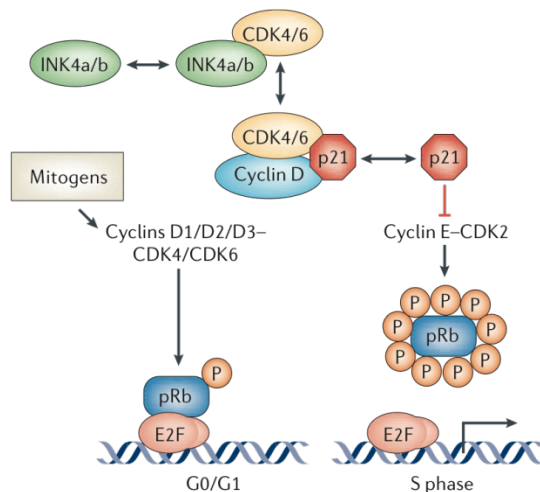


Figura 3. Control de la progresión del ciclo celular entre fase G₀/G₁ y fase S. Los mitógenos inducen la asociación de las ciclinas con sus respectivas CDKs induciendo la fosforilación de RB para la síntesis de proteínas necesarias para la fase S. Distintos CKIs se pueden asociar a las CDKs o a los complejos CDK-ciclina evitando su acción y la progresión del ciclo.

2.5.3 La vía de señalización RB/E2F

El denominado punto de restricción, o punto de no retorno, es un momento determinado presente en fase G_1 , previo a entrada en fase S, donde las células una vez cruzado este punto son insensibles a cualquier estímulo externo para completar el ciclo celular. Este punto es vital para las funciones normales de la célula como van a ser la diferenciación y la homeostasis, estando descontrolado en prácticamente todos los tumores humanos [74].

En este punto juega un papel clave el tándem formado por las proteínas RB y E2F [75]. De esta forma, una vez que la existencia de estímulos mitóticos es suficiente, E2F se mantiene activado independientemente de estímulos adicionales actuando como factor de transcripción. En cuanto al otro miembro del tándem, la proteína del retinoblastoma (RB), esta familia de proteínas en mamíferos está compuesta por tres miembros, RB/p105, p107 y RB2/p130. Todas estas proteínas son capaces de unirse a los factores de transcripción E2F, estando su actividad controlada por fosforilaciones, de modo que la fosforilación inactiva a las proteínas de la familia RB impidiendo la unión de los factores de transcripción E2F [76]. La sobreexpresión de cualquier miembro de la familia RB tiene como consecuencia la parada del ciclo en G_1 [77,78].

Aunque cualquier miembro de la familia es capaz de unir factores de transcripción de la familia E2F, RB une específicamente E2F1, además p107 y p130 son capaces de unirse también a ciclinas e inhibir la actividad del complejo ciclina-CDK [79,80]. La fosforilación de RB se lleva a cabo por el complejo ciclina D-CDK4 o ciclina D-CDK6 durante la fase G_1 temprana y media, y por al complejo ciclina E-CDK2 en G_1 tardía; siendo en el primer caso primero influida por las señales mitóticas mientras que el segundo es independiente de las mismas [50,81]. Mientras RB está en su

estado hipofosforilado, inactivo, está asociado junto con los factores E2F bloqueando la capacidad de este factor de transcripción de activar la expresión de los genes necesarios para la progresión a fase S. La proteína RB es responsable de la represión de la transcripción génica necesaria para la transición entre la fase G₁ y la fase S, debido a que cuando está unida a la proteína E2F forma un complejo que bloquea los promotores de dichos genes. Junto con esta función es capaz de reprimir la transcripción modificando la estructura de la cromatina a través de la interacción con proteínas tales como hBRM, BRG1, HDAC y SUV39H1, involucradas en la remodelación de nucleosomas, acetilación/deacetilación de histonas y metilación respectivamente [82].

Finalmente, es necesario indicar que la familia de proteínas RB además puede participar en la regulación de la transición G₁-S a través de mecanismos independientes de E2F. Así, p107 y p130 son capaces de unirse e inhibir los complejos ciclina E-CDK2 y ciclina A-CDK2, e incrementar la tanto la transcripción como la estabilidad de p27 [83].

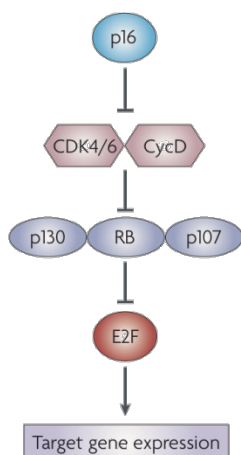


Figura 4. Interacciones entre reguladores de la progresión hacia la fase S del ciclo, iniciando mecanismos conservados y vías de señalización

2.5.4 Fosforilación Positiva y Negativa de CDKs

La actividad de los complejos ciclina-CDK también es controlada por mecanismos de fosforilación y defosforilación, habiendo sido descrito que se mantienen inactivos por la fosforilación de residuos cruciales para su actividad llevada a cabo por las quinasas WEE1 y MYT1 [47]. La activación del complejo, cuando es necesario, la realiza una familia de fosfatasas denominada CDC25 que elimina tales fosforilaciones, activando el complejo ciclina-CDK. Además, es necesaria la actividad de la denominada quinasa activadora de CDK (CAK) que fosforila al complejo con objeto de lograr su mayor actividad [84].

No todas estas proteínas funcionan durante todo el ciclo, en concreto la familia de fosfatasas cdc25 está implicada en el control de las transiciones celulares hacia fase S [85,86] y hacia mitosis. En la primera transición, realiza la activación de los complejos CDK2–ciclina E y CDK2–ciclina A. En la transición de fase G₂ a mitosis la familia cdc25 se encarga de la activación del complejo CDK1-ciclina B [87-90].

Mientras que las fosfatasas de la familia CDC25 funcionan tanto en G₁ como en G₂, el papel principal que ejerce la quinasa Wee1 está situado en la entrada en mitosis, ya que es capaz de fosforilar al complejo ciclina B-CDK1 evitando la entrada en mitosis [91].

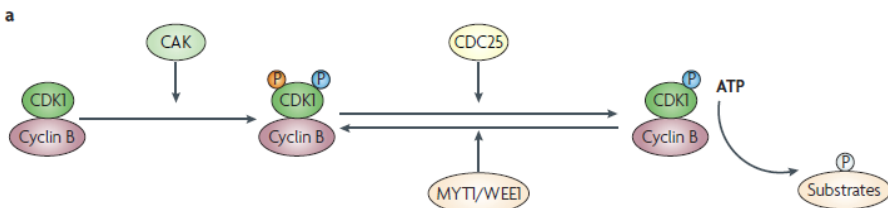


Figura 5. Regulación mediante fosforilación de los complejos CDK-ciclina

2.5.5 Degradación Proteica

Como ya hemos indicado anteriormente la regulación de las CDKs juega un papel importante en la progresión del ciclo celular, siendo su actividad dependiente de la unión y disponibilidad de la ciclina correspondiente, además de la expresión de un CKI específico [92]. Esto se debe tanto a la síntesis y como a la degradación (proteólisis) constante de las ciclinas, siendo este último proceso ejecutado por el sistema del ubiquitina-proteasoma (UPS) [93].

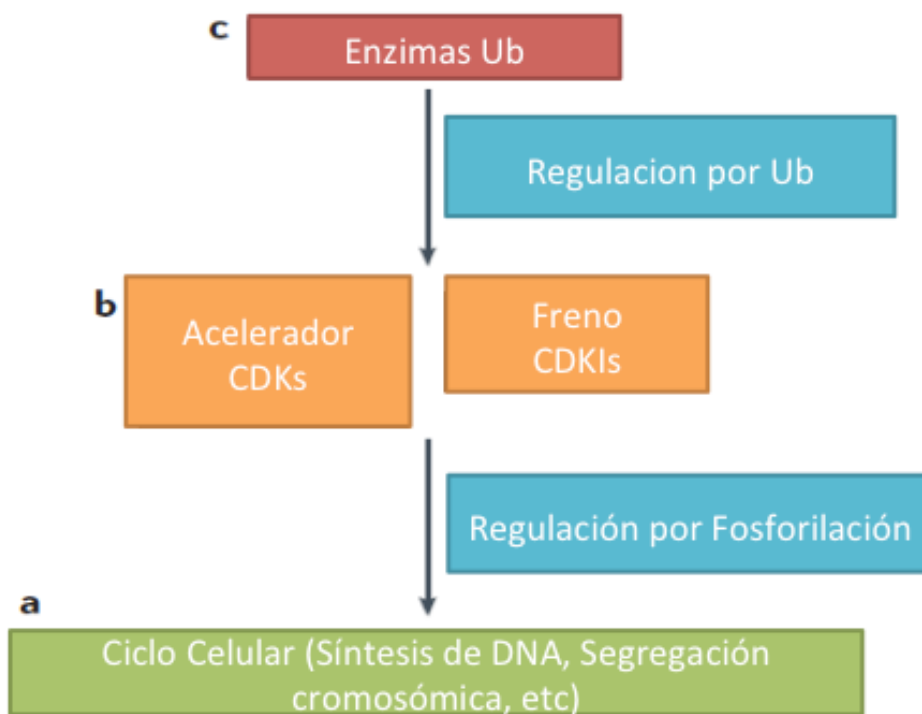


Figura 6 El control del ciclo celular puede ser descrito como un proceso en tres pasos. Los fenómenos inmediatos (a) controlados por fosforilaciones, El movimiento a través del ciclo (b) depende de la actividad de CDKs y se reprime por medio de CKI. Las proteínas del ciclo se controlan mediante degradación por unión de Ub (c).

Además de las ciclinas, los CKIs también son marcados para la destrucción por el sistema UPS, estando el ciclo regulado por modificaciones debidas a fosforilación e ubiquitinación. Este sistema tiene lugar en dos pasos: inicialmente se produce la unión covalente de múltiples moléculas de ubiquitina al sustrato proteico, marcándose éste para su destrucción, para a continuación proceder a la degradación de la proteína marcada, realizada por el complejo 26S del proteasoma [94] La unión de múltiples moléculas de ubiquitina está mediada por tres enzimas: enzima activadora de ubiquitina (E1), enzima conjugadora de ubiquitina (E2) y la ubiquitina ligasa (E3).

El componente E3 dentro del UPS se cree que es responsable del reconocimiento de proteínas diana [94]. Dos tipos de este componente E3, el primero denominado complejo SKP1–CUL1–F-box-protein (SCF) 8 y el segundo, llamado complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C), son los más importantes en lo que a regulación del ciclo se refiere [95,96]. El complejo SCF está formado por tres componentes: RBX1 (*RING-finger protein*), CUL1 (*scaffold protein*), y SKP1 (*adaptor protein*) además de un componente denominado F-box responsable del reconocimiento del sustrato. En cuanto al APC/C, estructuralmente es similar al SCF, estando formado por los componentes del núcleo APC11 (RBX1-related RING-finger protein), APC2 (CUL1-related scaffold protein) entre otros además del componente variable, denominado activador, que confiere la especificidad de sustrato [95,96].

Las funciones del SCF y APC/C son distintas, debidas al tiempo en el que actúa cada complejo E3, siendo el APC/C activo desde anafase hasta el final de fase G₁, mientras que el SCF funciona principalmente en la transición entre G₁ y S, aunque es activo desde G₁ tardía hasta mitosis temprana [97].

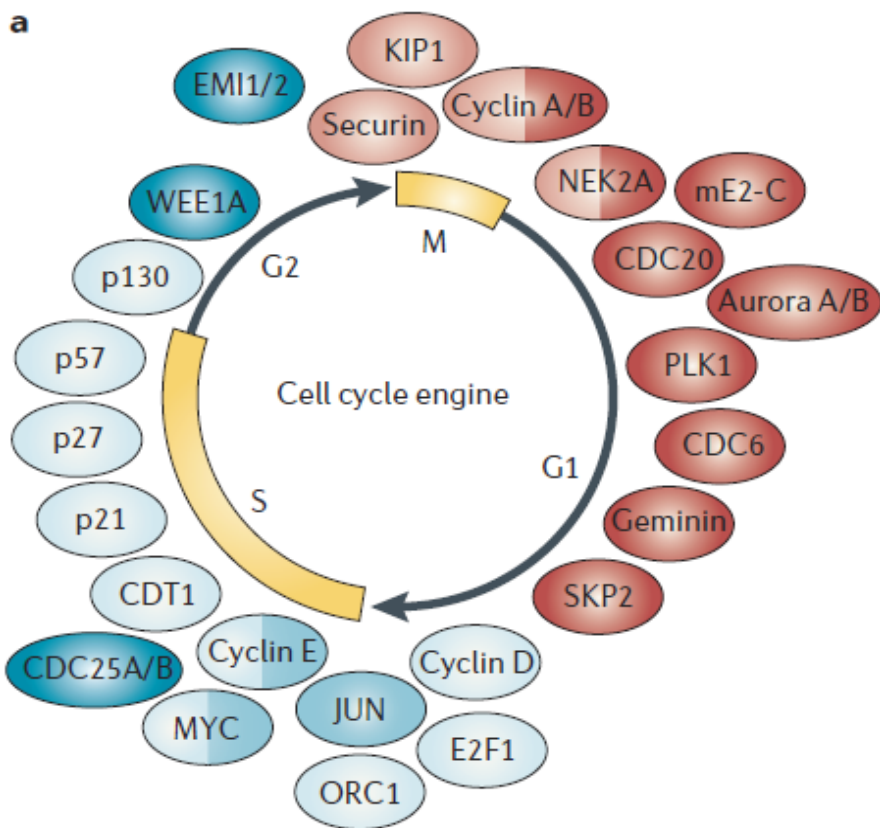


Figura 7. Los complejos SCF y APC/C funcionan en distintos estadios del ciclo El primero actúa desde G₁ tardía hasta fase M temprana, mientras que el complejo APC/C es activo desde fase M media hasta el final de G₁.

2.6 APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso conservado a lo largo de la evolución, un programa intrínseco de muerte celular que ocurre en distintas situaciones tanto fisiológicas como patológicas. Este proceso se caracteriza por cambios tanto bioquímicos como morfológicos, siendo estos la condensación nuclear, la contracción y fragmentación celular, entre otros [98]. Todo este proceso se produce para minimizar el daño de células vecinas y evitando una respuesta inmune innecesaria [99]. Producido el

desmantelamiento de la célula, los restos celulares son eliminados por células fagocíticas [100]. En todo este proceso de muerte celular juega un papel importante una familia de serín-treonín proteasas denominadas caspasas [101,102] que procesan distintos sustratos, tanto en el citoplasma como en el núcleo celular, dando lugar a la mayoría de los cambios morfológicos que tienen lugar en el proceso de apoptosis [103]. La activación de las caspasas puede ser iniciada desde el exterior de la célula, a través de la activación de receptores, o desde la mitocondria, existiendo así dos vías de apoptosis, la extrínseca (vía de los receptores) y la intrínseca (vía mitocondrial) [98].

2.6.1 Vía extrínseca o de los receptores

La vía extrínseca puede ser activada a través de los receptores de muerte (death receptors) de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) tales como el receptor CD95 (APO-1/Fas) o el receptor de TRAIL (apoptosis inducida por ligando relacionada con el TNFA). La activación de cualquiera de los dos receptores resulta en la agregación y el reclutamiento de una molécula adaptadora denominada FADD (Proteína asociada a Fas con Dominio de Muerte) [104].

Los TNFR son una superfamilia de genes con más de 20 miembros que presentan un gran rango de acciones biológicas entre las que se encuentran la regulación de la muerte celular, supervivencia, diferenciación o control inmune [105,106]. Los receptores involucrados en la apoptosis comparten todos ellos un dominio intracelular denominado dominio de muerte (DD Death domain) que tiene un papel crucial en transmitir la señal desde la superficie celular hasta las vías de señalización dentro de la célula. Los mejor caracterizados son CD95 (APO-1/Fas), TNF receptor 1

(TNFRI), (TRAIL-R1) y TRAIL-R2 [105,106]. Los correspondientes ligandos de la familia TNFR son tales como ligando CD95 (CD95L), TNF α , TNF β y TRAIL [105]. Una vez activado el receptor (CD95 L o TRAIL-R) se produce el reclutamiento de FADD mediada por el dominio de muerte del receptor. FADD a su vez es capaz de reclutar la caspasa-8 para formar el complejo DISC (complejo de señalización inducido por CD95) [107]. La unión de la caspasa-8 para formar el complejo DISC conduce al autoprosesamiento de la misma y a su activación. Así, la caspasa-8 activa las caspasas efectoras tales como la caspasa-3 [104].

2.6.2 Vía Intrínseca

En la vía intrínseca de la apoptosis, desencadenada en la mitocondria, la activación de las caspasas está ligada de forma muy estrecha a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa debido a miembros pro-apoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2 [108]. Distintos estímulos citotóxicos y señales pro-apoptóticas convergen en la mitocondria siendo capaces de inducir dicha permeabilización de la membrana mitocondrial externa [108,109]. Este proceso está regulado por miembros de la familia de proteínas Bcl-2, lípidos mitocondriales, proteínas que regulan el metabolismo energético y componentes del poro de transición mitocondrial [108]. La disrupción de la membrana mitocondrial externa conduce a la liberación al citoplasma de proteínas que normalmente se encuentran en el espacio intermembranal de la mitocondria. Entre estas proteínas podemos incluir: citocromo c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF (Factor inductor de apoptosis) y endonucleasa G [110]. Una vez en el citosol, estas proteínas pro-apoptóticas desencadenan la activación de las caspasas [110].

Uno de los más importantes mediadores mitocondriales de la apoptosis es el citocromo C. Esta proteína, una vez que es liberada en el citosol, es capaz de desencadenar la activación de la caspasa-3. La activación de la caspasa-3 se lleva a cabo a través de la formación de un complejo denominado apoptosoma formado por el propio citocromo c, Apaf-1 y la caspasa-9 [111]. La unión del citocromo c al apoptosoma conduce a la activación de la caspasa residente, la caspasa-9, que una vez activada va a reclutar y a procesar a la caspasa-3, convirtiéndola en caspasa 3 activa [112]. En este estado, la caspasa-3 es capaz, a su vez, de procesar sustratos clave en la célula, siendo capaz de inducir muchos de los cambios bioquímicos y celulares de la apoptosis.

2.6.3 Smac/DIABLO.

Como ya hemos indicado anteriormente, además del citocromo c también se liberan de la mitocondria otras proteínas, tales como Smac/DIABLO y Omi/HtrA2, capaces de facilitar la activación de las caspasas, ya que neutralizan inhibidores endógenos de las caspasas, las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs).

Brevemente podemos indicar que Smac es una proteína mitocondrial de 23 kDa que es tiene un dominio capaz de unirse a las IAPs [113,114]. Esta proteína se ha demostrado que es capaz de unirse a otras tales como XIAP, cIAP1, cIAP2, survivina y Apollon, siendo todas ellas IAPs [115].

Omi/HtrA2 es otra proteína mitocondrial que se encuentra en el espacio intermembranal de la mitocondria y juega un papel clave en la regulación de la homeostasis mitocondrial [110]. Tras la liberación de Omi/HtrA2 de la mitocondria, hasta el citosol,

promueve la apoptosis ya que es capaz de inhibir a las IAPs [110]. La existencia de moléculas capaces de inhibir IAPs hace que exista un equilibrio dinámico entre los efectores pro- y anti-apoptóticos permitiendo a la célula la existencia de un limitado daño mitocondrial en el que los IAPs puedan bloquear la activación de caspasas iniciada por la liberación del citocromo c , aunque si el daño mitocondrial es más grave o afecta simultáneamente a muchos de estos orgánulos, las proteínas pro-apoptóticas superan y se imponen sobre las anti-apoptóticas, (IAPs superadas por concentraciones citosólicas mayores de sus antagonistas como Smac y Htra2), neutralizándolas por unión directa [104].

2.6.4 Proteínas de la familia Bcl-2.

Los miembros de esta familia de proteínas se han clasificado en tres clases. En la primera de ellas, con función anti-apoptótica, se incluyen las proteínas BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL1, BCL-B. La segunda de las clases es pro-apoptótica y a ella pertenecen las proteínas BAX, BAK y BOK. Una tercera clase de la familia Bcl-2 se denomina clase de BH3-only proteins donde encontramos BAD, BIK, BID, HrK, BIM, BMF, NOXA y PuMA. Las proteínas de esta última clase contienen un dominio que les da nombre, dominio BH3, que es capaz de unir y regular a las proteínas anti-apoptóticas de la familia y conducir a la muerte celular. Por otro lado los miembros pro-apoptóticos de la familia, BAX y BAK son muy importantes, ya que son capaces de inducir la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, con la consiguiente liberación de moléculas pro-apoptóticas de la mitocondria, conduciendo a la activación de las caspasas [116].

Los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 (Bcl2, Bcl-xL y Bcl-w) son capaces de inhibir la apoptosis en diferentes

situaciones. Mientras que Bcl-2 es una proteína integral de membrana, Bcl-w y Bcl-xL se asocian estrechamente a la membrana tras la exposición a una señal citotóxica. Existen evidencias recientes de que cada tipo celular requiere la protección de al menos un miembro anti-apoptótico de la familia Bcl-2, siendo la abundancia de este tipo de proteínas las que regulan la homeostasis del tejido. Así mientras que la sobreexpresión de Bcl-2 es una de las causas de que las células hematopoyéticas sean insensibles a diversos estímulos citotóxicos, por el contrario la inactivación de los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 aumenta la muerte celular en distintos tipos celulares, debido al balance con los miembros pro-apoptóticos [117-120].

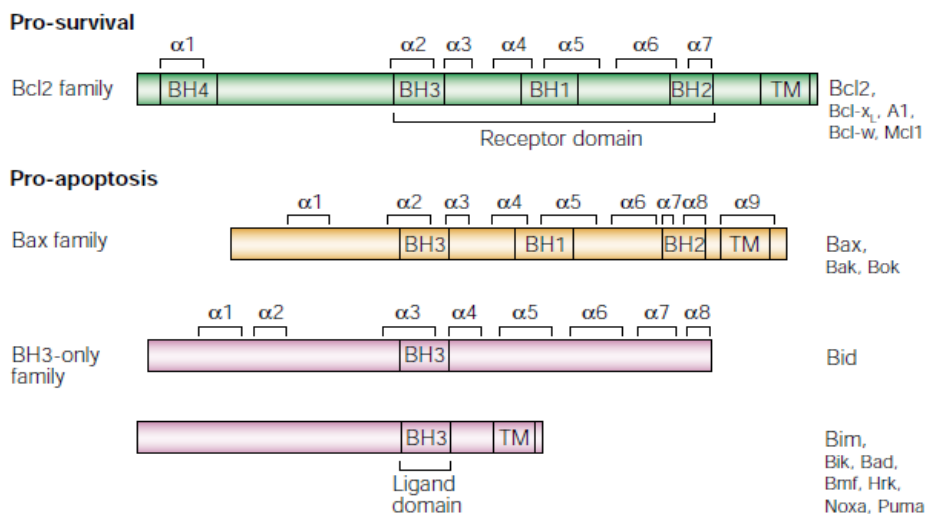


Figura 8. Tres subfamilias de proteínas Bcl-2. Conocidas como regiones hélice alfa están indicadas, como las cuatro regiones (BH1-4) que son las regiones más conservadas entre los miembros de la familia. La mayoría de los miembros tienen un dominio carboxi-terminal hidrófobo que ayuda a la asociación con membranas intracelulares, siendo las excepciones A1 y la mayoría de las proteínas BH3-only. Muchos otros homólogos multidominio han sido descritos pero su función no está todavía clara.

2.6.5 The BH3-only tribe.

Las proteínas denominadas BH3-only son aquellas capaces de desencadenar apoptosis en respuesta a programas de desarrollo o daño intracelular [121]. Estas proteínas se cree que actúan, uniéndose y neutralizando a los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, para lo cual necesitan el concurso de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak [122,123].

De forma individual, estas proteínas están presentes en distintos mecanismos celulares, así Bim y Bmf están secuestradas unidas a la dineína, que a su vez está asociada con los microtúbulos (Bim) y el citoesqueleto de actina (Bmf) [124,125].

2.6.6 La familia Bax

Los miembros de esta familia son Bax y Bak, su represión por separado en la célula no tiene un gran efecto, pero la inexistencia simultánea conduce a la inactivación de la apoptosis en muchos tejidos, siendo su presencia esencial para la apoptosis en la mayoría de tipos celulares [123,126,127].

Bax es una proteína monomérica que se encuentra en el citosol en células sanas, pero cuando la apoptosis se activa cambia su conformación, oligomeriza y se integra en la membrana mitocondrial externa [128-131]. Por otro lado Bak es una proteína oligomérica integral de membrana mitocondrial, y cuando se activa el mecanismo apoptótico es capaz de formar agregados de mayor tamaño molecular mediante un mecanismo aún no claramente elucidado [129,130,132,133].

Se cree que tanto los polímeros de Bax como de Bax provocan o contribuyen a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, permitiendo la salida de proteína proapoptóticas aunque el mecanismo todavía es causa de controversia existiendo distintos modelos [134].

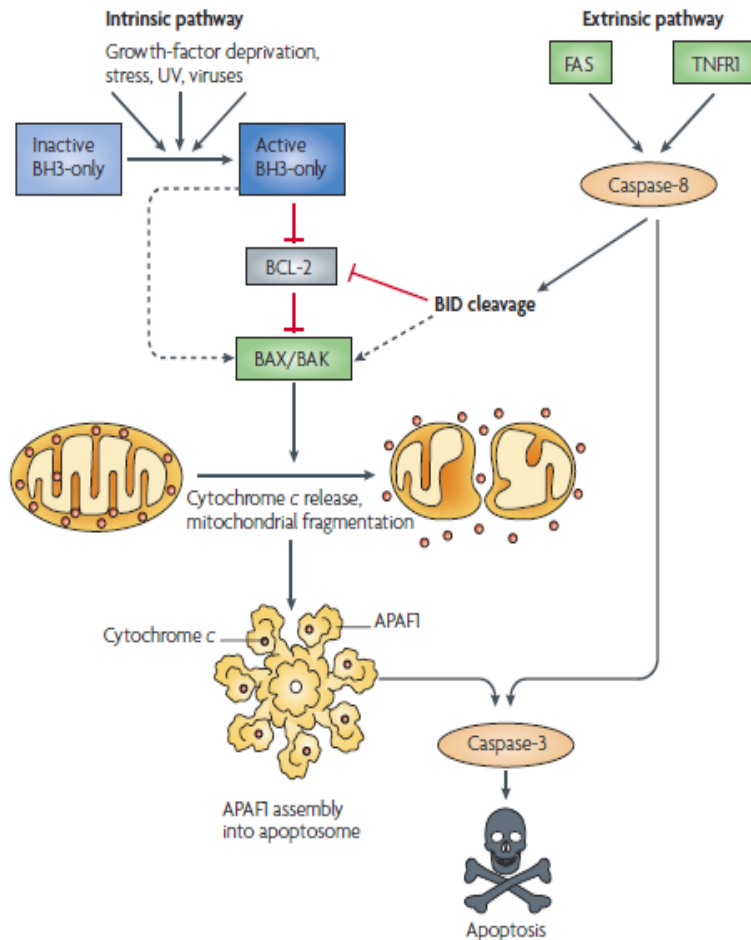


Figura 9. Esquema de la inducción de la apoptosis intrínseca y extrínseca. La apoptosis puede ser inducida desde receptores de superficie, o por diversos agentes genotóxicos o metabólicos.

2.6.7 Apoptosis, AKT y MAPK

Existen distintas vías de señalización que son capaces de influir en la proliferación y apoptosis celular. Una de ellas es la denominada Proteína quinasa B (PKB/AKT). Esta proteína puede conducir a la transformación oncogénica cuando se sobreexpresa, teniendo como resultado la supresión de la apoptosis y el incremento de la proliferación [135]. La supresión de la apoptosis por la activación de AKT parece relacionada con distintas proteínas de la familia Bcl-2, siendo capaz de fosforilar a Bad y Bax, lo neutraliza su actividad pro-apoptótica y evita su interacción con Bcl-2, [136,137] induciendo además a esta última proteína anti-apoptótica [138,139].

Respecto a las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), son una familia de proteínas capaces de regular distintos procesos celulares, entre los que podemos citar la proliferación, diferenciación y apoptosis [140]. A esta familia de proteínas pertenecen las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2), las quinasas terminales c-Jun (JNK 1-3) y las quinasas P38 (α , β , γ y δ). Mientras que la activación de ERK 1/2 está involucrada en respuestas celulares, tales como la supervivencia y proliferación celular [140,141], la inducción de JNK y P38 está asociada con la apoptosis [142,143]. Uno de los factores implicados en las funciones de ERK 1/2, es la activación de miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 [141]. Por el contrario, la relación de P38 y JNK con las proteínas de la familia Bcl-2 es diferente, siendo estas quinasas capaces de activar a la pro-apoptótica Bax y la posterior inducción del proceso de muerte celular [136].

2.7 STAT3 Y CITOCINAS

Las condiciones inflamatorias del microambiente que rodea al tumor pueden iniciar o promover la transformación tumoral [144]. La inflamación asociada al cáncer está determinada por la presencia de células inflamatorias específicas y mediadores inflamatorios entre los que se incluyen citocinas y quimiocinas. Hallazgos recientes sugieren un papel clave a la familia de proteínas Transductores de Señal y Activadores de la Transcripción (STAT), especialmente de STAT3, capaz de mantener e inducir un microambiente pro-carcinogénico inflamatorio [144-152].

STAT3 está ligada a la inflamación asociada a la tumorigénesis inducida por alteraciones genéticas en células malignas [153-156] o por factores medioambientales [147-151,153-166]. Esta proteína no solamente están activada de forma constitutiva en células tumorales, siendo esencial para la transducción de señales al núcleo inducida por estímulos extracelulares, sino que además funcionan como factor de transcripción nuclear que puede regular genes involucrados en la proliferación, supervivencia, angiogénesis, invasión, además de genes que codifican mediadores pro-inflamatorios [167-172].

Aunque STAT3 es una proteína normalmente asociada a la proliferación y supervivencia de las células neoplásicas, también se ha demostrado que puede mediar efectos anti-cancerígenos. De esta manera puede tener un papel anti-tumoral ya que es capaz de inducir el incremento de P21 [173], que se puede además ver reflejado en la disminución de la actividad CDK, que puede conducir a la parada del ciclo celular [174].

Existen importantes interacciones de STAT3 con NF- κ B a distintos niveles como se puede observar en la figura 10 [145,146,150,175-178]. En las células tumorales STAT3 interactúa

directamente con el miembro de la familia NF- κ B RELA (p65), reteniéndolo en el núcleo y contribuyendo a la activación del NF- κ B [179]. STAT3 y NF- κ B, además, co-regulan numerosos genes oncogénicos y pro-inflamatorios [169-171,177]. Por todo ello, no sorprende que muchos mediadores inflamatorios codificados por genes que se transcriben en respuesta a NF- κ B sean activadores de STAT3 [145,146,150,175-178].

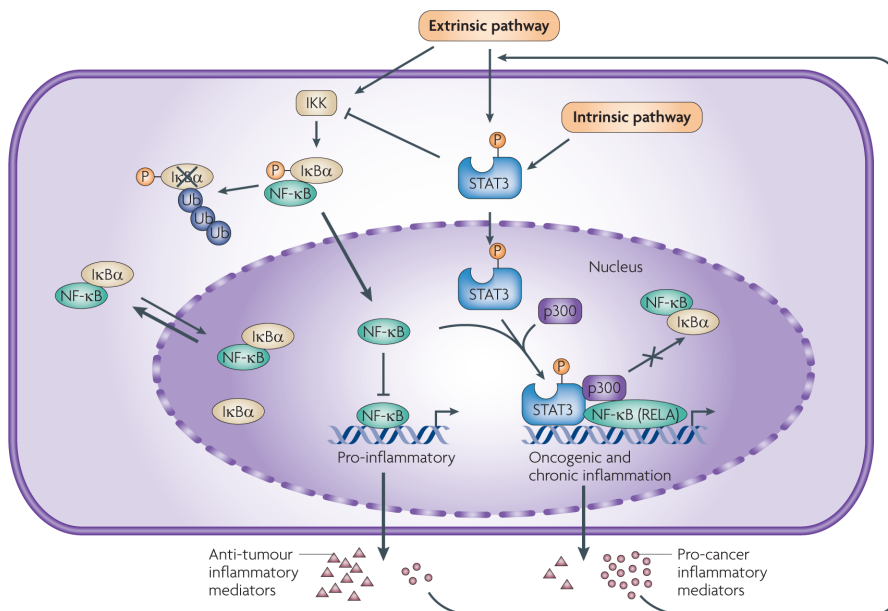


Figura 10. Interacciones a distintos niveles entre los factores de transcripción STAT3 y NF- κ B.

En cuanto al factor de transcripción STAT3, se ha descrito que es capaz de regular, IL-1 β mediada por la estimulación de LPS. La inhibición de STAT3 seguida por la estimulación celular con LPS es capaz de inhibir la expresión de IL-1 β . En el caso del TNF α , la inhibición de STAT3 no es capaz de evitar la producción de TNF α mediada por LPS [162].

Los factores de transcripción STAT3 y NF-κB tienen roles integrados en la respuesta inflamatoria que promueven el desarrollo tumoral y el crecimiento del mismo [145-151,167-170,179-182]. De todas maneras, NF-κB no solamente está involucrado en la inflamación pro-carcinogénicas sino también en las respuestas anti-tumorales [144,168,170,179]. STAT3, por el contrario mantiene las condiciones inflamatorias pro-carcinogénicas y simultáneamente suprime la respuesta inmune anti-tumoral [170,182-184]. Parece llamativo, que ambos, STAT3 y NF-κB estén a menudo activados en las mismas células tumorales. Ambas proteínas inducen la expresión de un gran repertorio de genes que codifican para factores proliferativos, anti-apoptóticos, angiogénicos y metastásicos promoviendo el crecimiento y desarrollo tumoral [185]. Aunque mayoritariamente son genes de supervivencia, STAT3 puede tener un papel anti-tumoral ya que puede inducir la transcripción de P21, proteína que cuando se expresa en cantidades importantes es capaz de parar el ciclo celular [173].

2.8 PPI-2458 y METAP-2

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos capilares desde vasos preexistentes, que ocurre tanto en situaciones fisiológicas, como durante la formación de la placenta, como en situaciones fisiopatológicas como durante la reparación de tejidos dañados. La angiogénesis es un proceso altamente regulado en situaciones fisiológicas, que se puede hallar alterado en diversas patologías

En condiciones normales las células están situadas a una distancia media de entre 100 y 200 μM de los vasos sanguíneos lo que favorece el aporte normal de oxígeno. Cuando un organismo

multicelular crece, sus células inducen la angiogénesis, produciendo la formación de nuevos vasos sanguíneos hacia la zona de crecimiento que les permita tener un flujo constante de oxígeno.

En condiciones patológicas tales como el cáncer, el proceso de angiogénesis es necesario para que el tumor sobreviva y crezca. Esto es debido a que la hipoxia que se instaura cuando las células tumorales se encuentran a una distancia mayor de 100 μm del vaso sanguíneo más cercano, como resultado de su rápido crecimiento. En el caso de que el proceso angiogénico no se activase los tumores en formación quedarían limitados a un tamaño de 1-1,5 mm [186,187].

El establecimiento de la hipoxia en el tumor induce la expresión de factores pro-angiogénicos a través del Factor Inducible por Hipoxia α (HIF α), lo que puede llevar a un cambio a fenotipo angiogénico del tumor [188]. Este ambiente hipóxico en el tumor va a ser capaz de seleccionar células que sobrevivan en ausencia de disponibilidad normal de oxígeno [189,190].

En los capilares maduros, la pared del vaso está formada por células endoteliales, ancladas a una membrana basal, y una capa de células denominadas pericitos, que rodean parcialmente a las células endoteliales. Los factores pro-angiogénicos secretados por las células tumorales se unen a las células endoteliales e inician el proceso de angiogénesis. Una vez estimuladas las células endoteliales secretan distintas enzimas, principalmente proteasas y heparanasas, con objeto para destruir la membrana basal que circunda el vaso, así como la matriz extracelular. A este proceso también contribuyen las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) secretadas por las células tumorales [191]. Junto con los factores pro-angiogénicos secretados por las células tumorales también se induce la angiogénesis por la liberación de factores angiogénicos

desde la matriz extracelular al ser degradada [192]. Las uniones entre las células endoteliales estimuladas se relajan y emiten proyecciones hacia el nuevo espacio creado, creciendo estas proyecciones hacia la fuente del estímulo. Así, las células endoteliales invaden la matriz y empiezan a migrar y a proliferar en la masa tumoral. Una vez dentro, en la fuente del estímulo, las células se organizan formando estructuras tubulares y creando una membrana basal nueva para ganar estabilidad, formándose así el nuevo flujo sanguíneo en el tumor. La formación de la luz del tubo durante la canalización del nuevo flujo sanguíneo a establecer, está conducida por interacciones entre proteínas de superficie de las células y de la matriz extracelular, entre estas proteínas están oligosacáridos, galectin-2, PECAM-1 y VE-cadherina [193-195].

2.8.1 Estructura de la Vasculatura Tumoral

La estructura vascular normal se encuentra alterada en los tumores. Normalmente, los vasos tumorales se extienden siguiendo una organización tortuosa y con variaciones de diámetro. En estas condiciones se pueden observar vasos con un diámetro grande rodeados de una pared excesivamente fina, debido a que la membrana basal y el recubrimiento de pericitos es incompleto [196-198]. Esta estructura caótica puede deberse a un desequilibrio en los factores angiogénicos como el VEGF y las angiopoyetinas [199,200]. Además, los vasos tumorales tienen una alta permeabilidad, debido a la debilidad de las uniones entre las células endoteliales y a la membrana basal discontinua [196,197,201]. Tal permeabilidad de los vasos sanguíneos tumorales permite la extravasación de proteínas plasmáticas constituyendo una estructura provisional por la cual pueden migrar las células endoteliales.

2.8.2 Metionina aminopeptidasas

La traducción de proteínas en todas las células eucariotas empieza por el aminoácido metionina. Este aminoácido iniciador debe ser eliminado para que las proteínas sintetizadas *de novo* puedan liberarse del ribosoma, siendo para ello necesario la existencia en la célula de una metaloproteína, la metionina aminopeptidasa. Esta enzima además es capaz de participar en otras modificaciones cotraduccionales o postraduccionales [202].

Existen dos tipos de enzimas metionina aminopeptidasa (MetAP), la MetAP-1 y la MetAP-2. En los organismos procariotas solo existe uno de los dos tipos pudiendo ser la MetAP-1 o la MetAP-2, mientras que en las células eucariotas podemos encontrar ambas MetAP [203-206].

Experimentos realizados con *Saccharomyces cerevisiae* demostraron que la eliminación de cualquiera de las dos MetAP producía como resultado un fenotipo de crecimiento retardado, mientras que la delección de ambos genes producía un fenotipo letal, indicando que ambos tipos de MetAP tienen funciones redundantes pero esenciales en levaduras [207,208].

En cuanto a mamíferos, se ha descrito que ambas MetAP se expresan en todos los tejidos, siendo MetAP-1 la proteína dominante en la eliminación del residuo de metionina por el que comienza la traducción de todas las proteínas, mientras que es MetAP-2 la que lleva a cabo el procesamiento de un pequeño número de proteínas [209-211].

Aunque en otros organismos la función de la MetAP-1 está más clara, habiendo sido publicado que la delección de gen codificante para MetAP-1 ralentiza el crecimiento en levaduras como ya hemos indicado, en mamíferos el rol fisiológico de esta

enzima parece más difuso [212]. Así, en levaduras se ha demostrado que MetAP-1 es capaz de asociarse a la subunidad ribosomal 60S y al complejo 80S en presencia de ion magnesio (Mg^{2+}), mientras que en ausencia del mismo se asocia con la subunidad 40S [212].

En cuanto al gen humano de MetAP-1, se han realizado estudios que demuestran que la expresión del gen humano MetAP-1 en cepas de levaduras que carecen del gen MetAP-1 propio, de levaduras, es capaz de rescatar el fenotipo de crecimiento ralentizado, sugiriendo que MetAP-1 puede estar involucrado en el control del crecimiento [213]. De hecho, en mamíferos, en concreto en células endoteliales humanas de cordón umbilical, la delección del gen codificante para la proteína MetAP-1 es capaz de reducir la proliferación de las mismas hasta un 70%. Además la doble delección de MetAP-1 y MetAP-2 inhibe significativamente el crecimiento de dichas células siendo ambas proteínas esenciales [214]. Por otra parte, se ha establecido un papel de MetAP-1 durante la progresión del ciclo celular, siendo su inhibición causante de un retraso en la entrada en mitosis. Como ya hemos indicado previamente durante la transición de G_2 hacia mitosis las proteínas CDK1 y ciclina B forman un complejo ciclina CDK; sin embargo, en la salida de mitosis es crucial la inactivación de la CDK1, siendo para ello necesario la degradación de la ciclina B mediante un proceso llevado a cabo por MetAP-1 [215,216].

2.8.3 MetAP-2

En cuanto al segundo tipo de metionina aminopeptidasa, MetAP-2 en células eucariotas se identificó inicialmente como p67, debido a que era una proteína de 67 kDa, que estaba asociada al factor de iniciación 2 (eIF2). EIF-2 es una proteína compuesta por

tres subunidades (α , β , γ), habiendo sido relacionada la fosforilación de la subunidad α con la reducción en la síntesis de proteínas [217]. Tal inhibición de la traducción de proteínas conduce al bloqueo de distintas vías de señalización relacionadas con procesos de inducción e inhibición del crecimiento, reduciendo la replicación, transcripción, traducción en respuesta a distintos tipos de estrés [210].

Se ha descrito que la administración de distintos inhibidores de MetAP-2, conduce a la parada del ciclo celular en la fase G_1 del ciclo celular en células endoteliales de la línea HUVEC [218-222].

Este hecho hace que la inhibición de la enzima MetAP-2 sea potencialmente útil en el tratamiento de distintas patologías relacionadas con la angiogénesis, tales como el cáncer o inflamación crónica [223].

Distintas investigaciones han puesto de manifiesto diversos mecanismos por los que pueden actuar los inhibidores de MetAP-2. Así, el bloqueo de MetAP-2 es capaz de inhibir distintas proteínas relacionadas con el ciclo como CDK1 y CDK2, junto con la reducción en la fosforilación de RB en células endoteliales. Además se ha descrito el bloqueo de la activación del complejo ciclina E-CDK2 en células de músculo liso vascular [220,224]. Otros autores han demostrado que la parada el ciclo celular en G_1 , debida a la inhibición de la enzima MetAP-2, puede estar relacionada con la activación de P53, proteína que es capaz de inducir a p21, siendo su acumulación causa de dicha parada en G_1 [218].

Finalmente, se ha descrito que el bloqueo de MetAP-2 podría inducir la vía intrínseca de la apoptosis mediante un mecanismo, aún no claramente elucidado, que incluiría una reducción en la expresión de la proteína Bcl-2 [225-228].

2.8.4 PPI-2458

PPI-2458 es un análogo sintético de la fumagilina que fue sintetizado para intentar reducir los efectos adversos relacionados con la administración de otras moléculas anti-angiogénicas como la propia fumagilina o el TNP-470.

El TNP 470 es un análogo sintético de la fumagilina que se aisló inicialmente del hongo *Aspergillus fumigatus* y cuyas propiedades anti-angiogénicas se publicaron por primera vez por Ingber y cols en 1990 [229]. Desafortunadamente, la administración continuada de fumagilina está limitada por una severa pérdida de peso, por lo que no se ha utilizado en ensayos clínicos. Por este motivo se han sintetizado derivados de este compuesto con mejores actividades anti-angiogénicas y menores efectos secundarios, siendo uno de estos derivados de la fumagilina el PPI-2458.

Tanto la fumagilina como el TNP-470 se unen de forma covalente a la metionina aminopeptidasa 2 (MetAP2) inhibiéndola siendo el tratamiento con una de estas drogas, capaz de incrementar el nivel de MetAP-2, al reducir la tasa de renovación de dicha proteína [230].

Junto con el efecto de inhibición sobre la enzima MetAP-2, se ha comprobado que el TNP-470 tiene un efecto directo sobre las células endoteliales, inhibiendo la fosforilación de RB y la síntesis de ADN a través de la inactivación de las CDKs [221]. Además, también produce la activación de p53 y la inducción dependiente de esta proteína de p21, también en células endoteliales [231]. Por otro lado, se ha demostrado que el TNP-470 presenta un efecto directo no sólo sobre las células endoteliales, sino también sobre las propias células tumorales, siendo capaz de inducir apoptosis en las mismas [232-234]. Incluso la utilización de modelos animales ha

puesto de manifiesto los efectos anti-tumorales del TNP-470 en distintos tipos de cáncer [235-237]. Sin embargo, a pesar de los datos prometedores, el desarrollo clínico de este fármaco se ha detenido debido a problemas con la optimización de las dosis intravenosas, la toxicidad neurológica y la corta vida media en la circulación [238,239].

Más recientemente, ha sido desarrollado el PPI-2458, otro derivado de la fumagilina, también inhibidor irreversible de la enzima MetAP2. Este fármaco muestra una gran actividad angiogénica, pero su efecto neurotóxico se ha reducido [240]. Aunque todavía los estudios son escasos, los posibles efectos beneficiosos del PPI-2458 se han probado en distintas patologías como sinovitis, artritis reumatoide melanoma y linfoma no Hodgkin [241,242].

La mayoría de los estudios llevados a cabo con PPI-2458 se han realizado en modelos animales [241,243-246] y celulares [247] de artritis reumatoide. En ellos se ha constatado una supresión de la inflamación y de los procesos destructivos de la artritis.

El interés del uso de este fármaco es debido principalmente a sus propiedades anti-angiogénicas, habiéndose determinado que es capaz de inhibir la formación de vasos en presencia de VEGF y FGF2 [246,248] en modelos animales. En modelos celulares, en concreto usando células de la línea HUVEC, ha demostrado un efecto anti-proliferativo del PPI-2458 independiente de la secreción de factores pro-angiogénicos [246]. Aunque en los modelos animales este fármaco tiene efectos anti-inflamatorios, en los modelos celulares no se observan dichos efectos en células HUVEC cuando estas son estimuladas con lipopolisacárido (LPS) y factor de necrosis tumoral (TNF α) e IL-1 β junto con PPI-2458 [246]. Además cuando se utilizan fibroblastos la incubación de estos junto

con TNF α o LPS suplementado con PPI-2458 tampoco disminuye la secreción de VEGF o IL-6 [247].

En cuanto a los estudios realizados con el PPI-2458 sobre tejidos tumorales, los análisis son escasos. Los únicos realizados son sobre linfoma no Hodking [249] y melanoma [241]. En ambos tipos celulares se ha demostrado que la incubación con PPI-2458 es capaz de reducir la proliferación de las células, siendo la concentración mínima más eficaz la de 10 nM.

No existen datos disponibles sobre los efectos del PPI-2458 sobre el HCC, siendo uno de los objetivos principales de este estudio, investigar los efectos anti-proliferativos, oncostáticos y pro-apoptóticos del PPI-2458 en un modelo *in vitro* de HCC utilizando la línea derivada de hepatocarcinoma humano HepG2.

3. - MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ÁMBITO DE TRABAJO

Este trabajo de experimentación se ha desarrollado en el Instituto Universitario de Biomedicina (IBIOMED) de la Universidad de León.

3.2 LÍNEA CELULAR

Para la realización de este trabajo se ha utilizado una línea celular de hepatocarcinoma humano, denominada HepG2 adquirida a la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, Virginia, EE.UU.).

De forma rutinaria las células crecen en forma de monocapa en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (Life Technologies, Carlsbad, California, EE.UU) suplementado con suero bovino fetal 10% (Life Technologies), penicilina 100 U/mL (Life Technologies), Glutamax 4 mM (Life Technologies) y piruvato sódico 100 µg/mL (Life Technologies). Las células se mantuvieron en un incubador (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU) en condiciones controladas de temperatura (37°C) y humedad (95%), con un aporte de aire y CO₂ constante (95% y 5% respectivamente). Estas células fueron mantenidas en flask T75 (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EE.UU.) y pasadas una vez por semana utilizando un volumen final de cultivo de 10 mL.

Para el procedimiento de pase de las células se utilizó el procedimiento de tripsinización. Por este método, tras eliminar el medio y lavar el medio restante con tampón fosfato salino (PBS) (Life Technologies) se añadió tripsina (Life Technologies) a las células. Tras 5 minutos de permanencia con la tripsina en el

incubador (37°C), se procedió a la neutralización de la misma con medio completo. A continuación se recogieron las células en un falcon (BD Biosciences) para posteriormente centrifugarlas a 1100 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Más tarde se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio para a continuación contarlas con un contador automático de células (Countess, Thermo Fisher Scientific). Una vez cuantificadas se sembraron en un flask T75 a razón de dos millones por flask.

Todos los experimentos realizados se ejecutaron siguiendo las pautas recogidas en la normativa internacional GLP (Good Laboratory Practices).

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Una vez que las células llegaban a subconfluencia eran tripsinizadas y transferidas a los recipientes de cultivo donde se iban a realizar los experimentos. En tales placas de cultivo se incubaban las células durante 2, 4 o 6 días con el fármaco utilizado, PPI-2458 (GlaxoSmithKline, Londres, Reino Unido).

3.3.1 Grupos experimentales

Las células utilizadas en el presente estudio se dividieron en distintos grupos de tratamiento:

0: células no tratadas

C: células tratadas solo con vehículo (etanol)

2: células incubadas con fármaco durante dos días).

4: células incubadas con fármaco durante cuatro días

6: células incubadas con fármaco durante seis días

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

Para la realización de los diversos análisis se utilizaron reactivos de la casa comercial Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EE.UU.), a no ser que se indique lo contrario en el texto.

3.4.1. Viabilidad Celular (MTT)

Fundamento

La reducción de sales de tetrazolio es ampliamente aceptada como un modo fiable de medir la proliferación celular. El compuesto MTT (Bromuro de 3- (4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol) es reducido por las células metabólicamente activas, en parte por la acción de las deshidrogenasas celulares, generando equivalentes reductores como el NADH y NADPH. El resultado es la formación intracelular de formazán púrpura que puede ser solubilizado y medido por medios espectrofotométricos [250].

Procedimiento

Se procedió a sembrar 15.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos (BD Biosciences), tras 24 h se iniciaron los tratamientos con el fármaco. Para la realización del análisis, tras los diversos periodos de incubación con la droga, se sustituyó el medio de las células por medio sin suero y se añadieron 100 μ L de una solución conteniendo 5 mg/mL de MTT. Al cabo de tres horas en el incubador, se retiró el medio y se disolvieron las sales de formazán utilizando Dimetilsulfóxido (DMSO). Tras ello se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 560

nm. (Synergy HT, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, Vermont, EE.UU.).

3.4.2 Ciclo Celular (FACS)

Fundamento

La medición de las fases del ciclo celular por citometría de flujo se basa en la capacidad del ioduro de propidio para unirse al ADN celular. Este tinte, una vez dentro de las células, se excita a una determinada longitud de onda

emitiendo fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN de la célula. Dicha fluorescencia va a ser captada mediante citometría de flujo, lo que permite la medición de las diversas fases del ciclo celular.

Procedimiento

Se procedió a sembrar 400.000 células por flask T25 (25 cm²) (BD Biosciences), transcurridas 24 h se iniciaron los tratamientos con el fármaco. Tras la incubación con la droga a los diversos tiempos de tratamiento, se tripsinizaron y recogieron las células. A continuación se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 500 µL de PBS (Life Technologies). Después las células fueron fijadas en etanol al 70% (Merck, Whitehouse Station, New Jersey, EE.UU.) en PBS durante al menos una hora a -20°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 mL de PBS. Tras un minuto se procedió de nuevo a centrifugar las células a 2000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez obtenido el pellet se eliminó el sobrenadante y las células fueron

finalmente resuspendidas en 1 mL de solución de Ioduro de Propidio con ARNasa (BD Biosciences), incubándose durante 15 min a temperatura ambiente para permitir la acción de la ARNasa. Concluido este tiempo se dispuso a pasar las células por el citómetro de flujo (FACS Calibur, BD Biosciences).

Para la adquisición en el citómetro de flujo es necesario establecer los siguientes plots:

- ❖ FSC – SSC
- ❖ FL2-A
- ❖ FL2-H
- ❖ FL2-A – FL2-W

Tras la adquisición de 10000 eventos por muestra a una velocidad baja, se procedió al análisis de tales adquisiciones utilizando el programa Modfit (Verity Software House, Topsham, Maine, EE.UU.).

3.4.3 Homogeneizado Total

Fundamento

El procedimiento de lisis celular se basa en la utilización de un tampón capaz de romper las membranas celulares para la obtención de las proteínas del interior de las células.

Procedimiento

Tras la tripsinización de las células se sembraron 150.000 células en placas de 6 pocillos (BD Biosciences) y 24 horas después se comenzó el tratamiento de las mismas con el fármaco.

Finalizados los distintos tiempos de incubación indicados previamente, las células se lavaron dos veces con PBS frío, se añadieron 100 μ L de IPB7 (Trietanolamina 20 Mm, cloruro sódico 0,7 M, NP-40 0,5% y deoxicolato sódico 0,2%) suplementado con diversos inhibidores: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, inhibidor de la tripsina 100 μ g/mL, ortovanadato sódico 1 mM, fluoruro de sodio 1 mM, Aproptinina 1 μ g/mL, Leupeptina 1 μ g/mL y pepstatina 1 μ g/mL y se rascaron de la placa, siendo recogidas en tubos que fueron sumergidos en nitrógeno líquido. Tras este proceso fueron almacenadas a -20°C para su posterior procesamiento. Tras descongelarse se agitaron 3 veces y se centrifugaron durante 20 minutos a 14000 rpm a 4°C recogándose a continuación el sobrenadante.

3.4.4 Actividad de Caspasa-3, -8 y -9

Fundamento

Las actividades de caspasas se determinan usando una modificación del método de Hasegawa et al [251]. El ensayo se basa en el procesamiento de sustratos específicos por parte de las caspasas, generándose productos fluorescentes que podemos detectar en un espectrofluorímetro.

Procedimiento

Tras la tripsinización de las células se sembraron 150.000 células en placas de 6 pocillos (BD Biosciences). 24 horas después se comenzó el tratamiento de las mismas con el fármaco. Trascorridos los tiempos de incubación indicados previamente, se obtuvieron los homogenizados totales como previamente se ha indicado.

Una vez obtenidos los lisados celulares, estos se incubaron durante una hora a 37°C, en un tampón Hepes 20 mM, glicerol 10%, DTT 2 mM, pH 7.5, que contenía 100 µM del sustrato fluorogénico específico 7-amino-4-metilcumarina N-acetil-L-aspartil-L-glutamil-L-valil-L-aspartico amida (Ac-DEV-AMC), 7-amino-4-trifluorometilcumarina N-acetil-L-isoleucil-L-glutamil-L-treonil-L-aspartico amida (Ac-IETD-AFC) y 7-amino-4-metilcumarina N-acetil-L-leucil-L-glutamil-L-histidil-L-aspartico amida (Ac-LEHD-AMC) para la caspasa-3, -8 y -9 respectivamente (Alexis Biochemicals, San Diego, California, EE.UU.).

El procesamiento de los sustratos fluorogénicos se monitorizó por medio de un lector de microplacas (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Inc.) a unas longitudes de onda de excitación/emisión de 360/460 nm para la actividad de la caspasa-3, 400/505 nm para la actividad de la caspasa-8 y 380/505 nm para la caspasa-9. La actividad se expresó como unidades arbitrarias de fluorescencia por miligramo de proteína por minuto de incubación (UAF/mg prot/min).

3.4.5 Concentración de proteínas

Fundamento

La cuantificación de la concentración de proteína de las muestras se llevó a cabo mediante el método de Bradford. Dicho método se basa en la utilización del denominado Reactivo de Bradford que contiene un tinte, azul de Coomassie, capaz de unirse a los residuos de lisina de las proteínas [252].

Procedimiento

Se preparó un recta patrón utilizando diversas concentraciones de albúmina sérica bovina (fracción V). Posteriormente, tanto la recta patrón como las muestras objeto de análisis, fueron incubadas con el reactivo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, California, EE.UU.) durante 10 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz. La lectura de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas Synergy HT (Bio-Tek Instruments).

3.4.6 Western Blot

Fundamento

La determinación de las proteínas se llevó a cabo mediante la técnica de Western blot utilizando el sistema de Laemmli publicado en 1970 [253].

Procedimiento

Tras la obtención de los homogeneizados celulares totales y la posterior determinación de la concentración de proteínas, se tomaron 100 µg de proteína de cada muestra para su análisis. En todos los casos se completó el volumen con agua hasta 75 µL y 25 µL de tampón de carga adicionales (sacarosa 0,27 M, SDS 0,27 M, β-mercaptoetanol 2,8 M, azul de bromofenol 1,4 mM y Tris-HCl 0,5 M pH 6,8) y se incubó durante 3 minutos a 100°C.

a) Electroforesis

A continuación se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 9-12% en tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM, glicina 0,2 M, SDS 3,5 mM pH 8,8) utilizando el sistema Mini

Protean (Bio-Rad). Dicha electroforesis se realizó en un gel discontinuo con dos zonas diferenciadas: *Running* (en la zona inferior) y *Stacking* (en la zona superior). En la zona de *Stacking* se concentra la muestra mediante isotacoforésis, mientras que en la zona de *Running* se produce la separación de los diversos componentes proteicos de cada muestra

Para la realización del gel *Running* se preparó la siguiente mezcla reactiva:

- ❖ 1,8 – 2,4 ml de mezcla acrilamida/bis acrilamida 29:1 (Bio-Rad).
- ❖ 2-2,6 ml de H₂O milliQ.
- ❖ 1,5 ml de tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8.
- ❖ 60 µL de SDS al 10%. (Bio-Rad).
- ❖ 30 µL de persulfato amónico (APS) al 10% (Bio-Rad).
- ❖ 3 µL de TEMED (Bio-Rad).

Tras la preparación de esta parte del gel, la mezcla se introdujo entre los cristales con objeto de que polimerizase en la zona inferior.

A continuación se procedió a realizar la mezcla de la parte concentradora (*Stacking*) del gel que se realizó con un porcentaje de acrilamida del 4%. Para ello se preparó la siguiente mezcla reactiva:

- ❖ 0,4 mL de mezcla acrilamida/bis acrilamida.
- ❖ 2 mL de H₂O milliQ.

- ❖ 3,3 mL de tampón Tris-HCl 0,5 M pH 6,8.
- ❖ 33,3 μ L de SDS al 10%.
- ❖ 16,7 μ L de APS al 10%.
- ❖ 3,3 μ L de TEMED.

Una vez preparada la mezcla se introdujo entre los cristales, encima de la parte separadora (*Running*) del gel, y a continuación el peine para que se formasen los pocillos del gel en los cuales se procedió a cargar las muestras.

b) Transferencia

Una vez separadas mediante electroforesis las proteínas, éstas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad), con objeto de fijarlas a este soporte favoreciendo su exposición a los anticuerpos. Para dicha transferencia, una vez extraído el gel, éste se equilibró en el tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 0,2 M, y metanol 20%).

La transferencia se realizó a 100 V durante 100 minutos, mediante la denominada transferencia húmeda. A continuación, la membrana, donde se hallaban fijadas las proteínas transferidas, se incubó durante una hora en solución de bloqueo conteniendo 2,5% leche en polvo desnatada en PBS-Tween (NaCl 0,14 M, KH_2PO_4 1,4 mM, NaHPO_4 8 mM, KCl 2,7 mM, Tween-20 0,05%) a temperatura ambiente.

c) Incubación con anticuerpo primario y secundario

Posteriormente, se incubó la membrana durante una noche con anticuerpos específicos, según la proteína objeto de análisis, disueltos en leche preparada en PBS-Tween. Transcurrido ese

tiempo se lavó durante 1 hora con PBS-Tween (que era renovado cada 10 minutos). A continuación, se incubó durante 60 minutos con un anticuerpo secundario, anti-inmunoglobulina de conejo o de ratón, unido a peroxidasa de rábano picante (HRP), (Dako, Glostrup, Dinamarca). Transcurrido el tiempo indicado se volvió a lavar durante 1 hora con PBS-Tween (que era renovado cada 10 minutos).

d) Revelado

La detección de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia utilizando el reactivo comercial ECL (Santa Cruz Biotechnology, California, EE.UU.) exponiendo la membrana durante 1 minuto a la mezcla reactiva comercial. Posteriormente se introdujo en una cassette radiográfica junto con una película de alta sensibilidad (Fujifilm Super RX, Tokio, Japón), durante tiempos variables de entre 1 – 30 minutos.

Tras el revelado y secado de la película se llevó a cabo la cuantificación de las bandas por densitometría utilizando para ello el programa Scion Image 4.02 (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EE.UU.).

Con objeto de verificar que se había cargado la misma cantidad de proteína en cada pocillo del gel, las membranas se lavaron en tampón de deshibridación (glicina 0,2 M, 3 mM SDS, 1% Tween-20 pH 2,2) durante 10 minutos, 2 x 10 min en PBS, y 2 x 5 min en PBS-Tween. A continuación se bloquearon durante 1 hora en leche al 2,5% disuelta en PBS-Tween para posteriormente cuantificar la expresión del gen *housekeeping* β -actina (42kDa).

3.4.7 Análisis de la expresión génica por retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-qPCR)

Fundamento

Esta técnica se basa en la cuantificación del ADN complementario (ADNc) obtenido mediante retrotranscripción (RT) a partir del ARN mensajero (ARNm) en las muestras objeto de estudio. En el caso de la PCR cuantitativa (qPCR), se utilizan sondas específicas para la secuencia a amplificar que van a estar unidas a fluoróforos, siendo posible la monitorización continua de la fluorescencia y por ello la cuantificación del nivel de expresión del gen de interés.

Procedimiento

1) Aislamiento del ARN

Tras la tripsinización de las células se sembraron 150.000 en placas de 6 pocillos (BD Biosciences) y 24 horas después se comenzó el tratamiento de las mismas. Transcurrido el tiempo de incubación se aspiró el medio y se añadió a cada pocillo 1 mL de TRI Reagent (Ambion, Life Technologies) para lisar y homogeneizar las células en tubos de 2 mL de capacidad. TRI Reagent utiliza fenol y tiocianato de guanidina para inhibir rápidamente la actividad ARNasa, además la adición de cloroformo permite la separación mediante centrifugación del ARN, ADN y las proteínas en tres fases, acuosa, interfase y fase orgánica respectivamente.

Pasados 5 minutos de incubación del homogeneizado a temperatura ambiente, permitiendo así la disrupción de los complejos de nucleoproteínas, se añadieron a cada tubo 200 μ L de cloroformo. La mezcla se mantuvo 15 minutos a temperatura ambiente para a continuación agitar vigorosamente con un vórtex

durante 15 segundos, y posteriormente centrifugar a 12000 xg durante otros 15 min a 4°C.

Terminada la centrifugación se procedió a recoger la fase acuosa superior a un tubo nuevo, donde está el ARN. A continuación, se añadieron 500 µL de isopropanol a cada tubo, se agitaron durante 10 segundos, se incubaron a temperatura ambiente 10 min, y se centrifugaron a 12000 xg durante 8 min a 4°C, obteniendo así el pellet de ARN.

Obtenido el precipitado de ARN, se lavó el mismo con 1 mL de etanol al 75% (Merck). Una vez realizado este paso, se volvió a centrifugar a 7500 xg durante 5 minutos a 4°C, se eliminó el etanol y se dejó secar el pellet de ARN durante 1-2 horas. Para terminar el aislamiento de ARN, se disolvió el pellet obtenido en agua con dietilpicrocarbonato (DEPC) (Ambion, Life Technologies) y se mantuvo a -20°C durante 24 horas.

2) Cuantificación de la concentración de ARN

Para la cuantificación del ARN total se procedió a la medida de la densidad óptica (DO) a 260 nm (1 unidad de DO equivale a 40 µg/mL) usando un espectrofotómetro UV-Vis que cubre todo el rango espectral de 220 a 750 nm (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific). La pureza del ARN se comprobó a través de la relación DO a A260/A280, debiendo encontrarse dicho valor dentro del intervalo 1,7-2,0, ya que un valor menor indica una posible contaminación con proteínas.

3) Tratamiento con ADNasas

Una vez cuantificado el ARN, a fin de eliminar posibles restos que pudieran quedar de ADN y evitar problemas en la posterior retrotranscripción, se procedió a su tratamiento con ADNasas.

Para ello se preparó la siguiente mezcla por muestra:

- ❖ 16 μL de ARN en agua tratada con DEPC (Ambion, Life Technologies)
- ❖ 2 μL de tampón de reacción 10X de RQ1 ADNasa (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EE.UU.)
- ❖ 1 μL de ADNasa RQ1libre de ARNasa (Promega)

Tras realizar la mezcla del ARN y la ADNasa con el tampón, se incubó a 37°C durante 30 minutos en un termociclador preparado al efecto. A continuación, se añadió a cada tubo 1 μL de RQ1 ADNasa Stop Solution (Promega) y se incubó a 65°C, en el termociclador, durante 10 minutos para inactivar la ADNasa. Terminado el tratamiento con ADNasas se procedió a la retrotranscripción del ARN.

4) Retrotranscripción

Consiste en la obtención de un ADN complementario (ADNc) a partir de ARN, el proceso inverso de la transcripción. Para ello son necesarias unas ADN polimerasas específicas, llamadas transcriptasas inversas o retrotranscriptasas. Las enzimas utilizadas proceden de algunos retrovirus, que son virus que presentan ARN como genoma, en vez de ADN y para poder expresar sus proteínas en las células, han de pasar la información a ADN. Para la síntesis de ADNc se utilizó el sistema “High-Capacity cDNA Archive Kit” (Applied Biosystems, Life Technologies). Para ello se utilizó 1 μg de ARN de cada una de las muestras, realizándose en paralelo un control negativo, con agua libre de nucleasas (Ambion, Life Technologies). Para proceder a la RT, por muestra se preparó la siguiente mezcla:

- ❖ 4 μL de tampón RT 10X

- ❖ 1,6 μL de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) 25X
- ❖ 4 μL de cebadores al azar 10X
- ❖ 2 μL de retrotranscriptasa Multiscribe (50U/ μL)
- ❖ 1 μL de Inhibidor de ARNasas (1U/ μL)
- ❖ 6,4 μL de agua tratada con DEPC

A continuación se procedió, en un termocilador, a incubar la mezcla a 25°C durante 10 minutos, posteriormente a 37°C durante 2 horas, para terminar con un paso de 85°C durante 5 minutos para inactivar la retrotranscriptasa, obteniendo así el ADNc, que se congeló a -20°C hasta el momento de su utilización en el proceso de amplificación.

5) Amplificación del ADNc: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR)

Una vez sintetizado el ADNc, se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR es un método que permite amplificar de forma selectiva secuencias específicas de ADN. El método de PCR está basado en la síntesis de una hebra complementaria de ADN, utilizando una cadena simple como molde. La PCR utiliza dos fragmentos cortos de ADN (oligonucleótidos) como iniciadores de la síntesis. Estos iniciadores o cebadores, se unen específicamente a secuencias que flanquean la región a amplificar, uno en cada una de las cadenas del ADN. En este caso se utilizó el sistema TaqMan (Applied Biosystems, Life Technologies), donde además de los cebadores se utiliza una sonda fluorescente. Esta sonda, unida a uno de los cebadores, por medio de la actividad exonucleasa 5'-3' de la ADN polimerasa, se libera al medio, libera fluorescencia y es detectada por el termocilador.

El proceso básico se desarrolla en tres pasos que se repiten sucesivas veces, según el gen a amplificar:

- Desnaturalización: Las cadenas de ADN diana se separan mediante la incubación a una temperatura superior a 70°C. Las hebras disociadas permanecerán en esta forma en la solución hasta que la temperatura baje lo suficiente para permitir el anillamiento de los cebadores.

- Anillamiento de cebadores: Los cebadores utilizados consisten en un par de oligonucleótidos sintéticos (sentido y antisentido) capaces de unirse a secuencias específicas del ADN de la región que se pretende amplificar. La temperatura óptima para el anillamiento debe ser estimada de forma empírica y viene determinada por la composición de nucleótidos de los dos cebadores.

- Elongación a partir de los cebadores: El resultado del proceso es la formación de copias de las cadenas de ADN diana.

En el presente estudio, se utilizó la metodología de la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) para la estimación de la concentración de ARN mensajero. Al contrario de lo que ocurre en una PCR convencional, en la qPCR a tiempo real se puede cuantificar la cantidad de producto amplificado en cada ciclo de PCR. La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial de la cantidad de la región diana del ADN, que viene dado por la expresión 2^n (siendo n el nº de ciclos) hasta que se llega a un punto en que disminuye la eficiencia de la enzima, y la reacción deja de ser exponencial (“fase Plateau”).

En una placa de 96 pocillos se preparó la siguiente mezcla de reacción con un volumen final de 20 μ L:

- ❖ 1 μL de sonda primer del gen específico (Applied Biosystems, Life Technologies)
- ❖ 1 μL de sonda primer del gen control (Applied Biosystems, Life Technologies)
- ❖ 1 μL de ADNc
- ❖ 10 μL de Fast Start Universal Master Mix (Roche Applied Science, Basilea, Suiza)
- ❖ 7 μL de agua libre de nucleasas (Ambion, Life Technologies).

Gen	Sonda primer		Tamaño fragmento (pb)
TNFα	Hs00174128_m1	NM_000594.2	80
VEGF	Hs00900055_m1	NM_001025366.2	59
IL-1β	Hs01555410_m1	NM_000576.2	91
GADPH	4326317E	NM_002046.3	171

Tabla I. Sondas utilizados en la RT-PCR. Las sondas se utilizan como cebadores en la amplificación de fragmentos correspondientes a cada gen.

En nuestros experimentos las condiciones del termociclador (StepOnePlus, Applied Biosystems, Life Technologies) fueron las siguientes:

- ❖ Etapa inicial de desnaturalización de 10 minutos a 95°C
- ❖ Etapa de desnaturalización de 15 segundos a 95°C
- ❖ Etapa de anillamiento/elongación de 1 minuto a 60°C

Las etapas 2 y 3 se repitieron a lo largo de 60 ciclos. Como patrón interno para normalizar la señal entre las diferentes muestras se amplificó un fragmento específico del gen gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en cada una de ellas como *housekeeping*.

Cada experimento incluyó, además, un control negativo de cada una de las muestras de ARN que no fue sometido a la transcripción reversa. Dicha muestra no dio lugar a producto de PCR alguno, confirmándose la ausencia de ADN genómico extraño o producto de PCR que pudiera haber contaminado la muestra previamente. Los cambios relativos en la expresión génica se determinaron mediante el cálculo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [254].

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la expresión de los resultados se calculó el valor de la media y el error estándar de la media (E.E.M.).

Para el análisis estadístico de los resultados se realizó el test de análisis de varianza (ANOVA). Además, en aquellos grupos donde aparecían diferencias significativas, se realizaba posteriormente el test de Newman-Keuls. Se consideró que existían diferencias significativas cuando $p < 0,05$. Para el tratamiento de los datos y su análisis estadístico se utilizó el software comercial SPSS+ versión 19.0 (IBM, Chicago, Illinois, EE.UU.).

4.- RESULTADOS

4.1 Efecto del fármaco PPI-2458 sobre la viabilidad celular de la línea derivada de hepatocarcinoma humano HepG2.

El efecto del PPI-2458 sobre la viabilidad celular se determinó mediante el test del MTT. El fármaco derivado de la fumagilina, produjo una reducción significativa de la viabilidad celular, a la concentración de 10 nM a dos días de tratamiento (87,23 % vs control, Figura. 11). En cuanto a las concentraciones de 100 y 1000 nM, en ambas se observó un descenso en la viabilidad similar a la de 10 nM. Sin embargo, el tratamiento con la concentración más baja de PPI-2458 (1 nM,) no tuvo ningún efecto a los dos días de incubación. La inhibición del crecimiento de la línea celular HepG2 debida al fármaco fue tiempo dependiente alcanzando un máximo de inhibición a los seis días de tratamiento; de tal modo en la concentración de 10 nM, se alcanzó la mayor inhibición en el crecimiento (59,20%) respecto del control (Figura 11). Una vez obtenidos estos resultados se optó por continuar nuestros experimentos con la menor dosis (10 nM) capaz de inducir la mayor inhibición del crecimiento de las células tumorales.

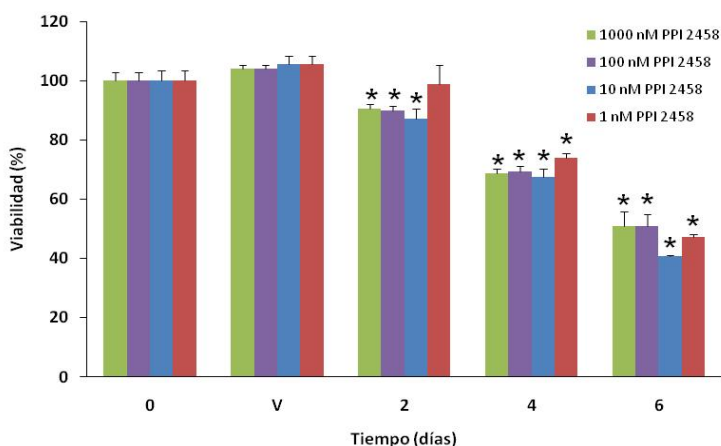


Figura 11. Viabilidad celular en la línea celular HepG2 tratada con PPI-2458 durante 2, 4 o 6 días. Valores medios \pm E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

4.2 Efecto del fármaco PPI-2458 sobre la cinética del ciclo celular y su regulación

Tras determinar el efecto del tratamiento con el fármaco sobre la viabilidad celular, se quisieron conocer las posibles consecuencias que tendría la incubación del mismo sobre la distribución del ciclo celular. Para ello, utilizando la citometría de flujo junto con ioduro de propidio, se realizó el estudio de la cinética celular, siendo administrado el PPI-2458 a la dosis de 10 nM. Tras la adquisición de 10000 eventos, se observó un incremento significativo del número de células en la fase G₀/G₁, siendo este aumento además tiempo dependiente (54,10 - 57,90% vs control, Figura 12). Este efecto, fue seguido por una disminución del porcentaje de células en fase S (18,47 - 16,20 % vs control, Figura 12), mientras que no hubo un cambio significativo en el porcentaje celular en la fase G₂/M (27,37 - 25,80% vs control, Figura 12).

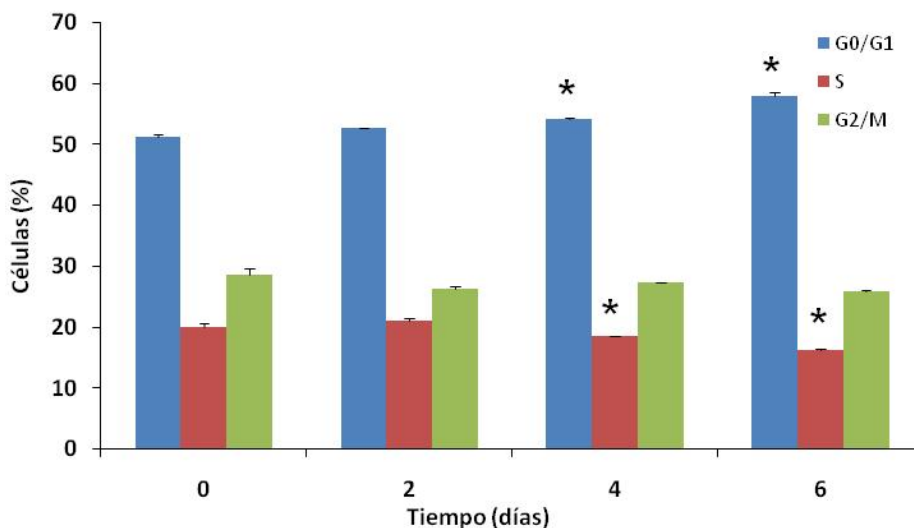


Figura 12. Distribución del ciclo celular en la línea HepG2 en células control y tratadas con PPI-2458 10 nM durante 2, 4 y 6 días. Valores medios \pm E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

4.2.2 Marcadores de ciclo celular

Para corroborar los datos obtenidos de la citometría de flujo, se determinaron mediante Western blot distintos marcadores del ciclo celular. Además, se pretendió determinar si el PPI-2458 era capaz de inducir una parada del ciclo celular en fase G₁ temprana o tardía. La administración de PPI-2458 fue realizada a la dosis de 10 nM.

De este modo se analizó la expresión de CDK4, CDK6 y ciclina D1, como marcadores de fase G₁ temprana. Los resultados obtenidos al estudiar ambas CDKs no mostraron diferencias en CDK4 y CDK6, cuando el PPI-2458 era administrado a los diversos tiempos analizados (Figuras 13 y 14). En cuanto a la ciclina D1, se observó que existía un incremento en su expresión de forma tiempo dependiente (+46 - +98% vs control, Figura 15).

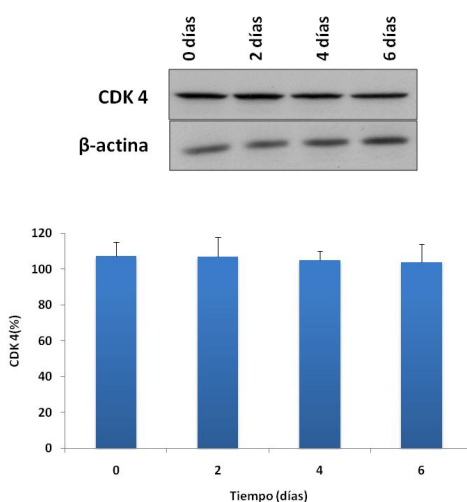


Figura 13. Expresión de proteína CDK4. Bandas (1) CDK4 36 kDa (2) β-actina 42 kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteína CDK4 en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios ± E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

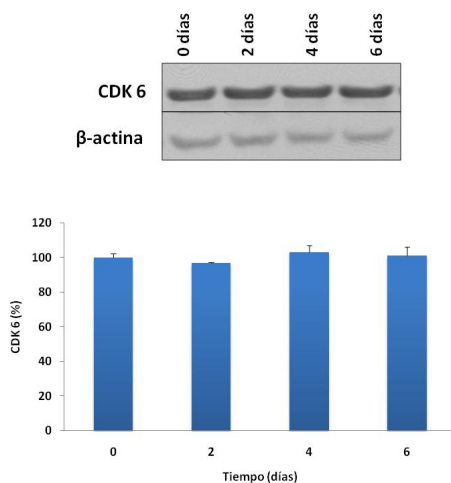


Figura 14. Expresión de proteína CDK6. Bandas (1) CDK6 36 kDa (2) β -actina 42 kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteína CDK6 en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios \pm E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

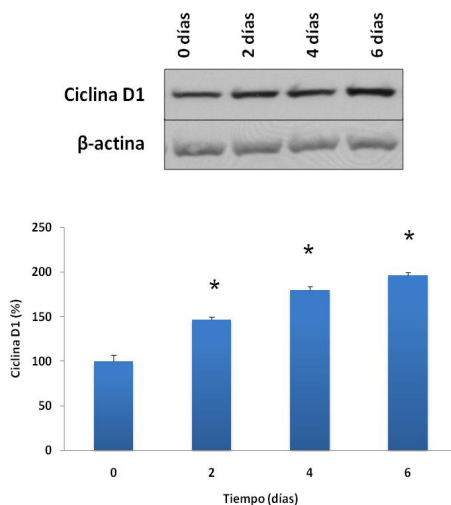


Figura 15. Expresión de proteína Ciclina D1. Bandas (1) Ciclina D1 36 kDa (2) β -actina 42 kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteína Ciclina D1 en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios \pm E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Respecto a los marcadores de fase G₁ tardía, aquellos que se analizaron fueron ciclina E, CDK2, P21 y PCNA, también medidos mediante Western Blot. Los resultados muestran un descenso significativo, tiempo dependiente, de la expresión de la ciclina E (-38 – -63% vs control, Figura 16) mientras que no existieron variaciones en la expresión de la CDK2 debido al tratamiento con PPI-2458 (Figura 17).

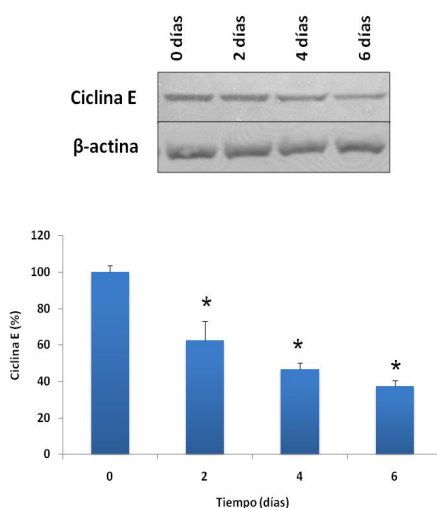


Figura 16. Expresión de proteína Ciclina E. Bandas (1) Ciclina E 57 kDa (2) β-actina 42 kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteína Ciclina E en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios ± E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

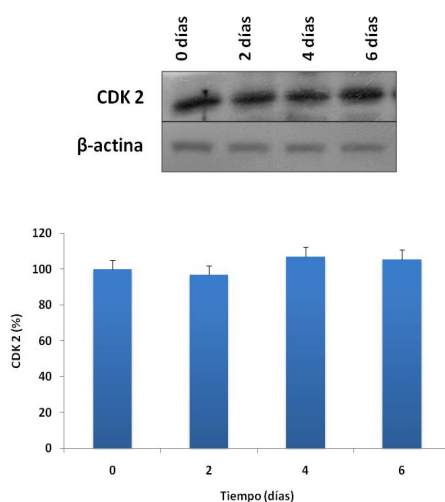


Figura 17. Expresión de proteína CDK2. Bandas (1) CDK2 36 kDa (2) β-actina 42 kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteína CDK2 en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios ± E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

En referencia a P21, proteína cuya función es inhibir a las quinasas dependientes de ciclinas (CKI), está relacionado con G₁ tardía y es capaz de regular negativamente la progresión del ciclo. Esta proteína mostró un incremento de forma tiempo dependiente en su expresión a los tiempos analizados (+30 - +76% vs control, Figura 18).

Finalmente, PCNA proteína sintetizada entre las fases del ciclo celular, G₁ tardía y S temprana, al analizarlo mediante Western Blot, mostró una ligera disminución en su expresión debida al tratamiento (-5 - -15 % vs control, Figura 19)

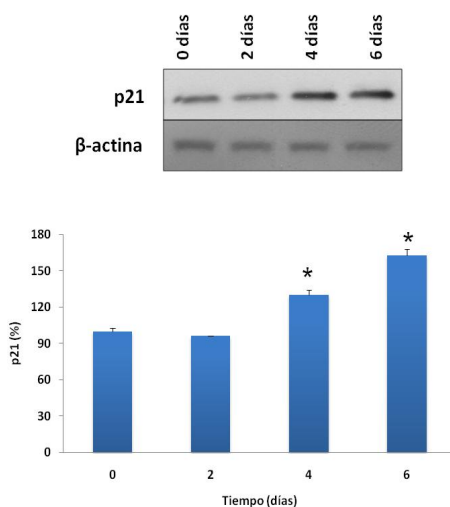


Figura 18. Expresión de proteína p21. Bandas (1) p21 21 kDa (2) β-actina 42 kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteína p21 en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios ± E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

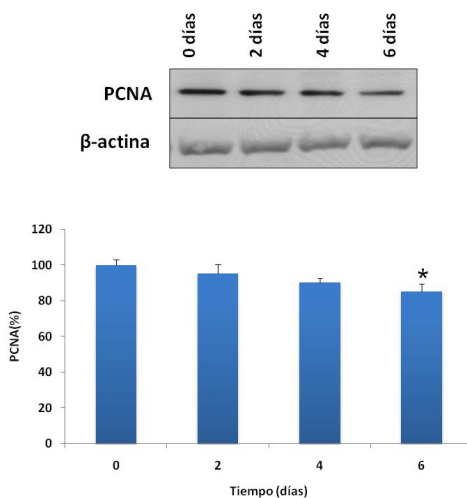


Figura 19. Expresión de proteína PCNA. Bandas (1) PCNA 30 kDa (2) β-actina 42 kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteína PCNA en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios ± E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Debido a que P21 es un efector de P53, nos propusimos estudiar la proteína P53 nativa y su forma fosforilada. En nuestros experimentos, encontramos un incremento significativo de la forma fosforilada de P53 tras 4 y 6 días de tratamiento (+8 - +82 % vs control), aunque sin cambios en los niveles totales de esta proteína (Figura 20). Además, P21 es capaz de evitar la hiperfosforilación de RB, permitiendo que esta proteína mantenga E2F secuestrado, evitando la entrada del ciclo celular en fase S. Nuestros resultados, muestran un importante disminución de la fosforilación de RB debido al tratamiento con PPI-2458 de un modo tiempo dependiente desde el segundo día de tratamiento (-19 - -21% vs control, Figura 21).

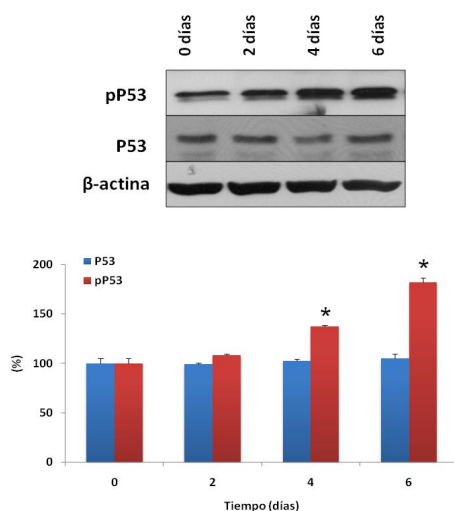


Figura 20. Expresión de proteína pP53 y P53. Bandas (1) pP53 53 kDa (2) P53 53 kDa (3) β-actina 42 kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteína pP53 y P53 en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios ± E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

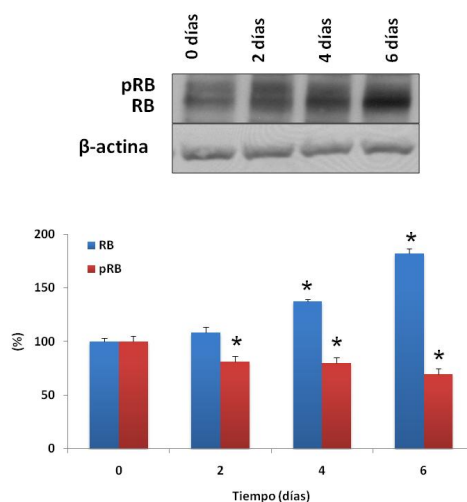


Figura 21. Expresión de proteínas pRB y RB. Bandas (1) pRB y RB 110 kDa (2) β -actina 42 kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteína pRB y RB en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios \pm E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

4.3 Vías de Señalización MAPK y AKT/PKB

La activación de AKT se ha relacionado con la proliferación tumoral, y es capaz de secuestrar P21. En nuestro trabajo, el estudio de la vía de señalización de AKT en las células de HCC tratadas con PPI-2458 (10 nM) reveló una disminución de la forma activada de AKT (-22 % vs control) tras seis días de tratamiento (Figura 22).

Junto con AKT, analizamos también potenciales cambios en la vía MAPK inducidos por el tratamiento con PPI-2458 (10 nM). No detectamos ninguna modificación en los niveles totales de p38 (Figura 23) ni tampoco en la quinasa terminal c-JUN (JNK) (Figura 24), ni tampoco en sus formas fosforiladas. Sin embargo, se observó una disminución significativa de los niveles de fosfo ERK (Quinasa regulada extracelularmente en su forma fosforilada)

desde el inicio del tratamiento debido al PPI-2458 (-39 - -67 % vs control, Figura 25).

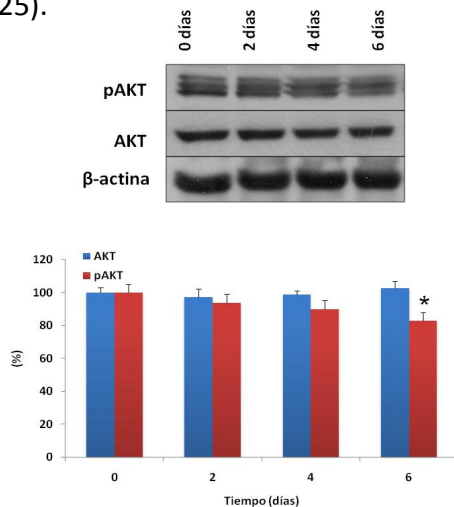


Figura 22. Expresión de proteínas AKT y pAKT. Bandas (1) pAKT 56-60 kDa (2) AKT 56-60 kDa (3) β -actina 42 kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteína pAKT/AKT en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios \pm E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

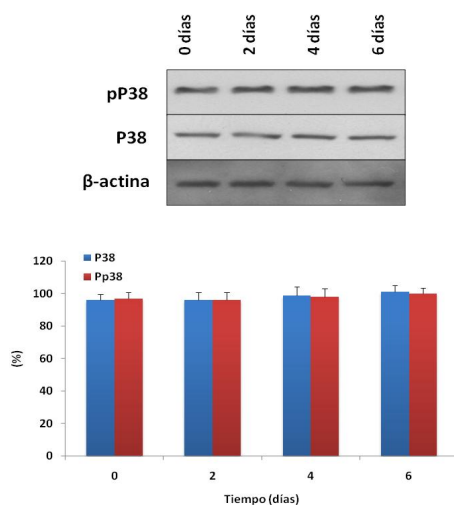


Figura 23. Expresión de proteínas P38 y ppP38. Bandas (1) pP38 46-52 kDa (2) P38 46-52 kDa (3) β -actina 42 kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteína P38 y ppP38 en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios \pm E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

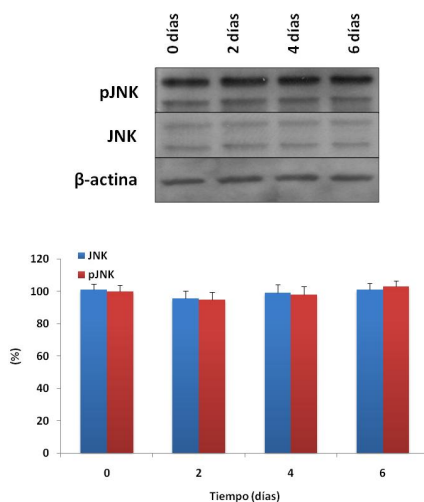


Figura 24. Expresión de proteínas JNK y pJNK. Bandas (1) pJNK 46-52 kDa (2) JNK 46-52 kDa (3) β -actina 42 kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteína JNK y pJNK en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios \pm E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

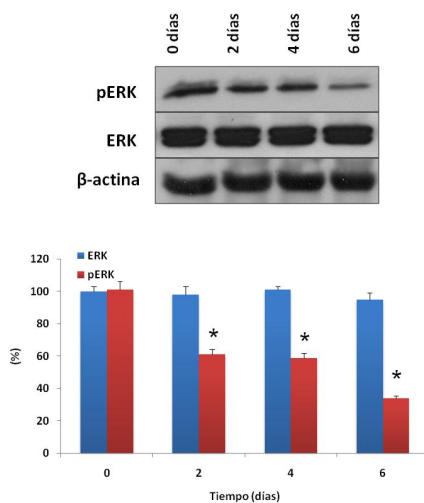


Figura 25. Expresión de proteínas pERK y ERK. Bandas (1) pERK 42-44 kDa (2) ERK 42-44 kDa (3) β -actina 42 kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de las proteínas pERK y ERK en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios \pm E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

4.4 Efecto del fármaco PPI-2458 sobre la actividad de caspasas y proteínas de la familia Bcl-2

Finalmente, se decidió a analizar si la inhibición del crecimiento estaba acompañada por una inducción de la apoptosis, a la mínima dosis capaz de reducir significativamente la viabilidad celular. Por ello, para determinar si la vía apoptótica se había activado en células HepG2 debido al tratamiento por PPI-2458 a la concentración de 10 nM se procedió al análisis de la actividad de las principales caspasas.

La inducción de la caspasa-8/9 está ligada a la activación de la caspasa efectora 3, que es el evento común iniciado por múltiples señales pro-apoptóticas. Debido a esto, se examinó la actividad de la caspasa-3, -8 y -9, midiendo el procesamiento de un sustrato fluorogénico, específico para cada una de ellas, a unas longitudes de onda de excitación/emisión de 360/460 nm, 400/505 nm y 380/505 nm respectivamente. El tratamiento con PPI-2458 a la concentración de 10 nM indujo un incremento significativo de las actividades de la caspasa-3 (+205 % vs control), caspasa-8 (+146 % vs control) y caspasa-9 (+89 % vs control) (Tabla II).

	Caspasa-3	Caspasa-8	Caspasa-9
0	2.45 ± 0.15	1.30 ± 0.14	1.00 ± 0.11
V	2.70 ± 0.66	1.20 ± 0.22	0.90 ± 0.16
2	2.46 ± 0.39	1.10 ± 0.12	0.82 ± 0.10
4	3.70 ± 0.77	1.45 ± 0.21	0.95 ± 0.19
6	4.47 ± 0.14*	2.76 ± 0.28*	1.89 ± 0.22*

Tabla II. Efecto del PPI-2458 sobre la actividad de caspasas en células HepG2. Sustratos específicos Ac-DEV-AMC, Ac-IETD-AFC y Ac-LEHD-AMC se utilizaron para la caspasa-3, -8 y -9, respectivamente. El procesamiento de los sustratos fluorescentes se monitorizaron a unas longitudes de onda de excitación/emisión de 360/460 nm para la actividad de caspasa-3, 400/505 nm para la actividad de la caspasa-8 y 380/505 para la caspasa 9. La actividad se expresó como unidades de fluorescencia por miligramo de proteína por minuto de incubación. V: vehículo. Valores medios ± E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

La apoptosis, además de estar ligada al aumento de la actividad de caspasas, también está relacionada con la variación en proteínas de la familia Bcl-2. En esta familia de proteínas, podemos encontrar miembros anti-apoptóticos como Bcl-2 y miembros proapoptóticos como Bax y Bad. Al analizar la expresión de estas proteínas, tras la administración de PPI-2458 a los tiempos indicados, se observó una importante reducción de la proteína Bcl-2 a 2, 4 y 6 días de tratamiento, (-28 - -41 % vs control), sin que existieran variaciones significativas en las proteínas Bax y Bad (Figura 26). Aunque sí se observaron modificaciones en las relaciones Bax/Bcl-2 y Bad/Bcl-2 (Figura 27).

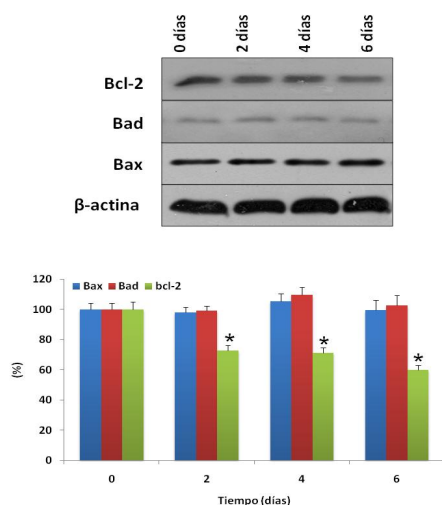


Figura 26. Expresión de proteínas Bcl-2, Bad y Bax. (1) Bcl-2 26 kDa (2) Bad 23 kDa (3) Bax 23 kDa (4) β-actina 42 kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteínas Bcl-2, Bax y Bad en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios ± E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

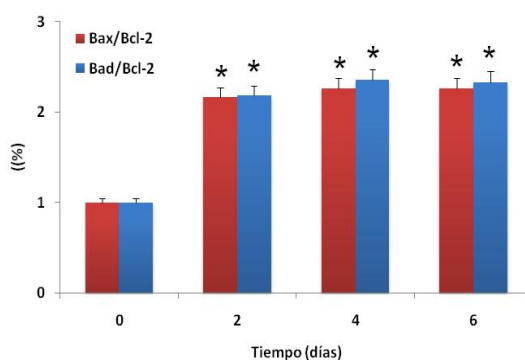


Figura 27. Relación Bax/Bcl-2 y Bad/Bcl-2. Valores medios ± E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

4.5 Vía de señalización de STAT3

La proteína STAT3 (Transductor de señales y activador de la transcripción) se activa por la fosforilación en residuos de tirosina. Esta fosforilación puede ser debida a determinadas citocinas y factores de crecimiento que, al unirse a sus respectivos receptores, activan a la familia de proteínas quinasas Janus (JAK), que fosforilan STAT3. La proteína STAT3 tiene un papel crucial en la regulación de la proliferación celular y la supervivencia de las células tumorales, aunque se también se ha implicado a esta proteína con la inducción de la expresión de P21. El análisis de STAT3 se realizó por medio de la técnica de Western Blot, midiendo los niveles tanto de la proteína fosforilada como la proteína total. Al analizar STAT3 se observó un incremento significativo de su forma fosforilada (+80 - +240 % vs control) a los 2, 4 y 6 días de tratamiento inducido por la incubación con PPI-2458 a la concentración de 10 nM. Sin embargo, la medición de los niveles totales de la proteína STAT3, reveló que no existía ninguna variación significativa de la misma debida a tratamiento con el fármaco (Figura 27).

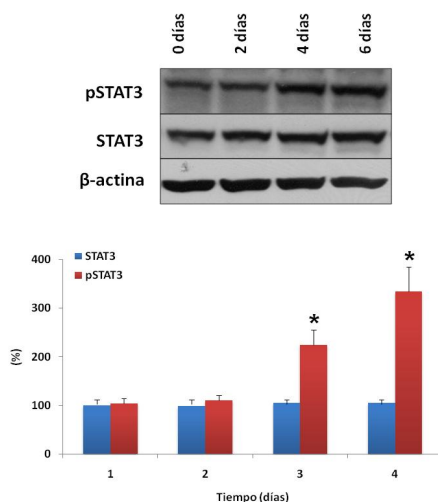


Figura 28. Expresión de proteínas pSTAT3 y STAT3. Bandas (1) pSTAT3 86-91 kDa (2) STAT3 86-91 kDa (3) β-actina 42 kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteínas pSTAT3 y STAT3 en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. Valores medios ± E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Para profundizar en el papel que STAT3 pudiera tener en el efecto de PPI-2458 sobre la proliferación de las células HepG2 se decidió utilizar un inhibidor de la misma, Stattic (6-Nitrobenzo[b]tiofeno 1,1-dioxido). Este inhibidor de STAT3 impide la fosforilación en la tirosina 705, residuo indispensable para su activación y translocación al núcleo, evitando así que pueda actuar como factor de transcripción. La administración de este inhibidor se realizó a una concentración 10 μM, incubándolo tanto solo como en combinación con el PPI-2458 durante 2 y 4 días. Así se comprobó, que en nuestro modelo, el inhibidor fue capaz de reducir la activación de STAT3 a los 4 días. Finalizados los tratamientos con el inhibidor en presencia/ausencia de PPI-2458 se analizaron los niveles de proteína pSTAT3 por medio de Western blot (Figura 29). Tanto en aquellas células en las que se había utilizado el inhibidor de STAT3 sólo, como en las que se incubó

junto el fármaco objeto de estudio, se pudo comprobar que existían variaciones significativas de la proteína pSTAT3 a los cuatro días de tratamiento (-77,96% y -61,66,57% vs control respectivamente). Junto con pSTAT3, también se determinaron los niveles de proteína de ciclina D1 y P21. En el caso de la ciclina D1 (Figura 29), tanto en las células incubadas sólo con Stattic como en las que este compuesto se había administrado en combinación con el PPI-2458 se observó una disminución a los 4 días de tratamiento (-77,53% y -75,72% vs control respectivamente). Dichos resultados eran similares a los observados al analizar P21 (Figura 29) en las mismas condiciones experimentales (-71,15% y -82,54% vs control respectivamente).

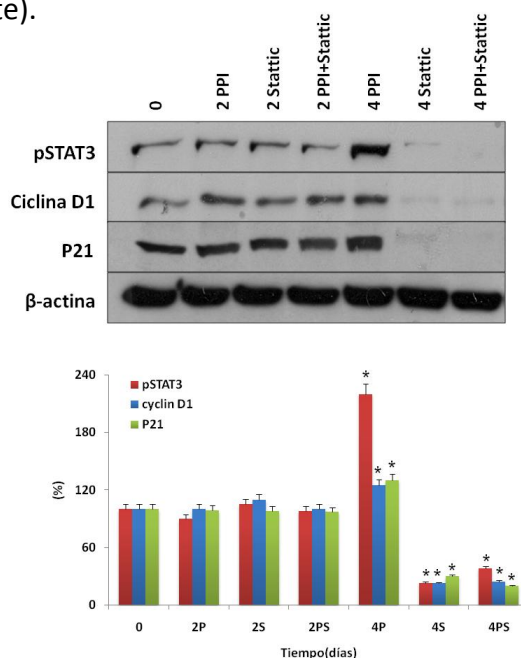


Figura 29. Expresión de proteínas pSTAT3, Ciclina D1 y P21. Bandas (1) pSTAT3 86-91 kDa (2) Ciclina D1 36 kDa (3) P21 21 kDa (4) β-actina 42 kDa. El panel superior muestra Western blots representativos. El panel inferior muestra las variaciones de la proteínas pSTAT3, Ciclina D1 y P21 en los distintos grupos de estudio expresadas como % respecto a su control. (P) PPI-2458, (S) Stattic, (PS) PPI-2458 + Stattic. Valores medios ± E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

4.6 Citocinas y Factores de Crecimiento

TNF α es una proteína con efectos tanto pro-inflamatorios como pro-angiogénicos. Esta proteína ha sido catalogada como un objetivo importante para la posible terapia anti-tumoral ya que su administración exógena es capaz de inducir apoptosis. La unión del TNF α a receptores de membrana puede resultar en la activación de la caspasa-8 y posteriormente de la caspasa-3, ejecutora de la apoptosis. En nuestro estudio, la cuantificación de la expresión del ARNm del TNF α (Figura 30), mostró un aumento significativo, de forma tiempo dependiente, a 4 y 6 días de tratamiento (x8 – x30 veces vs control).

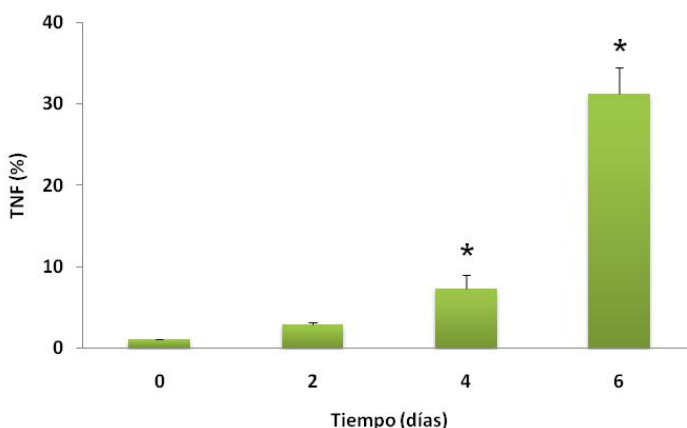


Figura 30. Contenido de ARNm de TNF α en los diferentes grupos experimentales Se toma como referencia el contenido del grupo no tratado (0). Valores medios \pm E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

La expresión de la IL-1 β (Figura 31), otra citocina que al igual que TNF α presenta efectos pro-inflamatorios y pro-angiogénicos, se incrementó de forma significativa a los 2, 4 y 6 días de tratamiento (x3 – x6 veces vs control).

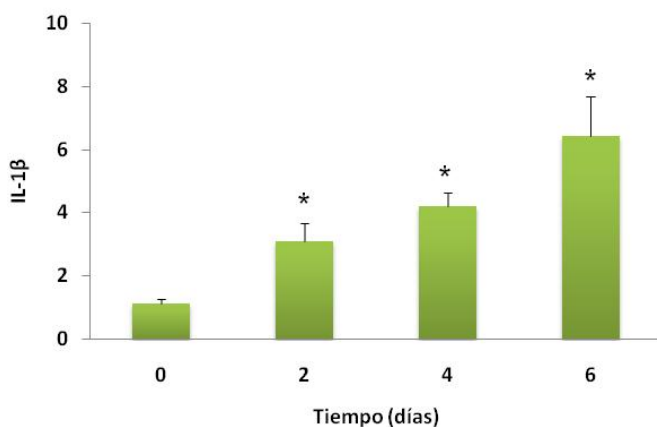


Figura 31. Contenido de ARNm de IL-1 β en los diferentes grupos experimentales. Se toma como referencia el contenido del grupo no tratado (0). Valores medios \pm E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Para comprobar si, en nuestros experimentos, el incremento en la expresión del ARNm de TNF α y IL-1 β , estaban relacionados con aumento de los niveles de fosfo STAT3 se procedió a la administración de Stattic. Para ello, se incubaron las células con PPI-2458, Stattic o con una combinación de ambos. Tras realizar su análisis mediante RT-qPCR se pudo constatar que en aquellas muestras donde se habían co-administrado el junto al inhibidor, se mantenía el incremento de TNF α (Figura 32) tanto a 2 como a cuatro días de tratamiento (x2 x7 veces vs control). En relación a la IL-1 β , tras el tratamiento durante 4 días con PPI-2458 en combinación con Stattic, el incremento del ARNm de esta interleucina (Figura 33) fue incluso mayor que cuando se administró solamente el fármaco objeto de estudio (x9,5 vs control).

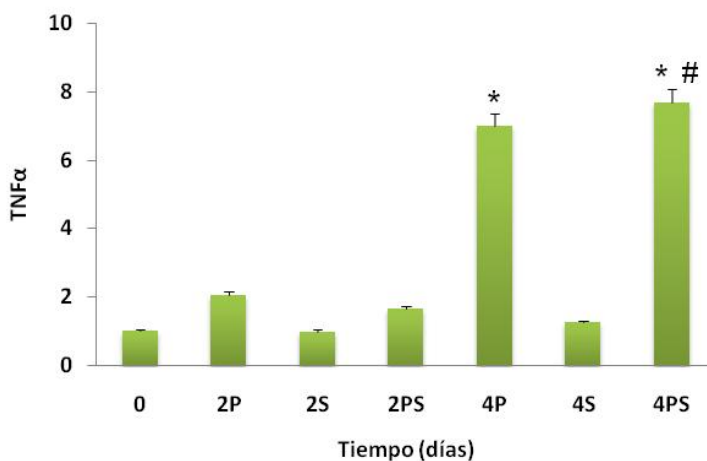


Figura 32. Contenido de ARNm de TNF α en los diferentes grupos experimentales. (P) PPI-2458, (S) Stattic, (PS) PPI-2458 + Stattic. Se toma como referencia el contenido del grupo no tratado (0). Valores medios \pm E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$). # Diferencias significativas respecto al tratamiento con el inhibidor ($p < 0,05$).

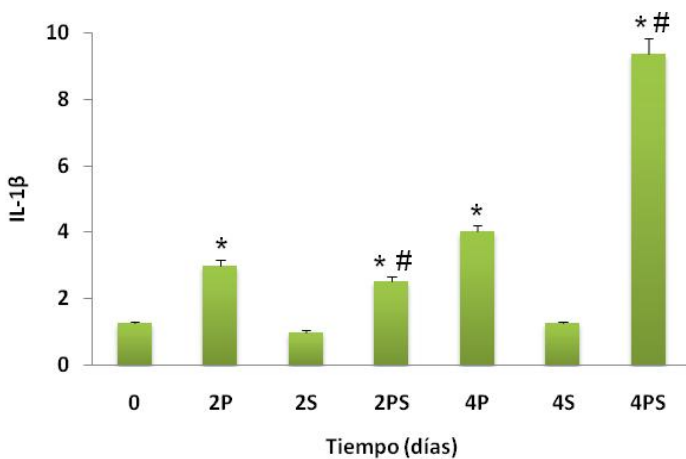


Figura 33. Contenido de ARNm de IL-1 β en los diferentes grupos experimentales. (P) PPI-2458, (S) Stattic, (PS) PPI-2458 + Stattic. Se toma como referencia el contenido del grupo no tratado (0). Valores medios \pm E.E.M = 8

ratas. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$). # Diferencias significativas respecto al tratamiento con el inhibidor ($p < 0,05$).

La principal molécula de la que depende el proceso de generación de nuevos vasos sanguíneos es el VEGF. Esta molécula es clave en el HCC, ya que una de sus principales características es la de tumor de altamente vascularizado. La administración de PPI-2458 produjo un incremento de forma tiempo dependiente en la producción de ARNm de VEGF (x2,3 – x3,4 veces vs control, Figura 34).

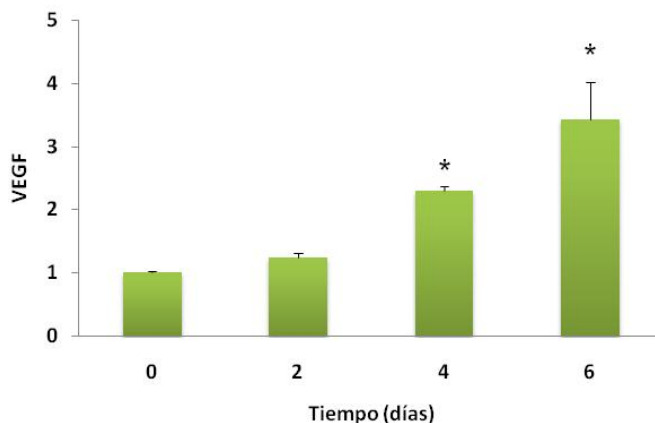


Figura 34. Contenido de ARNm de VEGF en los diferentes grupos experimentales. Se toma como referencia el contenido del grupo no tratado (0). Valores medios \pm E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Cuando las células eran cultivadas en presencia/ausencia de Stattic, junto al fármaco estudiado, se recuperaron los niveles basales del ARNm de VEGF a 2 y 4 días de tratamiento (Figura 35).

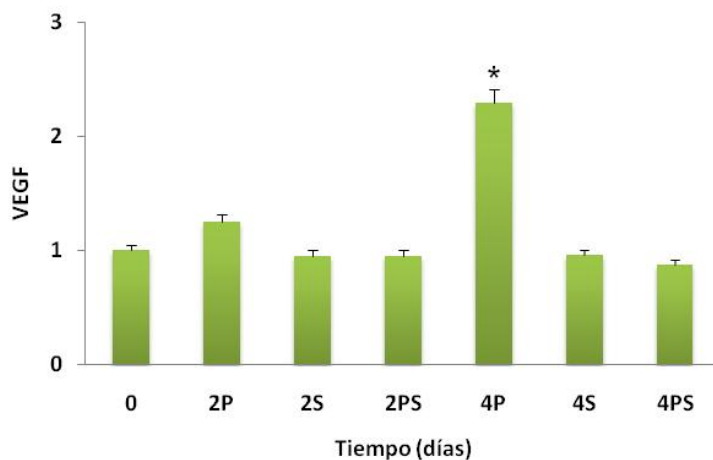


Figura 35. Contenido de ARNm de VEGF en los diferentes grupos experimentales. (P) PPI-2458, (S) Stattic, (PS) PPI-2458 + Stattic. Se toma como referencia el contenido del grupo no tratado (0). Valores medios \pm E.E.M. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$). # Diferencias significativas respecto al tratamiento con el inhibidor ($p < 0,05$).

5.- DISCUSIÓN

A pesar del gran número de investigaciones realizadas, existe todavía una gran controversia sobre la mejor aproximación terapéutica para el tratamiento del HCC. Distintos estudios han demostrado que los derivados de la fumagilina son capaces de inhibir la progresión del HCC en diferentes modelos animales [228,255]. El PPI-2458 se diseñó para superar las principales deficiencias y efectos secundarios de los derivados de la fumagilina, y al mismo tiempo mantener su actividad anti-proliferativa y anti-angiogénica [247]. Este fármaco, también ha demostrado una disminución significativa de los efectos adversos sobre el sistema nervioso central al ser administrado por vía oral [247]. Debido a la inexistencia de datos sobre el efecto del PPI-2458 en el HCC, hemos centrado nuestra investigación sobre sus efectos en la línea celular derivada de HCC humano HepG2.

Nuestro estudio ha demostrado que el PPI-2458 administrado de 2 a 6 días, es capaz de inhibir la proliferación y la progresión del ciclo celular, además de inducir apoptosis. La inhibición máxima de la proliferación celular se observó desde la concentración de 10 nM. Estos resultados están en concordancia con datos similares obtenidos por otros autores, que demuestran que el PPI-2458 es capaz de inhibir la proliferación de células de melanoma B16F10, con un máximo efecto a dosis superiores de 10 nM [241]. Además, se ha descrito que el PPI-2458 tiene efectos anti-proliferativos en líneas celulares derivadas de linfoma No-Hodking, demostrando que las moléculas de MetAP-2 se saturan por el fármaco a concentraciones iguales o mayores a 10 nM [249].

Al analizar en nuestros experimentos la cinética del ciclo celular, el tratamiento con PPI-2458 a la concentración de 10 nM, fue capaz de inducir una parada del mismo en la fase G_0/G_1 . Estudios previos han demostrado en células endoteliales que la fumagilina y otras moléculas derivadas de la misma, con capacidad para inhibir MetAP-2, son capaces de detener la progresión del

ciclo celular en la fase G₀/G₁ [218]. Además, también nuestro grupo ha demostrado, en un modelo *in vivo* de HCC, que el TNP-470 es capaz de inducir una parada del ciclo celular en la fase G₀/G₁ [256]. El presente estudio indica claramente que el PPI-2458 mantiene la capacidad de la fumagilina y derivados de la misma, de inhibir la progresión del ciclo celular de un modo tiempo-dependiente.

El mecanismo a través del que el PPI-2458 es capaz de modificar la cinética del ciclo celular y reducir la proliferación celular todavía tiene que ser claramente elucidado. El control del ciclo celular depende de una compleja maquinaria proteica, en la que diferentes miembros de las CDKs, en asociación con ciclinas específicas se activan a lo largo de todo el ciclo [257].

La fase G₁ temprana y media del ciclo está controlada por la ciclina D y sus CDKs asociadas, las CDK4 y CDK6, mientras que la fase G₁ tardía se controla por la pareja CDK2–ciclina E [257]. En nuestro estudio, la administración de PPI-2458 indujo un importante incremento de la ciclina D1, acompañado por una reducción significativa de la expresión de la ciclina E, sin cambios en la CDK4, CDK6 y CDK2. Resultados similares, mostrando un incremento de la expresión de la ciclina D1 y una disminución de la ciclina E, se han descrito previamente tras la administración de TNP-40 en células HUVEC. De esta manera, la sobreexpresión de la ciclina D1 está relacionada con una mayor sensibilidad de las HUVEC al TNP-470 [258]. Además, la administración de TNP-470 en células endoteliales es capaz de inducir el incremento de la ciclina D1, sin variaciones en la CDK2 y CDK4 [221].

El control de la síntesis de la ciclina D1 se ha relacionado con la proteína STAT3, siendo esta ciclina uno de los objetivos de dicho factor de transcripción cuando se activa. El papel de STAT3 en el control de la ciclina D1 se ha demostrado en modelos de mieloma y rhabdomyosarcoma [259,260]. Estos resultados están en

concordancia con nuestros datos, que muestran una disminución de la ciclina D1 debido a la coadministración de Stattic y PPI-2458.

La proteína PCNA se caracterizó originalmente como un factor de procesividad de la ADN polimerasa δ y ϵ . PCNA es una plataforma celular para múltiples proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular [261]. En células normales, los niveles de la proteína PCNA se mantienen constantes a lo largo del ciclo celular, asociada físicamente a P21 [262]. Niveles elevados de la proteína P21 se han detectado en células HUVEC tras la inducción de la parada del ciclo celular en G_1 debido a la administración TNP-470, indicando que esta proteína tiene un efecto importante en los efectos derivados de la fumagilina [218]. Además, otros autores han demostrado que el PPI-2458 es capaz de inducir una disminución de la proteína PCNA en un modelo *in vitro* de artritis reumatoide [247]. Por tanto, la disminución de los niveles de PCNA en células HepG2 derivadas de HCC tratadas con PPI-2458 a la concentración de 10 nM, que nosotros observamos en nuestros experimentos, parece consistente con la inducción de la parada del ciclo celular en G_1 .

La proteína P53 a menudo se asocia con el incremento de p21, ciclina D1 y la detención del ciclo celular [17]. Se cree que la ciclina D1 es un importante mediador de la supresión del crecimiento mediada por P53 [218,256]. De acuerdo con esta información, hemos observado que en aquellas células tratadas con PPI-2458 el incremento de la ciclina D1 va asociada al incremento de pP53 y P21. Estudios previos, *in vitro* e *in vivo*, han demostrado que el efecto anti-proliferativo del TNP-470 requiere la participación de P53 y P21 [218,256], habiéndose observado además, la sobreexpresión de p21 en células de melanoma tratadas con PPI-2458 [241].

Aunque, RB parece ser sustrato de los complejos ciclina D-CDK4/6, además puede ser fosforilado por el complejo ciclina E-CDK2. La fosforilación disocia RB de E2F, permitiendo la transcripción dependiente de éste último, y creando una retroalimentación positiva que ayuda a precipitar la entrada en fase S del ciclo celular [263,264]. En nuestro trabajo hemos encontrado un descenso significativo de los niveles de la proteína fosfo RB en células tratadas con PPI-2458, que puede estar asociado con cambios en los niveles de la ciclina E y la parada del ciclo celular. Además, se ha descrito que la vía de señalización de P53 es capaz de evitar la activación de CDK por medio de P21 y que actúa como potente inhibidor de los complejos ciclina E-CDK2 [265]. En nuestra opinión nuestros resultados, con disminución en la fosforilación de RB, podrían estar relacionados con la sobreexpresión de P21 tras la administración de PPI-2458.

La activación de la vía de AKT se ha relacionado con la inhibición de la apoptosis en células tumorales [266]. Además AKT puede influenciar negativamente la expresión de P21, prevenir la formación del complejo P21-PCNA, e inducir la replicación del ADN [267]. AKT fosforila directamente distintos componentes de la maquinaria de muerte celular, inhibiendo la actividad de la caspasa-9 [268]. En nuestros experimentos hemos detectado una disminución de fosfo AKT tras 6 días de tratamiento con PPI-2458, pudiendo relacionarse con el incremento de la actividad de la caspasa-9, aunque no se encontraron cambios a los dos y cuatro días de tratamiento.

Aunque distintos estudios apoyan la idea de que JNK, un miembro de la superfamilia de las MAPK, contribuye a la apoptosis, su efecto parece depender del tipo celular y de otras señales recibidas por la célula [269]. Se ha demostrado que la activación de la vía de señalización de JNK es un mediador común de la apoptosis en células hepáticas, y puede incrementar la expresión de los

miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, tales como Bax [142]. Además, algunos autores han descrito que P38, otro miembro de la familia MAPK, induce la activación de Bax y Bad, promoviendo la apoptosis [142,270]. Asimismo, la activación de ERK1/2 se ha relacionado con la supervivencia y la proliferación tumoral [271]. En nuestro trabajo no hemos detectado cambios ni en JNK y P38 ni en las expresiones de Bax y Bad, sugiriendo que estos miembros de la familia MAPK no son responsables de los efectos del PPI-2458 sobre las células HepG2. De todas formas, hemos encontrado una disminución en los niveles de pERK tras 2,4 y 6 días de tratamiento. Aunque no existen datos previos con el PPI-2458, resultados similares con una disminución de pERK1/2 sin cambios en p38 han sido hallados tras el tratamiento con TNP-470 en células estrelladas hepáticas [272].

La familia de proteínas Bcl-2, que incluye Bcl-2, Bax y Bad, entre otros miembros, tiene un papel fundamental en la apoptosis hepática [273]. La sobreexpresión de Bcl-2 inhibe la muerte celular, mientras Bax y Bad son capaces de incrementar el proceso apoptótico [273]. El balance entre proteínas pro- o anti-apoptóticas puede inclinar la balanza a uno u a otro lado, haciendo que la célula sobreviva o se produzca la muerte de la misma [274]. Como se ha indicado anteriormente, hemos detectado una inducción importante de la apoptosis debido a PPI-2458 tras seis días de tratamiento, observando un incremento de las caspasas -3, -8 y -9. Además, la incubación con el fármaco fue capaz de inducir una importante disminución de Bcl-2. La exposición de las células al PPI-2458 indujo un notable incremento del ratio Bax/Bcl-2, el cual se cree que controla la sensibilidad celular al estímulo apoptótico [275]. El mismo resultado se encontró cuando se calculó el ratio Bad/Bcl-2, indicando una situación pro-apoptótica tras la administración de PPI-2458. Resultados similares a los nuestros, que muestran una disminución de Bcl-2, sin cambios en la expresión en Bax y Bad, e incrementos en el ratio Bax/Bcl-2, se han

descrito previamente en HCC y en otros tipos de tumor tras la administración de compuestos tales como curcumina [276]. No obstante, no existen datos todavía disponibles en la literatura científica sobre los efectos pro-apoptóticos del PPI-2458, pero la apoptosis inducida por TNP-470 se ha descrito en distintos tipos de tumores tales como neuroblastoma, cáncer de colon y de páncreas [277,278]. Al mismo tiempo, se ha demostrado que el TNP-470 induce una disminución de la expresión de Bcl-2 en cáncer de mama [279]. Debido a que se ha descrito que AKT y ERK son capaces de conducir a la expresión de Bcl-2 [280,281], es posible que en nuestros experimentos la disminución de Bcl-2 pueda estar relacionada al menos en parte con las disminuciones de pAKT y pERK inducido por el tratamiento con PPI-2458.

Se ha descrito que la proteína STAT3 es un mediador de la supervivencia y proliferación celular que además tiene un papel importante en la transformación celular y la formación de tumores [282,283]. De todos modos, STAT3 es capaz de activar la expresión de P21, inhibiendo la progresión del ciclo celular, cuando se expresa a niveles elevados [284]. Por otro lado la activación de AKT puede, al menos en parte, evitar la inducción de P21 debida a STAT3 [173]. En nuestros experimentos, la administración de PPI-2458 ha demostrado ser capaz de incrementar la forma activada de STAT3 y, en paralelo, de la proteína P21. Además, la coadministración de PPI-2458 junto con Stattic (inhibidor de STAT3) ha demostrado inhibir ambas proteínas, STAT3 y P21. Junto con estos datos, la incubación de las células HepG2 con el fármaco estudiado ha mostrado una disminución en la forma fosforilada de AKT, evitando su efecto inhibitorio sobre P21.

Diferentes investigaciones, en modelos de artritis reumatoide o en células HUVEC, han estudiado el efecto del PPI-2458 sobre la liberación de citocinas inflamatorias [246,247]. Todos estos modelos han determinado la producción de citocinas,

quimiocinas y factores de crecimiento, y todos ellos concluyeron que la liberación de citocinas al medio no parecía estar afectada por la exposición al fármaco cuando éste era administrado a tiempos más cortos que los nuestros; así por ejemplo, en células sinoviales expuestas a diferentes concentraciones de PPI-2458 no se observó variación alguna en la cantidad de TNF α liberado al medio [246,247]. Sin embargo, en nuestros experimentos, con exposiciones al fármaco de hasta 144 h, detectamos incrementos estadísticamente significativos del ARNm de TNF α e IL-1 β en células HepG2 tratadas.

En nuestro trabajo, el incremento de fosfo STAT3 fue seguido por un aumento en la expresión de IL-1 β . En relación a esta observación, la IL-1 β ha mostrado un papel crucial en la activación de STAT3 y en producir una parada del ciclo celular en un modelo de tumor medular tiroideo [285]. Además, se ha publicado una posible relación entre IL-1 β y TNF α , habiéndose observado que la primera es capaz de inducir la expresión de TNF α [286]. Los resultados de nuestro estudio, con incrementos en la expresión de IL-1 β y TNF α de forma tiempo dependiente, parecen indicar que PPI-2458 sería capaz de incrementar la expresión de IL-1 β , y de forma indirecta la producción de TNF α .

En nuestros experimentos hemos usado Stattic como inhibidor de STAT3. Este compuesto es capaz de evitar la fosforilación de la tirosina 705 de STAT3, necesaria para su activación, dimerización y translocación al núcleo [287,288]. Algunos estudios, utilizando diversos modelos, han intentado relacionar STAT3, IL-1 β y TNF α . De este modo, un experimento utilizando macrófagos de ratón tratados con LPS (sustancia capaz de inducir la producción de TNF α e IL-1 β), reveló una posible relación entre STAT3 e IL-1 β , observándose que al bloquear STAT3 mediante la coadministración de Stattic se reducían los niveles en el ARNm de IL-1 β , pero no del TNF α [162]. Otro estudio demostró

en macrófagos y neutrófilos que carecían de STAT3, provenientes de ratones sépticos, como se incrementaba sorprendentemente la producción de muchas citocinas inflamatorias, entre las que se incluyen TNF α e IL-1 β [289,290]. Un tercer estudio en el que se utilizó AG-490, capaz de inhibir también la fosforilación de STAT3, se bloqueó el incremento de TNF α y IL-1 β cuando se co-administró con el agente pro-inflamatorio zymosan [291]. En nuestros experimentos, la inhibición de STAT3 por medio del compuesto Stattic, no fue capaz de reducir los niveles de TNF α e IL-1 β , por lo que podríamos especular sobre la posible participación de otros agentes capaces de controlar la producción de citocinas inflamatorias, entre los que se podrían incluir el factor de transcripción NF- κ B o diferentes mecanismos celulares de compensación [292,293].

Finalmente, como se ha descrito anteriormente, la proteína STAT3 se ha relacionado con el proceso angiogénico y su actor principal, el VEGF. Así, el bloqueo de STAT3, es capaz de evitar tanto la expresión de VEGF como el crecimiento, la progresión y metástasis tumoral *in vivo* en tumores pancreáticos [294]. Estos estudios previos están en concordancia con nuestras observaciones, en las cuales la incubación con PPI-2458 es capaz de inducir un incremento de fosfo STAT3 de una forma tiempo dependiente. Nuestros resultados muestran además que la activación de este factor de transcripción se correlaciona con el incremento del ARNm de VEGF, mientras que su inhibición reduce los niveles de ARNm de la molécula pro-angiogénica.

En resumen, los presentes resultados indican que el PPI-2458 es capaz de reducir la viabilidad de las células derivadas de HCC humano HepG2, induciendo una parada del ciclo celular en G₀/G₁ por una vía dependiente de P21. Además, el PPI-2458 induce apoptosis posiblemente mediada por la reducción en la activación de las vías de señalización de AKT y ERK. Junto a estos datos,

hemos sido los primeros en demostrar la activación de la proteína STAT3 tras la administración un análogo de la fumagilina. A la luz de estos hallazgos, es posible que el PPI-2458, mediante la inducción de la parada del ciclo celular y la apoptosis, pueda constituir una nueva herramienta en el tratamiento del HCC. De todos modos, es necesario continuar con la investigación sobre el presente fármaco para comprender mejor los mecanismos moleculares involucrados en su inhibición de la proliferación tumoral.

6.- SUMMARY

EFFECT OF TREATMENT WITH PPI-2458 ON CELL PROLIFERATION AND APOPTOSIS PROCESSES IN AN *IN VITRO* MODEL OF HEPATOCARCINOMA

INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most frequent cancer and the second most common cause of cancer-related mortality in the world [295]. Viral hepatitis, alcoholic cirrhosis, and nonalcoholic steatohepatitis are mostly responsible for the rising incidence of HCC in Western countries [296]. Drugs used in the treatment of HCC are cytotoxic and none of them are specific for the management of this disease, with a high risk of side effects [297]. Unfortunately, no more than 30% of patients are candidates for current therapeutic strategies, and the majority face a rather poor outlook [298]. Despite intensive research efforts, there is still controversy regarding the most appropriate therapeutic approach for HCC treatment.

In the last years, interest on the potential use of antiangiogenic drugs in cancer treatment has increased and a large number of studies have been carried out in this area [223]. Antiangiogenic agents have been approved by the FDA administration, and different phase III clinical trials using antiangiogenic drugs as liver cancer treatment or adjuvants are under way. Fumagillin, one of the firstly described inhibitors of angiogenesis, is a metabolite of *Aspergillus fumigatus fresenius*, with a potent endothelial cytostatic activity *in vitro* [258]. Fumagillin covalently binds methionine aminopeptidase 2 (MetAP2) and treatment of mammalian cells with this drug increases MetAP2 protein levels by inhibiting its turnover rate [230]. Unfortunately, prolonged administration of fumagillin is limited by a severe weight loss, explaining why it has not been used in clinical trials. This fact has led to the synthesis of new derivatives with improved antiangiogenic activities and lower

undesired effects. Our group has previously described, in an in vivo model, that administration of the fumagillin derivative TNP-470 is able to impair HCC progression by inducing cell cycle inhibition and reducing liver oxidative stress [256,299]. However, despite some initially promising data of TNP-470 in humans, the clinical development of this drug was stopped, in part, due to problems with the optimization of doses regimen for intravenous administration, neurological toxicity, and its short circulating half-life. More recently, PPI-2458, an orally active analog of the fumagillin class of irreversible MetAP-2 inhibitors, has been developed. Similarly to fumagillin and TNP-470, this drug also shows potent antiangiogenic properties, but does not cause seizures [240,247]. Although studies are still scarce, potential beneficial effects of PPI-2458 have been tested in different pathologies such as synovitis, rheumatoid arthritis, melanoma and Non-Hodgkin's lymphoma [241,245,248,249]. Because, data of PPI-2458 antitumour effects in HCC are not yet available, in the present study we investigated the antiproliferative, oncostatic and proapoptotic effects of the PPI-2458 treatment in HepG2 human HCC cells.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture, PPI-2458 treatments and reagents

Human HepG2 hepatocarcinoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Stock cells routinely were grown as monolayer cultures in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), glutamine (4 mM) and pyruvate (100 µg/mL) in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C and the medium was changed every other day. Cells were maintained in T75 culture flasks and subcultured once per week in a total volume of 10 mL of complete medium.

Cell culture reagents were from Gibco (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). Culture flasks and dishes were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Other reagents were obtained from Sigma (St Louis, MO, USA), unless otherwise indicated. PPI-2458, ([[1 R]-1-Carbamoyl-2-methyl-propyl]-carbamic acid-(3R, 4S, 5S, 6R)-5-methoxy-4-[(2R,3R)-2-methyl-3-(3-methyl-but-2-enyl)-oxiranyl]-1-oxa-spiro[2.5]oct-6-yl ester) was kindly provided by GlaxoSmithKline (London, UK). The molecular structure of PPI-2458 has been previously published by Bernier et al [247].

HepG2 cells growing in complete media were replated in the adequate culture recipient. After 24h, the plating medium was replaced with fresh medium containing the appropriate concentrations of PPI-2458 (10 nM – 1000 nM) dissolved in 0.2% ethanol for 2, 4 and 6 days. Control-untreated cells were incubated with culture medium, and vehicle-treated cells received 0.2% ethanol for 2, 4 and 6 days. The control and 2, 4 and 6 days treated groups had renewal of the medium every 48 h. All experiments were performed by triplicate.

Cell viability assay

For the MTT cell viability, confluent HepG2 cells were replated in 24 wells culture plate, at a density of 15,000 cell/well, in a total volume of 1 mL of complete medium. The MTT assay was carried out as described by Denizot and Lang [250]. Briefly, After exposure of cells to PPI-2458, culture media was changed by free serum culture media. 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) dissolved in phosphate buffer saline (PBS) was added to each well. MTT in free serum media was incubated for 3 hours. After this interval, free serum culture media containing MTT was discarded and DMSO was added to each well dissolving the precipitate. The optical densities were measured at 560 nm spectral wavelength using microtiter plate reader

(Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA).

Flow cytometry analysis of cell cycle distribution (FACS)

Confluent HepG2 cells growing in complete media were replated in 25 cm² culture flask, at a density of 400,000 cells/flask, in a total volume of 5 mL of complete medium. After treatment, cells were trypsinized and washed with ice-cold PBS and centrifuged 5 min (1500 rpm) at 4°C. The cells were washed twice in ice-cold PBS and fixed in 70% ethanol for 24 h at -20°C. Samples were rehydrated with PBS and the cells were incubated 30 min at room temperature with propidium iodide staining solution in PBS containing 0.2 mg/mL propidium iodide and 100 µg/mL DNase-free RNase A (Fermentas, Burlington, Canada). Using red propidium-DNA fluorescence, 10,000 events were acquired with a FACS SCAN Flow Cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) for each sample and the percentage of cells in G₀/G₁, S, and G₂/M phases of the cell cycle was determined by the ModFit LT analytical software (Verity Software House, Topsham, ME, USA.).

Caspase-3, -8 and -9 activities assays

Cells were plated in a 6 well culture plate at a density of 150,000 cells/well. After 24 h, the culture media were removed from the cultured cells and the cells were exposed then to PPI-2458 (10 nM) for 2, 4, and 6 days changing culture medium with treatment every other day. Treatment was accomplished with 0.2% ethanol. Control-untreated cells were incubated with culture medium for 6 days changing the culture medium every other day. The control cultured cells were incubated with culture media supplemented with ethanol 0.2% for 6 days. After incubation, cultured cells were washed twice with ice cold PBS and cells were lysed by adding in IPB-7 (1mg/mL phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1mg/mL trypsin inhibitor, 1mg/mL aprotinin, 1mg/mL leupeptin,

1mg/mL pepstatin, 1mmol/L Na_3VO_4 , and 1mmol/L NaF) and scraped off the plate. The extract was transferred to a microfuge tube and centrifuged for 20 min at 14000 rpm. The supernatants were collected and stored at -20°C . The cell lysates were incubated for 60 min at 37°C in a buffer 20 mM Hepes, glicerol 10%, DTT 2 mM, pH= 7.5 containing 100 μM concentration of the specific fluorogenic substrates 7-amino-4-methylcoumarin N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valil-L-aspartic acid amide (Ac-DEV-AMC), 7-amino-4-trifluoromethylcoumarin N-acetyl-L-isoleucyl-L-glutamyl-L-threonyl-L-aspartic acid amide (Ac-IETD-AFC) and 7-amino-4-methylcoumarin N-acetyl-L-leucyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-aspartic acid amide (Ac-LEHD-AMC) for caspase-3, -8 and -9 respectively (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA). Cleavage of the fluorescent caspase-3, -8 and -9 substrates were monitored using fluorescence microtiter plate reader (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) at excitation/emission wavelengths of 360/460 nm for caspase-3, 400/505 nm for caspase-8 and 380/505nm for caspase-9 activity assays respectively. Activity was expressed as fluorescence units per milligram of protein per min of incubation.

Western blot analysis

Confluent HepG2 cells growing in complete media were replated in 6 well culture plates, at a density of 150,000 cells/well, in a total volume of 2 mL of complete medium. After treatment, cultured cells were washed twice with ice cold PBS and lysed in IPB-7 (1mg/mL phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1mg/mL trypsin inhibitor, 1mg/mL aprotinin, 1mg/mL leupeptin, 1mg/mL pepstatin, 1mmol/L Na_3VO_4 , and 1mmol/L NaF) and scraped off the plate. The extract was transferred to a microfuge tube and centrifuged for 20 min at 14,000 g. The supernatants were collected and stored at -20°C , and protein concentration was determinate by Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

For western blot analysis, equal amounts of protein were separated by sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis for 1.5 h at 100 V and the membranes were blotted by wet transfer (100 V 1,5h 4°C) on polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). The membranes were then blocked with 2.5% non dry fat milk in phosphate buffered saline containing 0.05% Tween 20 (Bio-Rad) (PBS-T) for 1 h at RT. The membranes were probed with a primary antibody overnight at 4°C in PBS-T containing 2.5% non-fat dry milk. Except for P21 (Cell Signaling, Beverly, MA, USA), primary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Equal loading of protein was demonstrated by probing the membranes with a rabbit anti actin polyclonal antibody (1:2000) dilution. After washing with PBS-T bound primary antibody was detected with horseradish peroxidase (HPR)-conjugated anti-goat antibody (Dako, Glostrup, Denmark) and blots were developed using an enhanced chemiluminescence detection system (Santa Cruz Biotechnology). Densitometry analysis of specific bands was performed by Scion Image software (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

Real-Time RT-PCR

For the Real-Time RT-PCR, confluent HepG2 cells growing in complete media were replated in 6 well culture plates at a density of 150,000 cell/well, in a total volume of 2 mL of complete medium. After treatment total RNA was obtained by using a Trizol reagent (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) and quantified by spectrophotometry (Nanodrop 1000, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Residual genomic DNA was removed by incubating RNA with RQ1 RNase-free DNase (Promega, Madison, WI, USA). First-standard cDNA was synthesized using

High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). The negative control (no transcriptase control) was performed in parallel. cDNA was amplified using FastStartTaqMan Probe Master (Roche, Basel, Switzerland) on an StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). TaqMan primers and probes for TNF α (GenBank accession No. NM_000594.2 and Hs00174128_m1), IL-1 β (GenBank accession No. NM_000576.2 and Hs01555410_m1), VEGF (GenBank accession No. NM_001025366.2 and Hs00900055_m1) and, GADP (GenBank accession No. NM_002046.3 and 4326317E) genes were derived from the commercially available TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Relative changes in gene expression levels were determined using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method described previously by Livak and Schmittgen [254]. The cycle number at which the transcripts were detectable (CT) was normalized to the cycle number of GADP detection, referred to as ΔCT .

Statistical analysis

Results are expressed as mean values \pm SEM. Data were compared by analysis of variance (ANOVA); when the analysis indicated the presence of a significant difference, the means were compared with the Newmann Keuls test. Significance was accepted at $p < 0.05$. Values were analyzed using the statistical package SPSS+ 19.0 (IBM, Chicago, IL, USA).

RESULTS

In order to assess the effects induced by PPI-2458 on cell viability, MTT test assays were performed. Following administration of the fumagillin derivative, cell viability was not reduced by 1 nM drug treatment at two days, but a significant reduction was observed at PPI-2458 concentrations from 10 to 1000 nM. Growth inhibition of HepG2 cells was time-dependent,

and reached a maximum in cells treated for 6 days at all PPI-2458 tested concentrations (Fig. 11). At this point, we decided to study whether PPI-2458-mediated cell growth inhibition was accompanied by changes in cell cycle kinetics and/or induction of apoptosis at the lowest dose capable to reduce significantly cell viability at all times analyzed (10 nM).

A study of cell cycle phase distribution was performed, using flow cytometry and propidium iodide staining, to determine whether this fumagillin derivative affected the cycle kinetics. After acquiring 10,000 events, a significant increase in the number of cells in G_0/G_1 induced by 10 nM PPI-2458 treatment was apparent. This effect was accompanied by a decrease in the percentage of cells in the S phase, while there was no significant decrease in the G_2/M cell percentage (Fig. 12).

Complementary analysis of cell cycle markers was performed by Western blot to assess whether PPI-2458 was able to induce a G_1 early or G_1 late cell cycle arrest. Cyclin D1, cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) were analyzed as early G_1 markers. No differences were found in CDK4 and CDK6 (Fig. 13 & 14) protein expression at the different time points analyzed following PPI-458 administration, but a significant time-dependent increase in cyclin D1 was observed (Fig. 15). Moreover, to study G_1 -late phase, expression of cyclin E, CDK2, P21, and PCNA was also analyzed by Western blot. Results indicated a significant time-dependent decrease in cyclin E expression (Fig. 16), but no changes induced by 10 nM PPI-2458 treatment were found in CDK2 protein (Fig. 17). Furthermore, P21 which is a potent inhibitor of cell cycle kinases related to this phase of cell cycle, and capable to regulate negatively the cell cycle progression, showed a time-dependent increase (Fig. 18). Finally, expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) a nuclear

protein synthesized in the late G₁ and early S-phase, decreased significantly (Fig. 19).

To assess whether apoptosis was activated by PPI-2458 treatment, we analyzed if cell growth inhibition was accompanied by induction of apoptosis at the lowest dose capable to significantly reduce cell viability. Induction of caspase-8 and/or caspase-9 is related to the activation of the downstream effector caspase-3, which is the common event initiated by multiple pro-apoptotic stimuli. For this reason, we examined the activity of caspase-3, caspase-8 and caspase-9, by measuring cleavage of specific fluorogenic substrates. Treatment with PPI-2458 resulted in a marked increase of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 activities (Table II). Furthermore, a reduction of the anti-apoptotic Bcl-2 protein expression was induced at 2, 4 and 6 days of treatment (Fig. 20), without changes in Bax and Bad protein expression (Fig. 26). Consequently, significant increases in the Bax/Bcl-2 and Bad/Bcl-2 ratios were found, indicating a pro-apoptotic situation after PPI-2458 administration (Fig. 27).

Because P21 is an important downstream effector of P53, we decided to study expression of P53 and its phosphorylated form pP53. A significant increase in pP53 was found at 4 and 6 days of treatment, but not changes in total P53 expression were detected (Fig. 20). P21 is able to prevent the downstream phosphorylation of retinoblastoma protein (RB), allowing RB to sequester E2F, and eventually preventing the entry of the cell into S-phase. Data obtained show a significant decrease of RB phosphorylation from the second day of treatment (Fig. 21).

Activation of protein kinase B (AKT) has been related to tumour proliferation, Bcl-2 upregulation and survival, and also linked to the sequestration of P21. In our work, modifications of the AKT pathway were found in PP-2458-treated cells, with a

significant decrease of phospho-AKT after 6 days of treatment (Fig. 22). Because Bcl-2 family proteins such as Bad, Bax or Bcl-2 are related to mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, possible modifications of MAPKs expression induced by PPI-2458 administration were also investigated. No changes were detected in P38 (Fig. 23) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) proteins (Fig. 24). However, a significant reduction of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK) was found beginning at 2 days of PPI-2458 administration (Fig. 25).

The Signal Transduction and Activator of Transcription 3 (STAT3) is frequently activated in tumor cells, playing a critical role in survival, proliferation, angiogenesis and chemoresistance. However, activation of STAT3 has also been related with cell cycle arrest. Thus, we measured phosphorylated and total protein levels of STAT3. No change in total STAT3 expression was detected, but a significant increase in the active form of STAT3 was found at 4 and 6 days of treatment (Fig. 28). Once activated, STAT3 translocates to the nucleus, where it binds to the promoter regions of different target genes, including Cyclin D1 and P21. To determine the role of this transcription factor in the increased expression of both cell cycle markers following PPI-2458 administration, we used a STAT3 phosphorylation inhibitor, Stattic (STAT3 inhibitory compound, 6-Nitrobenzo[b]thiophene 1,1-dioxide). This compound avoids tyrosine 705 phosphorylation of STAT3 protein, which is essential for its dimerization and translocation into the nucleus where it can activate specific target genes. The use of the inhibitor alone or in combination with PPI-2458 resulted in a significant decrease of p-STAT3, cyclin D1 and P21 protein levels at 4 days of treatment (Fig. 29).

The study of PPI-2458 has been also linked with its effect on inflammatory cytokine release from cells or tissues. Therefore, we decided to investigate whether PPI-2458 might exert effects on

mRNA expression of inflammatory cytokines. Thus, we measured the mRNA levels of TNF α and IL-1 β after 2, 4 and 6 days in the presence of PPI-2458 in cell culture media. The mRNA levels of these cytokines were importantly increased at 4 and 6 days by the fumagilin-derivative (Fig. 30 & 31). To further investigate the role of STAT3 on cytokine release, cells were incubated with Stattic in the presence or absence of PPI-2458 at the indicated times. Surprisingly, IL-1 β mRNA expression was increased by Stattic and PPI-2458 coadministration at 2 and 4 days (Fig. 33), while there was no influence on mRNA levels of TNF α (Fig. 32).

VEGF has a leading role in angiogenesis, as well as STAT3, playing both of them a main function in the formation of new blood vessels in tumors. Furthermore, it has been previously reported a direct regulation of VEGF by STAT3 protein. Our previous observation, showing a STAT3 activation, leads us to measure the mRNA VEGF levels. In this way, we detected a time dependent increase on VEGF mRNA levels, although significant values were found only at 4 and 6 days of cell treatment with 10 nM PPI-2458 (Fig. 34). To further determine the effect of STAT3 activation on VEGF expression, HepG2 cells were incubated with Stattic in presence or absence of PPI-2458 for 2 and 4 days. The analysis of the mRNA from the samples showed a significant decrease of VEGF mRNA expression by incubation of HepG2 hepatocarcinoma cells co-treated with Stattic and PPI-2458 (Fig. 35).

DISCUSSION

Our research demonstrates that PPI-2458 was able to inhibit proliferation and cell cycle progression, while inducing apoptosis, when this drug was present in the culture media for 2 to 6 days. Maximal inhibition of cell proliferation was observed from a

10 nM PPI-2458 concentration. These results are in accordance with studies which reported inhibition of proliferation by the drug in other tumour cell types. Thus, it has been previously found that PPI-2458 inhibits proliferation of B16F10 melanoma cells, with a maximal effect at doses over 10 nM [241]. Furthermore, PPI-2458 has antiproliferative effects in normal and transformed germinal center Non-Hodgkin's lymphoma cell lines such as D10, H2 SU-DHL-16, DB, ST486 Ramos or SR, when the drug is administered at different doses (1-100 nM), with all MetAP-2 molecules occupied by the drug at concentrations over 10 nM [249]. When cell cycle kinetics was analyzed in 10 nM PPI-2458 treated-cells, we found a significant increase in the percentage of cells in the G_0/G_1 phase, indicating cell cycle arrest in this phase. Previous research has shown that fumagillin and related MetAP-2 inhibitors induce cell cycle arrest in the G_0/G_1 phase in HUVEC cells [218,231]. Furthermore, our group has reported similar effects by TNP-470 in an in vivo HCC model [256]. Present results clearly indicate that PPI-2458 maintains in human HCC cells the fumagillin-related ability to inhibit cell cycle progression in a time-dependent manner.

The mechanism through which PPI-2458 is able to modify cell cycle kinetics and to reduce tumour cell proliferation remains elusive. Cell cycle control depends on a complicated protein machinery in which different members of the cyclin-dependent kinases family, in association with specific cyclins, are activated throughout the cell cycle [263]. In our study, administration of PPI-2458 induced an increase in cyclin D1, accompanied by a significant reduction in cyclin E expression, but with no changes of their respective counterparts CDK4, CDK6 and CDK2. Similar results, with an increase of cyclin D1 expression and decrease of cyclin E, have been previously reported following administration of TNP-470 in HUVEC cells [258]. Moreover, it has been shown that TNP-470

administration induces in endothelial cells increases of cyclin D1, without changes in CDK2 and CDK4 [221].

Increased P21 expression following PPI-2458 administration agrees with the previous reports of elevated P21 protein levels in HUVEC cells after TNP-470-induced G₁ arrest [218,231], and P21 overexpression in melanoma cells treated with PPI-2458 [241]. Moreover, treatment with the antiangiogenic drug resulted in a reduced expression of PCNA, a cellular platform for multiple proteins involved in cell cycle regulation, which is down-regulated by P21 in differentiated cells arrested in G₁ [300]. Therefore, the significant down-regulation of PCNA in growth-inhibited HepG2 cells is consistent with PPI-2458-induced cell cycle arrest. A proper G₁ arrest mediated by P53 often associates with up-regulation of P21 [301]. Our results showing an increase in pP53 and a parallel overexpression of P21 are in agreement with previous in vitro and in vivo findings that the antiproliferative effect of TNP-470 requires P53 and P21 [218,231,256]. Furthermore, P21 can prevent RB phosphorylation, avoiding E2F dissociation and the posterior transcription induction which precipitates S phase [263]. RB activation could be achieved by the activated complex cyclin-E-CDK2, and P21 is able to prevent CDK activation [263,265]. We found a significant decrease of pRB protein levels in PPI-2458-treated cells, which could be associated to the changes in cyclin E expression and cell cycle arrest, and related to P21 overexpression.

Proliferation and apoptosis are closely linked in the development of HCC, and molecular-targeted drugs with growth inhibitory effects associated to induction of apoptosis are being introduced among the therapeutic options for HCC patients [302]. Apoptosis induction by TNP-470 has been described in different tumour types such as neuroblastoma, colon or pancreas cancers [277,278]. Those data are in agreement with our results showing increases in caspase-3, -8 and -9 activities after 6 days of

incubation with PPI-2458. Members of the Bcl-2 protein family which include Bcl-2, Bax, and Bad, among others, are the most important proteins involved during liver apoptosis regulation [273]. It is known that Bcl-2 over-expression inhibits cell death, whereas Bax and Bad enhance the apoptotic process [273]. The pro- or anti-apoptotic balance could switch to one side or another leading towards cell survival or apoptosis [274,303]. The marked increase found in the Bax/Bcl-2 and Bad/Bcl-2 ratios confirms the pro-apoptotic situation after PPI-2458 administration. Data showing Bcl-2 down-regulation, no changes on Bax or Bad expression, and increases in the Bax/Bcl-2 ratio, have been previously described in HCC and other different tumour types following administration of drugs such as curcumin [276], [304,305]. AKT and ERK pathways activation have been traditionally linked to survival and proliferation [266,271], and both pathways are able to promote Bcl-2 expression [280,281]. On the contrary, activation of the JNK and P38 signaling pathway has been associated to up-regulation of different proapoptotic Bcl-2 family members such as Bax and Bad [142,270,301]. We found a decrease of pAKT and pERK after PPI-2458 treatment, which could be related, at least in part, to Bcl-2. No changes were observed either in JNK and P38 or Bax and Bad expressions, suggesting that these members of the MAPK family are not responsible for PPI-2458 effects in HepG2 cells. Although no previous data on PPI-2458 are available, TNP-470 has been reported to down-regulate AKT in the chicken chorioallantoic membrane [306], and a specific down-regulation of pERK1/2 without changes in P38 expression has been found in TNP-470-treated stellate liver cells [272].

STAT3 protein is a mediator of cell survival and proliferation that plays important roles in cellular transformation and tumorigenesis [282,283]. A controlling role of STAT3 over cyclin D1 and P21, and an inhibition cell-cycle progression has been demonstrated in different experimental models [259,260,284]. We

have shown that PPI-2458 administration increases the activated form of STAT3 in parallel to increases in P21 and cyclin D protein expression. Activation of AKT could, at least in part, avoid induction of P21 by STAT3 protein [173], but this inhibitory effect would be impaired by the decrease in pAKT induced by the antiangiogenic drug. To further elucidate the role played by STAT3 in the antiproliferative effect of PPI-2458, Stattic was used to block STAT3 activation. This compound is able to prevent Tyr 705 phosphorylation of STAT3, which is necessary for activation, dimerization and translocation into the nucleus of this transcription factor [287,288]. The use of the inhibitor in combination with PPI-2458 resulted in a significant decrease of pSTAT3, cyclin D1 and P21 protein levels.

Some authors, in a model of rheumatoid arthritis or in HUVEC cells, have studied the effect of PPI-2458 on inflammatory cytokine release [246,247]. All of these models have assessed the production of cytokines, chemokines and growth factors, and all of them have concluded that cytokine release to the media were not affected by PPI-2458 exposure, i.e synovial cell exposed to PPI-2458 at different concentrations did not change the amount of TNF α released to the media [246,247]. However, we have to point out that incubation times in all of these studies were shorter than in our experiments, which reach a maximum of 144 hours. Thus, the measurement of TNF α and IL-1 β mRNA levels on HepG2 cells treated with PPI-2458 at 2, 4 and 6 days revealed not invariable cytokine levels during the time of incubation, but a dramatic increase due to fumagillin-analog administration.

Moreover, in our work the increase on phospho STAT3 was accompanied by an overexpression of IL-1 β . In this way, IL-1 β has shown a main role activating STAT3 and driving cell cycle arrest in a model of medullary thyroid carcinoma cells [285]. Therefore, we can suggest that, in our *in vitro* model of HCC, these facts are also

related to the cell cycle arrest observed by PPI-2458 administration. Treatment of HepG2 hepatocarcinoma cells with the fumagilin-analog caused an increase in both mRNA cytokines, IL-1 β and TNF α , in a time dependent manner. Since it has been published that TNF α could be induced by IL-1 β [286], we could speculate about the possible relation between both molecules.

In our experiments the STAT3 inhibitor, Stattic, has been used to avoid STAT3 activation. This compound is able to prevent Tyr 705 phosphorylation of STAT3, which is necessary for activation, dimerization and translocation into the nucleus of this transcription factor [287,288]. In this way, a study using murine macrophages, revealed a possible link between STAT3 and IL-1 β , showing a reduction on IL-1 β mRNA, whereas no effect was observed in TNF α mRNA when the cells were co-incubated with LPS and Stattic [162]. Other paper reported, surprisingly, that septic mice macrophages and neutrophils lacking STAT3 showed increases on the production of several inflammatory cytokines, including TNF α and IL-1 β [289,290]. Furthermore, another study using AG-490, which is able to inhibit STAT3 phosphorylation, avoided the increase of TNF α and IL-1 β when co-administered with zymosan, an inflammation induction agent [291]. Because in our experiments, STAT3 inhibition by Stattic was not able to reduce TNF α and IL-1 β mRNA, we can speculate about the possible role of other different nuclear factors controlling inflammatory cytokine release, including NF- κ B or different compensatory cellular mechanisms [292,293].

As described previously, STAT3 has been related with the angiogenic process and its main actor, VEGF. Furthermore, blockade of activated STAT3 suppresses both VEGF expression and tumor growth and metastasis *in vivo* [294]. These previous results are in concordance with our observation, showing that PPI-2458 incubation is able to induce phospho STAT3 increase in a time-

dependent manner. We have found that the activation of this transcription factor was correlated with increased VEGF mRNA levels, while its inhibition was capable to reduce mRNA levels of the key angiogenic molecule.

7.- CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

FIRST CONCLUSION:

The treatment of hepatocarcinoma HepG2 cells with PPI-2458 for 6 days is able to drive a time dependant growth inhibition at a concentration of 10 nM. Higher concentrations of PPI-2458 do not induce a more significant increase on growth reduction.

SECOND CONCLUSION:

Flow citometry and protein markers confirm that PPI-2458 drives a late G1 cell cycle arrest on HCC cells, showing the cytostatic effect of the drug at the concentration of 10 nM.

THIRD CONCLUSION:

Treatment of HepG2 cells with PPI-2458 induces apoptosis, at a concentration of 10 nM. The drug is also able to produce a pro-apoptotic swift of Bcl-2 family proteins, and decreases in phospho-ERK and phospho-AKT proteins, usually associated with growth and proliferation.

FOURTH CONCLUSION:

Late G₁ cell cycle arrest induced by PPI-2458 administration on HepG2 cells is driven, at least in part, through STAT3 activation. This transcription factor increases P21 and cyclin D1 protein expression, leading to cell cycle arrest.

FIFTH CONCLUSION:

TNF α and IL-1 β mRNA levels are increased due to PPI-2458 administration. STAT3 does not affect TNF α mRNA production, but it could be necessary to control IL-1 β mRNA synthesis.

SIXTH CONCLUSION:

PPI-2458 is able to drive, through STAT3 activation, the increase in VEGF mRNA production.

GENERAL CONCLUSION:

In summary, the present findings indicate that PPI-2458 is able to reduce the viability of human hepatocarcinoma HepG2 cells, inducing G₀/G₁ cell cycle arrest. STAT3 could at least in part drive the overexpression of Cyclin D1 and P21, leading to the cell cycle arrest mediated by PPI-2458 administration in HCC cells. In the light of these findings, it is possible that PPI-2458, may offer a possible treatment for HCC. However, more experimental studies are necessary to understand the molecular mechanisms involved in the inhibition of HCC proliferation by PPI-2458.

CONCLUSIÓN PRIMERA:

El tratamiento de las células HepG2, derivadas de hepatocarcinoma, durante 6 días con PPI-2458 a una dosis de 10 nM es capaz de inducir una inhibición del crecimiento de manera tiempo dependiente. El incremento en las concentraciones de fármaco no aumenta de manera significativa la reducción en el crecimiento celular.

CONCLUSIÓN SEGUNDA:

La utilización de citometría de flujo y el estudio de marcadores proteicos confirma que el PPI-2458 produce una parada del ciclo celular en la fase G₁ tardía, demostrando el efecto citostático del fármaco a la concentración de 10 nM.

CONCLUSIÓN TERCERA:

El tratamiento de las células HepG2 con PPI-2458 a la concentración de 10 nM induce apoptosis. Dicha apoptosis está relacionada con los cambios observados en la proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, junto con la disminución de los niveles de las formas fosforiladas de las proteínas ERK y AKT, que normalmente asociadas con el proliferación y el crecimiento.

CONCLUSIÓN CUARTA:

La parada del ciclo celular en la fase G₁ tardía, por la administración de PPI-2458 es debida, al menos en parte, a la activación de STAT3, que induce el incremento de P21 y de Ciclina D1.

CONCLUSIÓN QUINTA:

Los niveles de ARNm de TNF α e IL-1 β se incrementan debido a la administración de PPI-2458. Aunque la proteína STAT3 no parece necesaria para la producción del ARNm de TNF α , se la ha relacionado con el control de la síntesis del ARNm de IL-1 β .

CONCLUSIÓN SEXTA:

A través de la activación de STAT3, el PPI-2458 induce el incremento de la producción del ARNm de VEGF.

CONCLUSIÓN GENERAL:

En resumen, los presentes hallazgos indican que el PPI-2458 es capaz de reducir la viabilidad de las células derivadas de hepatocarcinoma humano HepG2, induciendo una parada del ciclo celular en la fase G₀/G₁. La proteína STAT3 puede, al menos en parte, producir la sobre-expresión de la ciclina D1 y de P21, conduciendo a la detención del ciclo celular, cuando se administra PPI-2458 a las células derivadas de HCC. Aunque son necesarios más estudios experimentales para elucidar los mecanismos moleculares involucrados en la inhibición de la proliferación del HCC debido al fármaco objeto de estudio, nuestros resultados indican que el PPI-2458 puede ofrecer nuevas oportunidades terapéuticas en el tratamiento del HCC.

8.- BIBLIOGRAFÍA

-
- [1] El-Serag HB, Rudolph KL (2007) Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 132:2557-2576.
- [2] Kamangar F, Dores GM, Anderson WF (2006) Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 24:2137-2150.
- [3] Moradpour D, Blum HE (2005) Pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17:477-483.
- [4] Aravalli RN, Steer CJ, Cressman EN (2008) Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 48:2047-2063.
- [5] Blum HE (2005) Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention. *World J Gastroenterol* 11:7391-7400.
- [6] Cramp ME (1999) Hbv + Hcv = Hcc?. *Gut* 45:168-169.
- [7] Boffetta P, Matisane L, Mundt KA, Dell LD (2003) Meta-analysis of studies of occupational exposure to vinyl chloride in relation to cancer mortality. *Scand J Work Environ Health* 29:220-229.
- [8] Tsukuma H, Hiyama T, Oshima A, Sobue T, Fujimoto I, Kasugai H, Kojima J, Sasaki Y, Imaoka S, Horiuchi N (1990) A case-control study of hepatocellular carcinoma in Osaka, Japan. *Int J Cancer* 45:231-236.
- [9] Soini Y, Chia SC, Bennett WP, Groopman JD, Wang JS, DeBenedetti VM, Cawley H, Welsh JA, Hansen C, Bergasa NV et al. (1996) An aflatoxin-associated mutational hotspot at codon 249 in the p53 tumor suppressor gene occurs in hepatocellular carcinomas from Mexico. *Carcinogenesis* 17:1007-1012.
- [10] Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, Decarli A, Trevisi P, Ribero ML, Martelli C et al. (2002) Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 155:323-331.
- [11] Hashimoto E, Taniai M, Kaneda H, Tokushige K, Hasegawa K, Okuda H, Shiratori K, Takasaki K (2004) Comparison of hepatocellular carcinoma patients with alcoholic liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 28:164S-168S.
- [12] Wideroff L, Gridley G, Mellekjaer L, Chow WH, Linet M, Keehn S, Borch-Johnsen K, Olsen JH (1997) Cancer incidence in a population-based cohort of patients hospitalized with diabetes mellitus in Denmark. *J Natl Cancer Inst* 89:1360-1365.
- [13] Regimbeau JM, Colombat M, Mognol P, Durand F, Abdalla E, Degott C, Degos F, Farges O, Belghiti J (2004) Obesity and diabetes as a risk factor for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 10:S69-73.

- [14] Yu MW, Hsieh HH, Pan WH, Yang CS, CHen CJ (1995) Vegetable consumption, serum retinol level, and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 55:1301-1305.
- [15] Kurozawa Y, Ogimoto I, Shibata A, Nose T, Yoshimura T, Suzuki H, Sakata R, Fujita Y, Ichikawa S, Iwai N et al. (2005) Coffee and risk of death from hepatocellular carcinoma in a large cohort study in Japan. *Br J Cancer* 93:607-610.
- [16] Thorgeirsson SS, Grisham JW (2002) Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 31:339-346.
- [17] Chen X, Cheung ST, So S, Fan ST, Barry C, Higgins J, Lai KM, Ji J, Dudoit S, Ng IO et al. (2002) Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol Biol Cell* 13:1929-1939.
- [18] Delpuech O, Trabut JB, Carnot F, Feuillard J, Brechot C, Kremsdorf D (2002) Identification, using cDNA macroarray analysis, of distinct gene expression profiles associated with pathological and virological features of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 21:2926-2937.
- [19] Goldenberg D, Ayesh S, Schneider T, Pappo O, Jurim O, Eid A, Fellig Y, Dadon T, Ariel I, de Groot N et al. (2002) Analysis of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma using cDNA arrays. *Mol Carcinog* 33:113-124.
- [20] Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Nakamura Y (2001) Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res* 61:2129-2137.
- [21] Shirota Y, Kaneko S, Honda M, Kawai HF, Kobayashi K (2001) Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. *Hepatology* 33:832-840.
- [22] Xu L, Hui L, Wang S, Gong J, Jin Y, Wang Y, Ji Y, Wu X, Han Z, Hu G (2001) Expression profiling suggested a regulatory role of liver-enriched transcription factors in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 61:3176-3181.
- [23] Xu XR, Huang J, Xu ZG, Qian BZ, Zhu ZD, Yan Q, Cai T, Zhang X, Xiao HS, Qu J et al. (2001) Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15089-15094.
- [24] Raidl M, Pirker C, Schulte-Hermann R, Aubele M, Kandioler-Eckersberger D, Wrba F, Micksche M, Berger W, Grasl-Kraupp B (2004) Multiple chromosomal abnormalities in human liver (pre)neoplasia. *J Hepatol* 40:660-668.
- [25] Roncalli M (2004) Hepatocellular nodules in cirrhosis: focus on diagnostic criteria on liver biopsy. A Western experience. *Liver Transpl* 10:S9-15.
- [26] Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3:415-428.

- [27] Bird A (2007) Perceptions of epigenetics. *Nature* 447:396-398.
- [28] Pang A, Ng IO, Fan ST, Kwong YL (2003) Clinicopathologic significance of genetic alterations in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 146:8-15.
- [29] Liew CT, Li HM, Lo KW, Leow CK, Chan JY, Hin LY, Lau WY, Lai PB, Lim BK, Huang J et al. (1999) High frequency of p16INK4A gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 18:789-795.
- [30] Kanai Y, Ushijima S, Hui AM, Ochiai A, Tsuda H, Sakamoto M, Hirohashi S (1997) The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer* 71:355-359.
- [31] Schagdarsurengin U, Wilkens L, Steinemann D, Flemming P, Kreipe HH, Pfeifer GP, Schlegelberger B, Dammann R (2003) Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 22:1866-1871.
- [32] Zhong S, Tang MW, Yeo W, Liu C, Lo YM, Johnson PJ (2002) Silencing of GSTP1 gene by CpG island DNA hypermethylation in HBV-associated hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res* 8:1087-1092.
- [33] Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS, Jackson P, Groopman JD, Manning JE, Harris CC, Herman JG (2001) SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet* 28:29-35.
- [34] Shih YL, Shyu RY, Hsieh CB, Lai HC, Liu KY, Chu TY, Lin YW (2006) Promoter methylation of the secreted frizzled-related protein 1 gene SFRP1 is frequent in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 107:579-590.
- [35] Wang L, Wang WL, Zhang Y, Guo SP, Zhang J, Li QL (2007) Epigenetic and genetic alterations of PTEN in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 37:389-396.
- [36] Kondo Y, Shen L, Suzuki S, Kurokawa T, Masuko K, Tanaka Y, Kato H, Mizuno Y, Yokoe M, Sugauchi F et al. (2007) Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res* 37:974-983.
- [37] Choi MS, Shim YH, Hwa JY, Lee SK, Ro JY, Kim JS, Yu E (2003) Expression of DNA methyltransferases in multistep hepatocarcinogenesis. *Hum Pathol* 34:11-17.
- [38] Di Gioia S, Bianchi P, Destro A, Grizzi F, Malesci A, Laghi L, Levrero M, Morabito A, Roncalli M (2006) Quantitative evaluation of RASSF1A methylation in the non-lesional, regenerative and neoplastic liver. *BMC Cancer* 6:89.
- [39] Oh BK, Kim H, Park HJ, Shim YH, Choi J, Park C, Park YN (2007) DNA methyltransferase expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological correlation. *Int J Mol Med* 20:65-73.

- [40] Lee S, Lee HJ, Kim JH, Lee HS, Jang JJ, Kang GH (2003) Aberrant CpG island hypermethylation along multistep hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol* 163:1371-1378.
- [41] Okano M, Xie S, Li E (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 19:219-220.
- [42] Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99:247-257.
- [43] Lin CH, Hsieh SY, Sheen IS, Lee WC, Chen TC, Shyu WC, Liaw YF (2001) Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* 61:4238-4243.
- [44] Saito Y, Kanai Y, Nakagawa T, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S (2003) Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer* 105:527-532.
- [45] Morgan DO (2007) *The Cell Cycle; Principles of Control*. New Science Press, London.
- [46] van den Heuvel S (2005) Cell-cycle regulation. *WormBook*:1-16.
- [47] Malumbres M, Barbacid M (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30:630-641.
- [48] Chen HH, Wang YC, Fann MJ (2006) Identification and characterization of the CDK12/cyclin L1 complex involved in alternative splicing regulation. *Mol Cell Biol* 26:2736-2745.
- [49] Malumbres M, Barbacid M (2001) To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1:222-231.
- [50] Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC (1999) Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 98:859-869.
- [51] Lundberg AS, Weinberg RA (1998) Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* 18:753-761.
- [52] Hochegger H, Takeda S, Hunt T (2008) Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:910-916.
- [53] Malumbres M, Barbacid M (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9:153-166.
- [54] Besson A, Dowdy SF, Roberts JM (2008) CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 14:159-169.
- [55] Ortega S, Malumbres M, Barbacid M (2002) Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1602:73-87.

- [56] Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13:1501-1512.
- [57] Borriello A, Cucciolla V, Oliva A, Zappia V, Della Ragione F (2007) p27Kip1 metabolism: a fascinating labyrinth. *Cell Cycle* 6:1053-1061.
- [58] Child ES, Mann DJ (2006) The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle* 5:1313-1319.
- [59] Rodriguez-Vilarrupla A, Jaumot M, Abella N, Canela N, Brun S, Diaz C, Estanyol JM, Bachs O, Agell N (2005) Binding of calmodulin to the carboxy-terminal region of p21 induces nuclear accumulation via inhibition of protein kinase C-mediated phosphorylation of Ser153. *Mol Cell Biol* 25:7364-7374.
- [60] Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC (2001) Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 3:245-252.
- [61] Luo Y, Hurwitz J, Massague J (1995) Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* 375:159-161.
- [62] Watanabe H, Pan ZQ, Schreiber-Agus N, DePinho RA, Hurwitz J, Xiong Y (1998) Suppression of cell transformation by the cyclin-dependent kinase inhibitor p57KIP2 requires binding to proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1392-1397.
- [63] Nallamshetty S, Crook M, Boehm M, Yoshimoto T, Olive M, Nabel EG (2005) The cell cycle regulator p27Kip1 interacts with MCM7, a DNA replication licensing factor, to inhibit initiation of DNA replication. *FEBS Lett* 579:6529-6536.
- [64] Sherr CJ (1994) The ins and outs of RB: coupling gene expression to the cell cycle clock. *Trends Cell Biol* 4:15-18.
- [65] Hatakeyama M, Weinberg RA (1995) The role of RB in cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 1:9-19.
- [66] Roussel MF (1999) The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 18:5311-5317.
- [67] Pavletich NP (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 287:821-828.
- [68] Gil J, Peters G (2006) Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:667-677.
- [69] Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ (1998) Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8292-8297.
- [70] Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlov I, Lee HW et al. (1998) The Ink4a tumor suppressor gene

product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92:713-723.

[71] Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D (1999) Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1:20-26.

[72] Zhang Y, Xiong Y (1999) Mutations in human ARF exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53. *Mol Cell* 3:579-591.

[73] Tao W, Levine AJ (1999) P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleocytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6937-6941.

[74] Polager S, Ginsberg D (2008) E2F - at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol* 18:528-535.

[75] Yao G, Lee TJ, Mori S, Nevins JR, You L (2008) A bistable Rb-E2F switch underlies the restriction point. *Nat Cell Biol* 10:476-482.

[76] Trimarchi JM, Lees JA (2002) Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:11-20.

[77] Masciullo V, Khalili K, Giordano A (2000) The Rb family of cell cycle regulatory factors: clinical implications. *Int J Oncol* 17:897-902.

[78] Sanseverino F, Torricelli M, Petraglia F, Giordano A (2003) Role of the retinoblastoma family in gynecological cancer. *Cancer Biol Ther* 2:636-641.

[79] Smith EJ, Leone G, Nevins JR (1998) Distinct mechanisms control the accumulation of the Rb-related p107 and p130 proteins during cell growth. *Cell Growth Differ* 9:297-303.

[80] Tedesco D, Lukas J, Reed SI (2002) The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF(Skp2). *Genes Dev* 16:2946-2957.

[81] Cobrinik D (2005) Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24:2796-2809.

[82] Giacinti C, Giordano A (2006) RB and cell cycle progression. *Oncogene* 25:5220-5227.

[83] Sherr CJ, Roberts JM (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9:1149-1163.

[84] Kaldis P (1999) The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol Life Sci* 55:284-296.

[85] Jino S, Suto K, Nagata A, Igarashi M, Kanaoka Y, Nojima H, Okayama H (1994) Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO J* 13:1549-1556.

[86] Blomberg I, Hoffmann I (1999) Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Mol Cell Biol* 19:6183-6194.

- [87] Molinari M, Mercurio C, Dominguez J, Goubin F, Draetta GF (2000) Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis. *EMBO Rep* 1:71-79.
- [88] Lindqvist A, Kallstrom H, Lundgren A, Barsoum E, Rosenthal CK (2005) Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. *J Cell Biol* 171:35-45.
- [89] Mailand N, Podtelejnikov AV, Groth A, Mann M, Bartek J, Lukas J (2002) Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J* 21:5911-5920.
- [90] Boutros R, Dozier C, Ducommun B (2006) The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* 18:185-191.
- [91] Kellogg DR (2003) Wee1-dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division. *J Cell Sci* 116:4883-4890.
- [92] Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33:389-396.
- [93] Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349:132-138.
- [94] Hershko A (1983) Ubiquitin: roles in protein modification and breakdown. *Cell* 34:11-12.
- [95] Harper JW, Burton JL, Solomon MJ (2002) The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev* 16:2179-2206.
- [96] Castro A, Bernis C, Vigneron S, Labbe JC, Lorca T (2005) The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene* 24:314-325.
- [97] Nakayama KI, Nakayama K (2006) Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 6:369-381.
- [98] Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.
- [99] Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:231-241.
- [100] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.
- [101] Nicholson DW (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6:1028-1042.
- [102] Creagh EM, Conroy H, Martin SJ (2003) Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev* 193:10-21.
- [103] Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003) A decade of caspases. *Oncogene* 22:8543-8567.

- [104] Fulda S, Debatin KM (2006) Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25:4798-4811.
- [105] Walczak H, Krammer PH (2000) The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 256:58-66.
- [106] Ashkenazi A (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2:420-430.
- [107] Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14:5579-5588.
- [108] Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305:626-629.
- [109] Decaudin D, Marzo I, Brenner C, Kroemer G (1998) Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis: a prospective novel target of cancer therapy (review). *Int J Oncol* 12:141-152.
- [110] Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenberghe P (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23:2861-2874.
- [111] Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406:855-862.
- [112] Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES, Cohen GM (2001) Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J* 20:998-1009.
- [113] Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42.
- [114] Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102:43-53.
- [115] Vaux DL, Silke J (2003) Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 304:499-504.
- [116] Youle RJ, Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:47-59.
- [117] McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, Korsmeyer SJ (1989) bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57:79-88.
- [118] Strasser A, Harris AW, Cory S (1991) bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* 67:889-899.

- [119] Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ (1991) Bcl-2 Inhibits Multiple Forms of Apoptosis but Not Negative Selection in Thymocytes. *Cell* 67:879-888.
- [120] Ogilvy S, Metcalf D, Print CG, Bath ML, Harris AW, Adams JM (1999) Constitutive Bcl-2 expression throughout the hematopoietic compartment affects multiple lineages and enhances progenitor cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14943-14948.
- [121] Huang DC, Strasser A (2000) BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103:839-842.
- [122] Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 15:1481-1486.
- [123] Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8:705-711.
- [124] Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 3:287-296.
- [125] Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC, Strasser A (2001) Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 293:1829-1832.
- [126] Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K et al. (2000) The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6:1389-1399.
- [127] Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292:727-730.
- [128] Hsu YT, Youle RJ (1998) Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* 273:10777-10783.
- [129] Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH, Youle RJ (2001) Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol* 153:1265-1276.
- [130] Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC (2001) Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 276:11615-11623.

- [131] Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, Dong Z, Venkatachalam MA, Saikumar P (2001) Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 276:18361-18374.
- [132] Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 14:2060-2071.
- [133] Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, Dive C, Hickman JA (1999) Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 144:903-914.
- [134] Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13:1899-1911.
- [135] Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C (2003) PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22:8983-8998.
- [136] Kim BJ, Ryu SW, Song BJ (2006) JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem* 281:21256-21265.
- [137] Gajewski TF, Thompson CB (1996) Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence. *Cell* 87:589-592.
- [138] Yune TY, Park HG, Lee JY, Oh TH (2008) Estrogen-induced Bcl-2 expression after spinal cord injury is mediated through phosphoinositide-3-kinase/Akt-dependent CREB activation. *J Neurotrauma* 25:1121-1131.
- [139] Siddiqi A, Long LM, Li L, Marciniak RA, Kazhdan I (2008) Expression of HER-2 in MCF-7 breast cancer cells modulates anti-apoptotic proteins Survivin and Bcl-2 via the extracellular signal-related kinase (ERK) and phosphoinositide-3 kinase (PI3K) signalling pathways. *BMC Cancer* 8:129.
- [140] Raman M, Chen W, Cobb MH (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26:3100-3112.
- [141] Balmano K, Cook SJ (2009) Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ* 16:368-377.
- [142] Lee HJ, Wang CJ, Kuo HC, Chou FP, Jean LF, Tseng TH (2005) Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicol Appl Pharmacol* 203:124-131.
- [143] Ohtsuka T, Buchsbaum D, Oliver P, Makhija S, Kimberly R, Zhou T (2003) Synergistic induction of tumor cell apoptosis by death receptor antibody and chemotherapy agent through JNK/p38 and mitochondrial death pathway. *Oncogene* 22:2034-2044.
- [144] Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436-444.

- [145] Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G et al. (1999) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10:105-115.
- [146] Bollrath J, Phesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, Nebelsiek T, Lundgren-May T, Canli O, Schwitalla S et al. (2009) gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 15:91-102.
- [147] Kujawski M, Kortylewski M, Lee H, Herrmann A, Kay H, Yu H (2008) Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 118:3367-3377.
- [148] Kortylewski M, Xin H, Kujawski M, Lee H, Liu Y, Harris T, Drake C, Pardoll D, Yu H (2009) Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 15:114-123.
- [149] Wang L, Yi T, Kortylewski M, Pardoll DM, Zeng D, Yu H (2009) IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med* 206:1457-1464.
- [150] Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L et al. (2009) IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 15:103-113.
- [151] Shain KH, Yarde DN, Meads MB, Huang M, Jove R, Hazlehurst LA, Dalton WS (2009) Beta1 integrin adhesion enhances IL-6-mediated STAT3 signaling in myeloma cells: implications for microenvironment influence on tumor survival and proliferation. *Cancer Res* 69:1009-1015.
- [152] Zhu AX, Duda DG, Sahani DV, Jain RK (2011) HCC and angiogenesis: possible targets and future directions. *Nat Rev Clin Oncol*.
- [153] Gao SP, Mark KG, Leslie K, Pao W, Motoi N, Gerald WL, Travis WD, Bornmann W, Veach D, Clarkson B et al. (2007) Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. *J Clin Invest* 117:3846-3856.
- [154] Olcaydu D, Harutyunyan A, Jager R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I, Gisslinger H, Kralovics R (2009) A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 41:450-454.
- [155] Rebouissou S, Amessou M, Couchy G, Poussin K, Imbeaud S, Pilati C, Izard T, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J (2009) Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature* 457:200-204.
- [156] Ernst M, Najdovska M, Grail D, Lundgren-May T, Buchert M, Tye H, Matthews VB, Armes J, Bhathal PS, Hughes NR et al. (2008) STAT3 and STAT1

mediate IL-11-dependent and inflammation-associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice. *J Clin Invest* 118:1727-1738.

[157] Ara T, Song L, Shimada H, Keshelava N, Russell HV, Metelitsa LS, Groshen SG, Seeger RC, DeClerck YA (2009) Interleukin-6 in the bone marrow microenvironment promotes the growth and survival of neuroblastoma cells. *Cancer Res* 69:329-337.

[158] Arredondo J, Chernyavsky AI, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grando SA (2006) Receptor-mediated tobacco toxicity: cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of alpha7 nicotinic receptor in oral keratinocytes. *FASEB J* 20:2093-2101.

[159] Aziz MH, Manoharan HT, Church DR, Dreckschmidt NE, Zhong W, Oberley TD, Wilding G, Verma AK (2007) Protein kinase Cepsilon interacts with signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3), phosphorylates Stat3Ser727, and regulates its constitutive activation in prostate cancer. *Cancer Res* 67:8828-8838.

[160] Bronte-Tinkew DM, Terebiznik M, Franco A, Ang M, Ahn D, Mimuro H, Sasakawa C, Ropeleski MJ, Peek RM, Jr, Jones NL (2009) Helicobacter pylori cytotoxin-associated gene A activates the signal transducer and activator of transcription 3 pathway in vitro and in vivo. *Cancer Res* 69:632-639.

[161] Landen CN, Jr, Lin YG, Armaiz Pena GN, Das PD, Arevalo JM, Kamat AA, Han LY, Jennings NB, Spannuth WA, Thaker PH et al. (2007) Neuroendocrine modulation of signal transducer and activator of transcription-3 in ovarian cancer. *Cancer Res* 67:10389-10396.

[162] Samavati L, Rastogi R, Du W, Huttemann M, Fite A, Franchi L (2009) STAT3 tyrosine phosphorylation is critical for interleukin 1 beta and interleukin-6 production in response to lipopolysaccharide and live bacteria. *Mol Immunol* 46:1867-1877.

[163] Gu M, Singh RP, Dhanalakshmi S, Agarwal C, Agarwal R (2007) Silibinin inhibits inflammatory and angiogenic attributes in photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice. *Cancer Res* 67:3483-3491.

[164] Chan KS, Sano S, Kiguchi K, Anders J, Komazawa N, Takeda J, DiGiovanni J (2004) Disruption of Stat3 reveals a critical role in both the initiation and the promotion stages of epithelial carcinogenesis. *J Clin Invest* 114:720-728.

[165] Migone TS, Lin JX, Cereseto A, Mulloy JC, O'Shea JJ, Franchini G, Leonard WJ (1995) Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. *Science* 269:79-81.

[166] Sano S, Chan KS, Kira M, Kataoka K, Takagi S, Tarutani M, Itami S, Kiguchi K, Yokoi M, Sugasawa K et al. (2005) Signal transducer and activator of transcription 3 is a key regulator of keratinocyte survival and proliferation following UV irradiation. *Cancer Res* 65:5720-5729.

- [167] Karin M, Greten FR (2005) NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 5:749-759.
- [168] Baud V, Karin M (2009) Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov* 8:33-40.
- [169] Yu H, Jove R (2004) The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 4:97-105.
- [170] Yu H, Kortylewski M, Pardoll D (2007) Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 7:41-51.
- [171] Basseres DS, Baldwin AS (2006) Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 25:6817-6830.
- [172] Haura EB, Turkson J, Jove R (2005) Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2:315-324.
- [173] Barre B, Avril S, Coqueret O (2003) Opposite regulation of myc and p21waf1 transcription by STAT3 proteins. *J Biol Chem* 278:2990-2996.
- [174] Moran DM, Mattocks MA, Cahill PA, Koniaris LG, McKillop IH (2008) Interleukin-6 mediates G(0)/G(1) growth arrest in hepatocellular carcinoma through a STAT 3-dependent pathway. *J Surg Res* 147:23-33.
- [175] Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr (1994) Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264:95-98.
- [176] Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 (Pt 2):297-314.
- [177] Ogura H, Murakami M, Okuyama Y, Tsuruoka M, Kitabayashi C, Kanamoto M, Nishihara M, Iwakura Y, Hirano T (2008) Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. *Immunity* 29:628-636.
- [178] Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, Yoshida K, Sudo T, Naruto M, Kishimoto T (1994) Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 77:63-71.
- [179] Lee H, Herrmann A, Deng JH, Kujawski M, Niu G, Li Z, Forman S, Jove R, Pardoll DM, Yu H (2009) Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell* 15:283-293.
- [180] Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y (2004) NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431:461-466.

- [181] Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr (1999) Stat3 as an oncogene. *Cell* 98:295-303.
- [182] Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, Wei S, Zhang S, Pilon-Thomas S, Niu G, Kay H, Mule J, Kerr WG et al. (2005) Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med* 11:1314-1321.
- [183] Sumimoto H, Imabayashi F, Iwata T, Kawakami Y (2006) The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J Exp Med* 203:1651-1656.
- [184] Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D et al. (2004) Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 10:48-54.
- [185] Yu H, Pardoll D, Jove R (2009) STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 9:798-809.
- [186] Hori A, Sasada R, Matsutani E, Naito K, Sakura Y, Fujita T, Kozai Y (1991) Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Res* 51:6180-6184.
- [187] Gastl G, Hermann T, Steurer M, Zmija J, Gunsilius E, Unger C, Kraft A (1997) Angiogenesis as a target for tumor treatment. *Oncology* 54:177-184.
- [188] Liotta LA, Stetler-Stevenson WG (1991) Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 51:5054s-5059s.
- [189] Dulak J, Jozkowicz A (2003) Regulation of vascular endothelial growth factor synthesis by nitric oxide: facts and controversies. *Antioxid Redox Signal* 5:123-132.
- [190] Wouters BG, Koritzinsky M, Chiu RK, Theys J, Buijsen J, Lambin P (2003) Modulation of cell death in the tumor microenvironment. *Semin Radiat Oncol* 13:31-41.
- [191] Tonini T, Rossi F, Claudio PP (2003) Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene* 22:6549-6556.
- [192] Bhushan M, Young HS, Brenchley PE, Griffiths CE (2002) Recent advances in cutaneous angiogenesis. *Br J Dermatol* 147:418-425.
- [193] Gamble J, Meyer G, Noack L, Furze J, Matthias L, Kovach N, Harlant J, Vadas M (1999) B1 integrin activation inhibits in vitro tube formation: effects on cell migration, vacuole coalescence and lumen formation. *Endothelium* 7:23-34.
- [194] Yang S, Graham J, Kahn JW, Schwartz EA, Gerritsen ME (1999) Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels. *Am J Pathol* 155:887-895.

- [195] Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ, Raz A (2000) Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol* 156:899-909.
- [196] Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM (1999) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 237:97-132.
- [197] Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, Jain RK (1998) Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4607-4612.
- [198] Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG (2000) Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res* 60:1388-1393.
- [199] Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK (1997) Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 3:177-182.
- [200] Baish JW, Jain RK (2000) Fractals and cancer. *Cancer Res* 60:3683-3688.
- [201] Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM (2000) Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 156:1363-1380.
- [202] Mauriz JL, Martin-Renedo J, Garcia-Palomo A, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J (2010) Methionine aminopeptidases as potential targets for treatment of gastrointestinal cancers and other tumours. *Curr Drug Targets* 11:1439-1457.
- [203] Endo H, Takenaga K, Kanno T, Satoh H, Mori S (2002) Methionine aminopeptidase 2 is a new target for the metastasis-associated protein, S100A4. *J Biol Chem* 277:26396-26402.
- [204] Bradshaw RA, Brickey WW, Walker KW (1998) N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and N alpha-acetyl transferase families. *Trends Biochem Sci* 23:263-267.
- [205] Ray MK, Datta B, Chakraborty A, Chattopadhyay A, Meza-Keuthen S, Gupta NK (1992) The eukaryotic initiation factor 2-associated 67-kDa polypeptide (p67) plays a critical role in regulation of protein synthesis initiation in animal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:539-543.
- [206] Datta B, Ray MK, Chakrabarti D, Wylie DE, Gupta NK (1989) Glycosylation of eukaryotic peptide chain initiation factor 2 (eIF-2)-associated 67-kDa polypeptide (p67) and its possible role in the inhibition of eIF-2 kinase-catalyzed phosphorylation of the eIF-2 alpha-subunit. *J Biol Chem* 264:20620-20624.
- [207] Chang YH, Teichert U, Smith JA (1992) Molecular cloning, sequencing, deletion, and overexpression of a methionine aminopeptidase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 267:8007-8011.

- [208] Li X, Chang YH (1995) Amino-terminal protein processing in *Saccharomyces cerevisiae* is an essential function that requires two distinct methionine aminopeptidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12357-12361.
- [209] Wang J, Lou P, Henkin J (2000) Selective inhibition of endothelial cell proliferation by fumagillin is not due to differential expression of methionine aminopeptidases. *J Cell Biochem* 77:465-473.
- [210] Li X, Chang YH (1996) Evidence that the human homologue of a rat initiation factor-2 associated protein (p67) is a methionine aminopeptidase. *Biochem Biophys Res Commun* 227:152-159.
- [211] Dummitt B, Micka WS, Chang YH (2003) N-terminal methionine removal and methionine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biochem* 89:964-974.
- [212] Vetro JA, Chang YH (2002) Yeast methionine aminopeptidase type 1 is ribosome-associated and requires its N-terminal zinc finger domain for normal function in vivo. *J Cell Biochem* 85:678-688.
- [213] Dummitt B, Fei Y, Chang YH (2002) Functional expression of human methionine aminopeptidase type 1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Pept Lett* 9:295-303.
- [214] Bernier SG, Taghizadeh N, Thompson CD, Westlin WF, Hannig G (2005) Methionine aminopeptidases type I and type II are essential to control cell proliferation. *J Cell Biochem* 95:1191-1203.
- [215] Murray AW (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116:221-234.
- [216] Page AM, Hieter P (1999) The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators. *Annu Rev Biochem* 68:583-609.
- [217] Ron D, Harding HP (2006) *Translational Control in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratories Press, New York.
- [218] Zhang Y, Griffith EC, Sage J, Jacks T, Liu JO (2000) Cell cycle inhibition by the anti-angiogenic agent TNP-470 is mediated by p53 and p21WAF1/CIP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6427-6432.
- [219] Kusaka M, Sudo K, Matsutani E, Kozai Y, Marui S, Fujita T, Ingber D, Folkman J (1994) Cytostatic inhibition of endothelial cell growth by the angiogenesis inhibitor TNP-470 (AGM-1470). *Br J Cancer* 69:212-216.
- [220] Antoine N, Greimers R, De Roanne C, Kusaka M, Heinen E, Simar LJ, Castronovo V (1994) AGM-1470, a potent angiogenesis inhibitor, prevents the entry of normal but not transformed endothelial cells into the G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res* 54:2073-2076.
- [221] Abe J, Zhou W, Takuwa N, Taguchi J, Kurokawa K, Kumada M, Takuwa Y (1994) A fumagillin derivative angiogenesis inhibitor, AGM-1470, inhibits activation of cyclin-dependent kinases and phosphorylation of retinoblastoma

gene product but not protein tyrosyl phosphorylation or protooncogene expression in vascular endothelial cells. *Cancer Res* 54:3407-3412.

[222] Hori A, Ikeyama S, Sudo K (1994) Suppression of cyclin D1 mRNA expression by the angiogenesis inhibitor TNP-470 (AGM-1470) in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 204:1067-1073.

[223] Mauriz JL, Gonzalez-Gallego J (2008) Antiangiogenic drugs: current knowledge and new approaches to cancer therapy. *J Pharm Sci* 97:4129-4154.

[224] Koyama H, Nishizawa Y, Hosoi M, Fukumoto S, Kogawa K, Shioi A, Morii H (1996) The fumagillin analogue TNP-470 inhibits DNA synthesis of vascular smooth muscle cells stimulated by platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-I. Possible involvement of cyclin-dependent kinase 2. *Circ Res* 79:757-764.

[225] Catalano A, Romano M, Robuffo I, Strizzi L, Procopio A (2001) Methionine aminopeptidase-2 regulates human mesothelioma cell survival: role of Bcl-2 expression and telomerase activity. *Am J Pathol* 159:721-731.

[226] Iida A, Yamaguchi A, Hirose K (2000) Telomerase activity in colorectal cancer and its relationship to bcl-2 expression. *J Surg Oncol* 73:219-223.

[227] Kishimoto K, Fujimoto J, Takeuchi M, Yamamoto H, Ueki T, Okamoto E (1998) Telomerase activity in hepatocellular carcinoma and adjacent liver tissues. *J Surg Oncol* 69:119-124.

[228] Sheen IS, Jeng KS, Jeng WJ, Jeng CJ, Wang YC, Gu SL, Tseng SY, Chu CM, Lin CH, Chang KM (2005) Fumagillin treatment of hepatocellular carcinoma in rats: an in vivo study of antiangiogenesis. *World J Gastroenterol* 11:771-777.

[229] Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, Folkman J (1990) Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 348:555-557.

[230] Liu S, Widom J, Kemp CW, Crews CM, Clardy J (1998) Structure of human methionine aminopeptidase-2 complexed with fumagillin. *Science* 282:1324-1327.

[231] Yeh JR, Mohan R, Crews CM (2000) The antiangiogenic agent TNP-470 requires p53 and p21CIP/WAF for endothelial cell growth arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12782-12787.

[232] Farinelle S, Malonne H, Chaboteaux C, Decaestecker C, Dedecker R, Gras T, Darro F, Fontaine J, Atassi G, Kiss R (2000) Characterization of TNP-470-induced modifications to cell functions in HUVEC and cancer cells. *J Pharmacol Toxicol Methods* 43:15-24.

[233] Sedlakova O, Sedlak J, Hunakova L, Jakubikova J, Duraj J, Sulikova M, Chovancova J, Chorvath B (1999) Angiogenesis inhibitor TNP-470: cytotoxic effects on human neoplastic cell lines. *Neoplasma* 46:283-289.

- [234] Morales C, Zurita M, Vaquero J (2002) Antitumor effect of TNP-470 is not associated to decrease of angiogenesis in an experimental malignant neuroectodermic tumor. *J Neurooncol* 58:131-136.
- [235] Tanaka H, Taniguchi H, Mugitani T, Koishi Y, Masuyama M, Higashida T, Koyama H, Suganuma Y, Miyata K, Takeuchi K (1995) Intra-arterial administration of the angiogenesis inhibitor TNP-470 blocks liver metastasis in a rabbit model. *Br J Cancer* 72:650-653.
- [236] Tanaka H, Taniguchi H, Mugitani T, Koishi Y, Masuyama M, Koyama H, Hoshima M, Takahashi T (1996) Angiogenesis inhibitor TNP-470 prevents implanted liver metastases after partial hepatectomy in an experimental model without impairing wound healing. *Br J Surg* 83:1444-1447.
- [237] Kin M, Torimura T, Ueno T, Nakamura T, Ogata R, Sakamoto M, Tamaki S, Sata M (2000) Angiogenesis inhibitor TNP-470 suppresses the progression of experimentally-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Int J Oncol* 16:375-382.
- [238] Figg WD, Pluda JM, Lush RM, Saville MW, Wyvill K, Reed E, Yarchoan R (1997) The pharmacokinetics of TNP-470, a new angiogenesis inhibitor. *Pharmacotherapy* 17:91-97.
- [239] Logothetis CJ, Wu KK, Finn LD, Daliani D, Figg W, Ghaddar H, Gutterman JU (2001) Phase I trial of the angiogenesis inhibitor TNP-470 for progressive androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 7:1198-1203.
- [240] Bernier SG, Westlin WF, Hannig G (2005) Fumagillin class inhibitors of methionine aminopeptidase-2. *Drugs Fut* 30:497.
- [241] Hannig G, Lazarus DD, Bernier SG, Karp RM, Lorusso J, Qiu D, Labenski MT, Wakefield JD, Thompson CD, Westlin WF (2006) Inhibition of melanoma tumor growth by a pharmacological inhibitor of MetAP-2, PPI-2458. *Int J Oncol* 28:955-963.
- [242] Lainer-Carr D, Brahn E (2007) Angiogenesis inhibition as a therapeutic approach for inflammatory synovitis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3:434-442.
- [243] Brahn E, Schoettler N, Lee S, Banquerigo ML (2009) Involution of collagen-induced arthritis with an angiogenesis inhibitor, PPI-2458. *J Pharmacol Exp Ther* 329:615-624.
- [244] Hannig G, Bernier SG, Hoyt JG, Doyle B, Clark E, Karp RM, Lorusso J, Westlin WF (2007) Suppression of inflammation and structural damage in experimental arthritis through molecular targeted therapy with PPI-2458. *Arthritis Rheum* 56:850-860.
- [245] Lazarus DD, Doyle EG, Bernier SG, Rogers AB, Labenski MT, Wakefield JD, Karp RM, Clark EJ, Lorusso J, Hoyt JG et al. (2008) An inhibitor of methionine aminopeptidase type-2, PPI-2458, ameliorates the pathophysiological disease processes of rheumatoid arthritis. *Inflamm Res* 57:18-27.

- [246] Bainbridge J, Madden L, Essex D, Binks M, Malhotra R, Paleolog EM (2007) Methionine aminopeptidase-2 blockade reduces chronic collagen-induced arthritis: potential role for angiogenesis inhibition. *Arthritis Res Ther* 9:R127.
- [247] Bernier SG, Lazarus DD, Clark E, Doyle B, Labenski MT, Thompson CD, Westlin WF, Hannig G (2004) A methionine aminopeptidase-2 inhibitor, PPI-2458, for the treatment of rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10768-10773.
- [248] Ashraf S, Mapp PI, Walsh DA (2010) Angiogenesis and the persistence of inflammation in a rat model of proliferative synovitis. *Arthritis Rheum* 62:1890-1898.
- [249] Cooper AC, Karp RM, Clark EJ, Taghizadeh NR, Hoyt JG, Labenski MT, Murray MJ, Hannig G, Westlin WF, Thompson CD (2006) A novel methionine aminopeptidase-2 inhibitor, PPI-2458, inhibits non-Hodgkin's lymphoma cell proliferation in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 12:2583-2590.
- [250] Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89:271-277.
- [251] Hasegawa J, Kamada S, Kamiike W, Shimizu S, Imazu T, Matsuda H, Tsujimoto Y (1996) Involvement of CPP32/Yama(-like) proteases in Fas-mediated apoptosis. *Cancer Res* 56:1713-1718.
- [252] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- [253] Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- [254] Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25:402-408.
- [255] Mauriz JL, Linares P, Macias RI, Jorquera F, Honrado E, Olcoz JL, Gonzalez P, Gonzalez-Gallego J (2003) TNP-470 inhibits oxidative stress, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Free Radic Res* 37:841-848.
- [256] Mauriz JL, Gonzalez P, Duran MC, Molpeceres V, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J (2007) Cell-cycle inhibition by TNP-470 in an in vivo model of hepatocarcinoma is mediated by a p53 and p21WAF1/CIP1 mechanism. *Transl Res* 149:46-53.
- [257] Kato J (1999) Induction of S phase by G1 regulatory factors. *Front Biosci* 4:D787-92.
- [258] Lien WH, Chen CK, Lai LY, Chen YH, Wu MP, Wu LW (2004) Participation of cyclin D1 deregulation in TNP-470-mediated cytostatic effect: involvement of senescence. *Biochem Pharmacol* 68:729-738.

- [259] Prasad S, Pandey MK, Yadav VR, Aggarwal BB (2011) Gambogic Acid Inhibits STAT3 Phosphorylation Through Activation of Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1: Potential Role in Proliferation and Apoptosis. *Cancer Prev Res (Phila)*.
- [260] Liu A, Liu Y, Xu Z, Yu W, Wang H, Li C, Lin J (2011) Novel small molecule, XZH-5, inhibits constitutive and interleukin-6-induced STAT3 phosphorylation in human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Sci* 102:1381-1387.
- [261] Maga G, Hubscher U (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 116:3051-3060.
- [262] Gulbis JM, Kelman Z, Hurwitz J, O'Donnell M, Kuriyan J (1996) Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell* 87:297-306.
- [263] Massague J (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432:298-306.
- [264] Stevaux O, Dyson NJ (2002) A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol* 14:684-691.
- [265] Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW (2005) Cyclins and cdk in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 24:2909-2915.
- [266] Vivanco I, Sawyers CL (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2:489-501.
- [267] Rossig L, Jadidi AS, Urbich C, Badorff C, Zeiher AM, Dimmeler S (2001) Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cell Biol* 21:5644-5657.
- [268] Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318-1321.
- [269] Herr I, Debatin KM (2001) Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 98:2603-2614.
- [270] Grethe S, Porn-Ares MI (2006) p38 MAPK regulates phosphorylation of Bad via PP2A-dependent suppression of the MEK1/2-ERK1/2 survival pathway in TNF-alpha induced endothelial apoptosis. *Cell Signal* 18:531-540.
- [271] Huynh H, Nguyen TT, Chow KH, Tan PH, Soo KC, Tran E (2003) Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterol* 3:19.
- [272] Wang YQ, Luk JM, Chu AC, Ikeda K, Man K, Kaneda K, Fan ST (2006) TNP-470 blockage of VEGF synthesis is dependent on MAPK/COX-2 signaling pathway in PDGF-BB-activated hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 341:239-244.
- [273] Kanzler S, Galle PR (2000) Apoptosis and the liver. *Semin Cancer Biol* 10:173-184.

- [274] Hunter JJ, Parslow TG (1996) A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis. *J Biol Chem* 271:8521-8524.
- [275] Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609-619.
- [276] Watson JL, Greenshields A, Hill R, Hilchie A, Lee PW, Giacomantonio CA, Hoskin DW (2010) Curcumin-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells is p53-independent and involves p38 mitogen-activated protein kinase activation and downregulation of Bcl-2 and survivin expression and Akt signaling. *Mol Carcinog* 49:13-24.
- [277] Chesler L, Goldenberg DD, Seales IT, Satchi-Fainaro R, Grimmer M, Collins R, Struett C, Nguyen KN, Kim G, Tihan T et al. (2007) Malignant progression and blockade of angiogenesis in a murine transgenic model of neuroblastoma. *Cancer Res* 67:9435-9442.
- [278] Prox D, Becker C, Pirie-Shepherd SR, Celik I, Folkman J, Kisker O (2003) Treatment of human pancreatic cancer in mice with angiogenic inhibitors. *World J Surg* 27:405-411.
- [279] Yamamoto D, Kiyozuka Y, Adachi Y, Takada H, Hioki K, Tsubura A (1999) Synergistic action of apoptosis induced by eicosapentaenoic acid and TNP-470 on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 55:149-160.
- [280] Pugazhenthii S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE, Reusch JE (2000) Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* 275:10761-10766.
- [281] Cagnol S, Chambard JC (2010) ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J* 277:2-21.
- [282] Bromberg JF, Horvath CM, Besser D, Lathem WW, Darnell JE, Jr (1998) Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol* 18:2553-2558.
- [283] Yu CL, Meyer DJ, Campbell GS, Larner AC, Carter-Su C, Schwartz J, Jove R (1995) Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 269:81-83.
- [284] Giraud S, Hurlstone A, Avril S, Coqueret O (2004) Implication of BRG1 and cdk9 in the STAT3-mediated activation of the p21waf1 gene. *Oncogene* 23:7391-7398.
- [285] Park JI, Strock CJ, Ball DW, Nelkin BD (2005) Interleukin-1beta can mediate growth arrest and differentiation via the leukemia inhibitory factor/JAK/STAT pathway in medullary thyroid carcinoma cells. *Cytokine* 29:125-134.
- [286] Bethea JR, Gillespie GY, Benveniste EN (1992) Interleukin-1 beta induction of TNF-alpha gene expression: involvement of protein kinase C. *J Cell Physiol* 152:264-273.

- [287] McMurray JS (2006) A new small-molecule Stat3 inhibitor. *Chem Biol* 13:1123-1124.
- [288] Schust J, Sperl B, Hollis A, Mayer TU, Berg T (2006) Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. *Chem Biol* 13:1235-1242.
- [289] Matsukawa A, Kudo S, Maeda T, Numata K, Watanabe H, Takeda K, Akira S, Ito T (2005) Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response. *J Immunol* 175:3354-3359.
- [290] Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Forster I, Akira S (1999) Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 10:39-49.
- [291] Dimitrova P, Ivanovska N (2008) Tyrphostin AG-490 inhibited the acute phase of zymosan-induced inflammation. *Int Immunopharmacol* 8:1567-1577.
- [292] Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE, Stark GR (2007) Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. *Genes Dev* 21:1396-1408.
- [293] Yu Z, Zhang W, Kone BC (2002) Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) inhibits transcription of the inducible nitric oxide synthase gene by interacting with nuclear factor kappaB. *Biochem J* 367:97-105.
- [294] Wei D, Le X, Zheng L, Wang L, Frey JA, Gao AC, Peng Z, Huang S, Xiong HQ, Abbruzzese JL et al. (2003) Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene* 22:319-329.
- [295] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2001) Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 94:153-156.
- [296] Abou-Alfa GK, Venook AP (2008) The impact of new data in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Curr Oncol Rep* 10:199-205.
- [297] Avila MA, Berasain C, Sangro B, Prieto J (2006) New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 25:3866-3884.
- [298] Verslype C, Van Cutsem E, Dicato M, Arber N, Berlin JD, Cunningham D, De Gramont A, Diaz-Rubio E, Ducreux M, Gruenberger T et al. (2009) The management of hepatocellular carcinoma. Current expert opinion and recommendations derived from the 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2008. *Ann Oncol* 20 Suppl 7:vii1-vii6.
- [299] Mauriz JL, Duran MC, Molpeceres V, Barrio JP, Martín-Renedo J, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J, Gonzalez P (2007) Changes in the antioxidant system by TNP-470 in an in vivo model of hepatocarcinoma. *Transl Res* 150:189-196.
- [300] Engel FB, Hauck L, Boehm M, Nabel EG, Dietz R, von Harsdorf R (2003) p21(CIP1) Controls proliferating cell nuclear antigen level in adult cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* 23:555-565.

- [301] Yeh CT, Yen GC (2005) Induction of apoptosis by the Anthocyanidins through regulation of Bcl-2 gene and activation of c-Jun N-terminal kinase cascade in hepatoma cells. *J Agric Food Chem* 53:1740-1749.
- [302] Faloppi L, Scartozzi M, Maccaroni E, Di Pietro Paolo M, Berardi R, Del Prete M, Cascinu S (2011) Evolving strategies for the treatment of hepatocellular carcinoma: from clinical-guided to molecularly-tailored therapeutic options. *Cancer Treat Rev* 37:169-177.
- [303] Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80:285-291.
- [304] Jung MY, Kwon SK, Moon A (2001) Chemopreventive allylthiopyridazine derivatives induce apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells through a caspase-3-dependent mechanism. *Eur J Cancer* 37:2104-2110.
- [305] Takahashi T, Shimizu M, Akinaga S (2002) Mechanisms of the apoptotic activity of Cl-F-araA in a human T-ALL cell line, CCRF-CEM. *Cancer Chemother Pharmacol* 50:193-201.
- [306] Chen GJ, Weylie B, Hu C, Zhu J, Forough R (2007) FGFR1/PI3K/AKT signaling pathway is a novel target for antiangiogenic effects of the cancer drug fumagillin (TNP-470). *J Cell Biochem* 101:1492-1504.

Curriculum Vitae

Personal Information

Name: Javier
Family name: Martin Renedo
Date of birth: July 11th, 1983
Spanish ID number: 71942287-N
Citizenship: Spanish
Business address: Department of Biomedical Sciences
 & Institute of Biomedicine (IBIOMED)
 University of Leon
 24071 Leon, Spain
 Phone: 0034-987291997
 Fax: 0034-987291267
 E-Mail: jmarre@unileon.es

Education/Training

INSTITUTION(S) AND LOCATION	DEGREE	YEAR	FIELD OF STUDY
Biology, University of León, León, Spain	B.S.	2006	Biology
Institute of Biomedicine, University of León, León, Spain	M.S.	2008	Liver and Cancer Physiology
Institute of Biomedicine, University of León, León, Spain	Ph.D.	Set for Autumn 2011	Liver and Cancer Physiology

Research and Professional Experience

Professional Experience

- 2007 – present: Member of the Institute of Biomedicine, University of Leon, Spain.
- 2007 – 2011: Research Formation Grant fellow funded by *Spanish Ministry of Education*. Department of Biomedical Sciences, University of Leon, Spain.
- 2009: August – November Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden. Research advisor: Ulla Stenius.

Teaching

- 2009 – 2010: 17 hours in Animal Physiology, Veterinary Degree, University of León.
- 2009 – 2010: 3 hours in Animal Physiology, Biology Degree, University of León.
- 2009 – 2010: 8.5 hours in Anatomy, Kinesiology and Human Physiology, Sport Sciences Degree, University of León.
- 2010 – 2011: 30 hours in Animal Physiology, Veterinary Degree, University of León.

Management tasks

- 2003 – 2006: Member of the Department of Animal Physiology Council, University of Leon. Students representative.

- 2006 – present: Member of the Department of Biomedical Sciences Council , University of León. Grant fellows representative.
- 2009 – present: Member of the Institute of Biomedicine Council, University of León. Grant fellows representative.
- 2010 – present: Member of the Veterinary Faculty Council, University of Leon. Grant fellows representative.

Congresses

- XXXII National Congress of Spanish Association for the Study of the Liver (AEEH). Madrid, Spain. 2007.
Poster communication: Induction of the intrinsic apoptosis pathway by TNP-470 in an in vivo model of hepatocarcinoma. Mauriz JL, González P, Durán MC, **Martín-Renedo J**, Barrio JP, Culebras JM y González-Gallego J.
- XLII Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). Barcelona, Spain. 2007
Poster communication: Induction of the intrinsic apoptosis pathway by TNP-470 in an in vivo model of hepatocarcinoma. Mauriz JL, González P, Durán MC, **Martín-Renedo J**, Barrio JP, Culebras JM y González-Gallego J.
- XXXIV National Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences (SECF). Valladolid, Spain, 2007
Poster communication: Induction of the intrinsic apoptosis pathway by TNP-470 in an in vivo model of hepatocarcinoma. Mauriz JL, González P, Durán MC, **Martín-Renedo J**, Barrio JP, Culebras JM y González-Gallego J.

Poster communication: Effects of melatonin on the feeding behaviour of streptozotocin-diabetic rats. Echart MA, Molpeceres V, da Cruz IBM, González P, **Martín-Renedo J**, Mauriz JL, Barrio JP.

- XXXI Meeting of the Castilian Association of Digestive System León, España, 2008

Poster communication: Impact of *Helicobacter pylori* infection on relatives and patients of gastric cancer. Genetic disorders. Sierra Ausín M, Mauriz Gutiérrez JL, Linares Tores P, **Martín Renedo J**, Diez Rodriguez R, Olcoz Goñi JL.

- XXXV Congress Of the Spanish Society of Physiological Sciences (SECF) Valencia, España, 2009.

Poster communication: Testing melatonin solutions acceptance as drinking source by male wistar rats Garzo E, **Martín-Renedo J**, Mauriz JL, Cruz IBM, Rocha MIU, Ramos E, da Costa J, González P, Barrio JP

Poster communication: Melatonin is able to induce apoptosis on HepG2 hepatocarcinoma cells. **Martín-Renedo J**, Mauriz JL, Carbajo S, Ruiz-Andrés O, González P, González-Gallego J

- XXXIV National Congress of Spanish Association for the Study of the Liver (AEEH).Madrid, Spain, 2009

Poster communication: Melatonin is able to reduce cell cycle progression on HepG2 hepatocarcinoma cell line. **Martín-Renedo J**, Mauriz JL, Carbajo S, Ruiz-Andrés O, González P, González-Gallego J

- XXXV National Congress of Spanish Association for the Study of the Liver (AEEH).Madrid, Spain, 2010

Poster communication: Changes in the expression of melatonin receptors is related to melatonin oncostatic effects

on HepG2 cell line. Carbajo-Pescador S, **Martín-Renedo J**, Piva M, García-Palomo A, Tuñón MJ, Mauriz JL, González-Gallego J

Poster communication: Viability reduction and Cell cycle arrest on Hepatocarcinoma cell lines due to PPI-2458 administration. **Martín-Renedo J**, Carbajo S, Piva M, Mauriz JL, González-Gallego J

Poster communication: Effect of In vitro administration of PTK-787 in the study of the cell proliferation on hepatocarcinoma. Piva M, Carbajo-Pescador S, **Martín-Renedo J**, Mauriz JL, González P González-Gallego J

- IV Meeting of the Spanish Biomedical Research Network of Hepatic and Digestive Diseases. (CIBERehd) Barcelona, Spain, 2010.

Poster communication: Cell cycle arrest and apoptosis induction in human hepatocarcinoma HepG2 cells by administration of methionine aminopeptidase-2 inhibitor PPI-2458 Mauriz JL, **Martín-Renedo J**, Carbajo-Pescador S, Piva M, García-Palomo A, González Gallego J

- XXXV National Congress of Spanish Association for the Study of the Liver (AEEH). Madrid, Spain, 2011.

Poster communication: Study of apoptosis and cell cycle on HepG2 hepatocarcinoma cells by Methionine Aminopeptidase-2 inhibitor administration. **Martín-Renedo J**, Carbajo S, Piva M, Mauriz JL, González-Gallego J

Bibliography

Methionine aminopeptidases as potential targets for treatment of gastrointestinal cancers and other tumours. Mauriz JL, **Martín-**

Renedo J, García-Palomo A, Tuñón MJ, González-Gallego J. *Current Drug Targets*. 2010 Nov;11(11):1439-57.

Changes in the expression of melatonin receptors induced by melatonin treatment in hepatocarcinoma HepG2 cells. Carbajo-Pescador S, **Martín-Renedo J**, García-Palomo A, Tuñón MJ, Mauriz JL, González-Gallego J. *Journal of Pineal Research*. 2009 Nov;47(4):330-8.

Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line. **Martín-Renedo J**, Mauriz JL, Jorquera F, Ruiz-Andrés O, González P, González-Gallego J. *Journal of Pineal Research*. 2008 Nov;45(4):532-40.

Changes in the antioxidant system by TNP-470 in an in vivo model of hepatocarcinoma.

Mauriz JL, Durán MC, Molpeceres V, Barrio JP, **Martín-Renedo J**, Culebras JM, González-Gallego J, González P. *Translational Research*. 2007 Sep;150(3):189-96.

Experimental models on hemorrhagic shock. Mauriz JL, **Martín Renedo J**, Barrio JP, Culebras JM, González P. *Nutricion Hospitalaria*. 2007 Mar-Apr;22(2):190-8. (Spanish).

Laboratory experience

Western Blot

DNA-RNA Isolation

RT-qPCR

Flow Cytometry

Flourescence Microscopy

Cell Culture Techniques

Languages

Spanish: Native

English: Medium-Advanced