



**universidad
de león**

Departamento de Ciencias Biomédicas

**Análisis *in vitro* del efecto oncostático
de la melatonina en hepatocitos
tumorales de la línea HepG2**



Memoria presentada por el Licenciado en Medicina

D. Andrés García Palomo

para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de León

León, 2013



universidad
de león

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

El Dr. D. Javier González Gallego y el Dr. D. José Luis Mauriz Gutiérrez, Directores de la Tesis Doctoral titulada “Análisis *in vitro* del efecto oncostático de la melatonina en hepatocitos tumorales de la línea HepG2” realizada por D. Andrés García Palomo, 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 ____ de ____ de 2013.

Los directores de la Tesis Doctoral

Fdo: Dr. Javier González-Gallego

Fdo: Dr. José 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 ___ de _____ de 2013 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada: “Análisis *in vitro* del efecto oncostático de la melatonina en hepatocitos tumorales de la línea HepG2”, dirigida por los Dres. D. Javier González-Gallego y D. Jose Luis Mauriz Gutiérrez, y elaborada por D. Andrés García Palomo, cuyo título en inglés es: “Oncostatic effect of melatonin in HepG2 tumour hepatocytes: an *in vitro* study”.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a ___ de _____ de 2013.

VºBº

El Director del Departamento,

La Secretaria,

Fdo.: Dr. Juan José García Vieitez

Fdo.: Dra. Pilar Sánchez Collado

a toda mi familia...

a los que ya no están, los que hoy son y los que vendrán

“El secreto de la felicidad no es hacer siempre lo que se quiere, sino querer siempre lo que se hace”

Leon Tolstoi

AGRADECIMIENTOS:

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas:

A los Directores de esta Tesis Doctoral, el Dr. Dr. José Luis Mauriz Gutiérrez y el Dr. Javier González Gallego, por su colaboración y por su confianza al ayudarme a penetrar en la parte molecular de la investigación básica en oncología.

Al Dr. Javier Martín Renedo y a la Lcda. Sara Carbajo Pescador, que me ayudaron y asesoraron en varias técnicas instrumentales de laboratorio.

A todos los miembros del Instituto Universitario de Biomedicina de la Universidad de León, tanto de la Universidad como del Hospital, por su ilusión por hacer posible la buena marcha de dicho Centro.

A la Fundación Investigación Sanitaria de León y a la Junta de Castilla y León por la financiación recibida para completar este trabajo.

A mis amigos y familiares por todo el tiempo que la realización de esta Tesis les ha robado.

Al Hospital de León, al Servicio de Oncología Médica y a todos los pacientes que día a día me ayudan a seguir mejorando.

A mis maestros y a todos aquellos que, conscientemente o no, me enseñaron a ser lo que hoy soy.

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

Publicaciones:

- Changes in the expression of melatonin receptors induced by melatonin treatment in hepatocarcinoma HepG2 cells. Journal of Pineal Research 2009;47(4):330-8.
- Melatonin modulation of intracellular signaling pathways in hepatocarcinoma HepG2 cell line: role of the MT1 receptor. Journal of Pineal Research 2011;51(4):463-71.

Comunicaciones a congreso publicadas:

- El efecto oncostático de la administración de melatonina en células HepG2 está relacionado con modificaciones en la expresión de sus receptores celulares. XXXV Congreso Anual de la Fundación/Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). Madrid, 2010. Gastroenterología y Hepatología 33 (Especial 1), 180, 2010.
- Activación de FOXO3A y regulación transcripcional de Bim en el efecto proapoptótico inducido por la administración in Vitro de melatonina en hepatocarcinoma. XXXVII Congreso Anual de la Fundación/Asociación Española para el Estudio

del Hígado (AEEH). Madrid, 2012. Gastroenterología y Hepatología 35 (Especial 1), 153, 2012.

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-isoleucil-L-glutamil-L-treonil-L-aspartico amida
Ac-LEHD-AMC	7-amino 4-metilcumarina N-acetil-L-leucil-L-glutamil-L-histidil-L-aspartico amida
ANOVA	Test de análisis de varianza
AKT/p13K	Proteín-quinasa B
AP-1	Proteína activadora 1
APC/C	Complejo promotor de la anafase/ciclosoma
APS	Persulfato de amonio
ATP	Adenosín trifosfato
BMK1	Quinasa 1 MAP grande
CAK	Quinasa activadora de CDK
cAMP	Adenosín monofosfato (AMP) cíclico
CAT	Catalasa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
CKI	Inhibidor de CDK
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CREB	Proteína de unión a elementos en respuesta a cAMP

CSBP	Proteína de unión a fármacos anti-inflamatorios supresores de citoquinas
DAPK	Proteín-quinasa asociada a muerte
DD	<i>Death domain</i> (Dominio de muerte)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DISC	Complejo de señalización inducido por CD95
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferasa
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
E1	Enzima activadora de ubiquitina
E2	Enzima conjugadora de ubiquitina
E3	Ubiquitín ligasa
EDTA	Ácido etilén diamino tetraacético
EEM	Error estándar de la media
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular
FACS	Citometría de flujo mediante el uso de fluorescencia - <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FADD	Dominio de muerte asociado a la proteína FAS
g	Gramo
GPCR	Receptores ligados a proteínas G heterodiméricas
GPx	Glutación peroxidasa
GTPasa	Guanosín-trifosfatasa

GSTP1	Glutación S-transferasa pi-1
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
HO ₂ [·]	Radical hidroperóxido
HBV	Virus de la hepatitis B
HCC	Hepatocarcinoma o carcinoma hepatocelular
HCV	Virus de la hepatitis C
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil-(1)] etanosulfónico
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HIF	Factor inducible por hipoxia
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IAP	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
IGF2R	Receptor 2 del factor de tipo insulínico
IL-1	Interleuquina 1
IL-6	Interleuquina 6
INF-γ	Interferón γ
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
JNK	Quinasa N-terminal c-Jun
Kd	Constante de disociación
kDa	Kilodalton
LDH	Lactato deshidrogenasa
LPS	Lipopolisacárido
MAP	Proteínas activadas por mitógenos

MAPK	Proteín quinasas activadas por mitógenos
MAPKAPK	Proteín quinasa activada por MAPK
MAPKK	Quinasa de MAPK
MAP3K	Quinasa de MAPKK, también conocida como MAPKKK
MCM7	Proteína 7 de mantenimiento de minicromosomas
MDM2	Homólogo humano del gen murino <i>double minute 2</i>
MNK	Quinasas de interacción con MAPK
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MSK	Quinasas activadas por estrés y mitógenos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-AT	Factor nuclear activado en células T
NF- κ B	Factor de transcripción nuclear kappa-B
NGF	Factor de crecimiento neural
NLL	Quinasa similar a la proteína NEMO
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ ⁻	Anión superóxido
\cdot OH	Radical hidroxilo
PARP-1	Poli adenosil ribosa polimerasa 1
PBS	Tampón fosfato salino
PCNA	Antígeno de proliferación nuclear
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR	Receptor de PDGF
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PTEN	Proteína homóloga de la fosfatasa y la tensina
PVDF	Fluoruro de polivinideno
RASSF1A	Familia 1A de asociación al dominio RAS
RB	Proteína del retinoblastoma
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSK	Quinasas S6 ribosomales p90
RT	Transcripción inversa
RT-qPCR	Transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
s	Segundo
SAPK	Proteín-quinasa activada por estrés
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SFRP1	Proteína 1 relacionada con la proteína <i>frizzled</i> soluble
SOD	Superóxido dismutasa
SOSC-1	Proteína supresora de la señalización de citoquinas
STAT3	Activador de la transcripción y transductor de señales 3
TBE	Tampón bórico Tris/EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamida

TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNF- β	Factor de necrosis tumoral beta
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral
TRAIL-R1	Receptor 1 para TRAIL
TRAIL-R2	Receptor 2 para TRAIL
TSC2	Complejo 2 de la esclerosis tuberosa
U	Unidad
UA	Unidades arbitrarias
UAF	Unidades arbitrarias de fluorescencia
Ub/UPS	Ubiquitín-proteasoma
UV	Ultravioleta
V	Voltios
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR	Receptor de VEGF
xg	Unidades de aceleración de la gravedad

FIGURAS

- Figura 1.- Incidencia del HCC.
- Figura 2.- Etiología del HCC.
- Figura 3.- Proceso de hepatocarcinogénesis.
- Figura 4.- Algoritmo para el tratamiento del HCC basado en BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer).
- Figura 5.- Control de la progresión del ciclo celular entre fase G_0/G_1 y fase S.
- Figura 6.- Interacciones entre reguladores de la progresión hacia la fase S del ciclo.
- Figura 7.- Regulación mediante fosforilación de los complejos CDK-ciclina.
- Figura 8.- Control del ciclo celular.
- Figura 9.- Actuación de los complejos SCF y APC/C en distintos estadios del ciclo celular.
- Figura 10.- Subfamilias de proteínas Bcl-2.
- Figura 11.- Esquema de la inducción de la apoptosis intrínseca y extrínseca.
- Figura 12.- Cascada de activación de MAPK.
- Figura 13.- Estructura de la molécula de la melatonina.
- Figura 14.- Síntesis de la melatonina.
- Figura 15.- Viabilidad celular en la línea celular HepG2 tratada con melatonina. Captación de MTT

- Figura 16.- Viabilidad celular en la línea celular HepG2 tratada con melatonina. Liberación de LDH al medio de cultivo.
- Figura 17.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la actividad de la caspasa 3.
- Figura 18.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la hidrólisis de la proteína PARP-1.
- Figura 19.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la actividad de la caspasa 9.
- Figura 20.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la expresión de Bax mitocondrial.
- Figura 21.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la actividad de la expresión de citocromo C en el citosol mitocondria.
- Figura 22.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la actividad de la caspasa 8.
- Figura 23.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la expresión de FasL.
- Figura 24.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la expresión de p53.
- Figura 25.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la expresión de p21.
- Figura 26.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la expresión de fosfo-ERK.

- Figura 27.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la expresión de fosfo-JNK.
- Figura 28.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la expresión de fosfo-p38.
- Figura 29.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M y 2500 μ M sobre la expresión proteica de MT1.
- Figura 30.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M y 2500 μ M sobre la expresión del mRNA de MT1.
- Figura 31.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M y 2500 μ M sobre la expresión proteica de MT3.
- Figura 32.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M y 2500 μ M sobre la expresión del mRNA de MT3.
- Figura 33.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M y 2500 μ M sobre la expresión proteica de ROR α .
- Figura 34.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M y 2500 μ M sobre la expresión del mRNA de ROR α .
- Figura 35.- Viabilidad celular en la línea celular HepG2 tratada con melatonina y/o Luzindol (Luz). Captación de MTT.

- Figura 36.- Concentración de cAMP en la línea celular HepG2 tratada con melatonina y/o Luzindol (Luz). Captación de MTT.
- Figura 37.- Efecto del tratamiento con melatonina y/o Luzindol (Luz) sobre la fosforilación de ERK
- Figura 38.- Efecto del tratamiento con melatonina y/o Luzindol (Luz) sobre la fosforilación de JNK.
- Figura 39.- Efecto del tratamiento con melatonina y/o Luzindol (Luz) sobre la fosforilación de p38.

TABLAS

- Tabla I.- Sondas utilizadas en la RT-qPCR.
- Tabla II.- Efecto de la administración de melatonina sobre las diversas fases del ciclo celular.

ÍNDICE

1. - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	I
2. - REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Hepatocarcinoma	9
2.1.1 Datos epidemiológicos	9
2.1.2 Factores etiológicos.....	10
2.1.3 Hepatocarcinogénesis	15
2.1.4 Tratamiento actual	21
2.2 Ciclo celular	29
2.2.1 CDK y ciclinas	30
2.2.2 Proteínas Inhibidoras de CDK (CKI).....	32
2.2.3 Vía de señalización RB/E2F.....	36
2.2.4 Procesos de fosforilación y defosforilación de CDK	38
2.2.5 Degradación proteica	40
2.3 Apoptosis	43
2.3.1 Vía Extrínseca o dependiente de receptores.....	44
2.3.2 Vía intrínseca o dependiente de la mitocondria	46
2.3.3 Apoptosis en el HCC.....	52
2.4 MAPK	55
2.4.1 ERK1/2	58
2.4.2 JNK	60
2.4.3 p38.....	63
2.4.4 ERK5.....	65
2.4.5 MAPK en el HCC.....	66
2.5 Melatonina	71
2.5.1 Estructura y síntesis.....	71
2.5.2 Receptores celulares	75
2.5.3 Principales efectos conocidos.....	78
3. - MATERIAL Y MÉTODOS.....	83
3.1 Ámbito y financiación del trabajo. Consideraciones legales y éticas.	85
3.2 Cultivo celular.....	86
3.3 Diseño experimental.....	87
3.3.1 Grupos experimentales	88
3.4 Métodos analíticos	89

3.4.1. Viabilidad celular mediante el ensayo de MTT	89
3.4.2. Viabilidad celular mediante la liberación de lactato deshidrogenasa al medio de cultivo	90
3.4.3 Ciclo Celular mediante citometría de flujo	92
3.4.4 Preparación de homogeneizados totales	95
3.4.5 Fraccionamiento subcelular	96
3.4.6 Determinación de la concentración de proteínas	98
3.4.7 Actividad de las caspasas 3, -8 y -9.....	99
3.4.8 Western Blot.....	102
3.4.9 Extracción y cuantificación del RNA total.....	110
3.4.10 Análisis de expresión génica por retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa en tiempo Real (RT-qPCR)	113
3.4.11 Determinación de la cantidad de cAMP por inmunoensayo	119
3.5 Análisis estadístico	121
4.- RESULTADOS	123
4.1 Efecto de la administración de melatonina sobre la viabilidad celular de la línea HepG2.....	125
4.2 Efecto de la administración de melatonina sobre la muerte celular por apoptosis.....	127
4.2.1 Efecto de la melatonina sobre diversos marcadores de apoptosis	127
4.2.2 Efecto de la melatonina sobre la vía intrínseca de la apoptosis apoptosis	130
4.2.3 Efecto de la melatonina sobre la vía extrínseca de la apoptosis	134
4.3 Efecto de la administración de melatonina sobre el ciclo celular	136
4.4 Efecto de la administración de melatonina sobre la expresión de p53 y p21	137
4.5 Efecto de la administración de melatonina sobre la vía MAPK	140
4.6 Efecto de la administración de melatonina sobre la expresión de sus receptores celulares	143
4.6.1 Efecto de la melatonina sobre la expresión de MT1	143
4.6.2 Efecto de la melatonina sobre la expresión de MT3	145
4.6.3 Efecto de la melatonina sobre la expresión de ROR α	147
4.7 Efecto de la inhibición de MT1 sobre los efectos antitumorales de la melatonina	150
4.7.1 Efecto de la inhibición de MT1 sobre la viabilidad celular en HepG2.....	151

4.7.2 Efecto de la inhibición de MT1 sobre la concentración de cAMP.....	152
4.7.3 Efecto de la inhibición de MT1 sobre la vía MAPK	154
5.- DISCUSIÓN	159
5.1 Efecto de la melatonina en la viabilidad de las células HepG2: potencial interés en el tratamiento del HCC.....	161
5.2 Efecto de la melatonina en la apoptosis de las células HepG2.	166
5.3 Efecto de la melatonina sobre la progresión del ciclo celular en las células HepG2.	169
5.4 Efecto de la melatonina sobre la vía MAPK en las células HepG2.	171
5.5 Contribución de los receptores de la melatonina a su efecto antitumoral en células HepG2.	173
5.6 Efecto de la inhibición del receptor MT1 a los mecanismos antitumorales de la melatonina en células HepG2.	177
6.- CONCLUSIONES	181
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	187

1. - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El carcinoma hepatocelular o hepatocarcinoma (HCC) es el cáncer hepático más frecuente, constituyendo el quinto tipo de tumor más habitual a nivel mundial y la segunda causa de muerte más común por cáncer. La etiología de esta enfermedad es diversa e incluso puede ser multifactorial, sin embargo la hepatitis viral, la cirrosis alcohólica y la esteatohepatitis no alcohólica son las causas más frecuentes de HCC en los países occidentales. Desgraciadamente, al igual que ocurre con otros tipos de tumores, el pronóstico del paciente va a depender mucho del estadio en el que se encuentre el tumor cuando el paciente es diagnosticado, pero también en el grado de funcionalidad hepático. En muchos casos, la mejor opción terapéutica pasa por la extirpación quirúrgica, si es posible, del tumor, o por el trasplante hepático. Sin embargo, existen factores limitantes como la recurrencia del HCC en el hígado subyacente, la escasez de órganos disponibles para su trasplante o a las largas listas de espera. En la actualidad hay disponibles otros tratamientos no quirúrgicos como la ablación percutánea con alcohol, la quimioembolización y la radiofrecuencia, pero que desgraciadamente en muchos casos obtienen resultados más bien discretos. Recientemente, desde el punto de vista quimioterapéutico se están comenzando a desarrollar terapias dirigidas a dianas moleculares que puedan hacer vulnerable al HCC. En este sentido parece que el sorafenib, una pequeña molécula paninhibidora de quinasas capaz de actuar

sobre la serín-treonin quinasa Raf, y sobre las vías de señalización del receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR) y del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), podría suponer algún avance en el tratamiento del HCC aunque con incrementos más bien discretos en la supervivencia media de los pacientes. Otros estudios con moléculas similares se están realizando en la actualidad, aunque los beneficios en la supervivencia de los pacientes parecen poco relevantes hasta ahora.

Tal como ocurre en muchas células malignas los hepatocitos tumorales tienen capacidad para producir señales proliferativas. Además, son relativamente insensibles a las señales anti-proliferativas. Esto hace que puedan dividirse aparentemente sin límites incrementando su número lo que da lugar a la aparición de tumores. Estas características están muy relacionadas con la desregulación del ciclo celular. Además, los hepatocitos tumorales son capaces de evadir la muerte celular programada, apoptosis, de forma que se vuelven prácticamente inmortales. En la actualidad, los estudios básicos interesados en el HCC humano pueden llevarse a cabo mediante diversas vías: obtención de muestras de pacientes, estudios *in vitro* con hepatocitos tumorales humanos y estudio *in vivo* en modelos animales. A pesar de su dificultad, en el presente estudio nos hemos decantado por la realización de un estudio *in vitro*, por considerar que este tipo de estudio presentaba la ventaja de permitirnos profundizar en algunos mecanismos

moleculares implicados en el HCC, puesto que las células humanas que utilizamos son de un mismo origen tumoral (con lo que se favorece la homogeneidad y reproducibilidad). Sin embargo, debido a nuestra experiencia clínica somos conscientes de las limitaciones que un estudio *in vitro* tiene desde el punto de vista de aplicabilidad directa en pacientes.

La melatonina es una sustancia que se ha encontrado en una gran variedad de seres vivos desde bacterias y protozoos, hasta plantas, hongos, invertebrados y vertebrados. En cuanto a los mamíferos, y en concreto al hombre, la melatonina es una hormona sintetizada principalmente por la glándula pineal, aunque parecen existir otras fuentes secundarias de melatonina como son la retina y la médula ósea. La melatonina fisiológicamente, se ha relacionado con la regulación de los ritmos biológicos y como antioxidante natural. En el campo de la oncología, concretamente en cáncer de mama, se ha demostrado que la melatonina parece tener actividad oncostática tanto *in vivo* como *in vitro*. Los datos sobre el efecto de la melatonina en el HCC no habían sido todavía testados, por lo que en este trabajo nos hemos propuesto analizar su efecto sobre los hepatocitos tumorales humanos de la línea HepG2.

Contemplando todo lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo, y dado el creciente interés farmacológico por la melatonina, el objetivo fundamental propuesto en esta Tesis Doctoral es analizar los efectos sobre el ciclo celular y sobre la

apoptosis, así como los potenciales cambios en la expresión de los receptores inducidos tras el tratamiento con melatonina en la línea HepG2 derivada de HCC.

Por ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Comprobar si la administración de melatonina, a diversas dosis y tiempos de exposición, es capaz de reducir la viabilidad celular en la línea derivada de HCC humano HepG2.
- Averiguar si la exposición de las células a melatonina es capaz de alterar la progresión del ciclo de las células HepG2.
- Analizar si la administración de melatonina puede inducir muerte celular por apoptosis de las células tumorales, ya sea por vía intrínseca o bien por vía extrínseca.
- Determinar si existe relación entre el potencial efecto antitumoral de la melatonina y la vía MAPK.
- Identificar la potencial contribución de los receptores celulares de la melatonina a sus efectos antitumorales.

2. - REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hepatocarcinoma

2.1.1 Datos epidemiológicos

El HCC representa del 85-90% de los tumores primarios de hígado a nivel mundial. Así, el HCC es el quinto tumor más frecuente en hombres y el séptimo en mujeres (con 522.000 y 225.000 casos anualmente, lo que representa aproximadamente el 8% y el 6,5% de todos los casos respectivamente) [1].

Los mayores ratios de incidencia de tumores primarios de hígado se alcanzan en el sudeste de Asia y en el África Sub-Sahariana (>80% de los casos, con un ratio de 20 por 100.000 individuos), siendo en China donde aparece el 55% de los casos a nivel mundial (40 por 100.000 en hombres y 15 por 100.000 en mujeres). En general, se estima que en los países del Sur de Europa (como España, Italia o Grecia) se dan ratios de incidencia medios (10-20 por 100.000). Las áreas con incidencia intermedia (6-10 por 100,000) incluyen al Reino Unido (donde curiosamente el colangiocarcinoma, en vez el HCC, es el tumor primario hepático más frecuente), Estados Unidos de América, Francia o Alemania. Las áreas con baja incidencia (<6 por 100,000) incluyen Centro y Sudamérica, Europa (excluyendo los países mediterráneos y los anteriormente citados) y Canadá [2, 3].

En cuanto a su mortalidad es necesario indicar que el HCC constituye la tercera causa de muerte por cáncer a nivel mundial, siendo la supervivencia media menor a un año [1, 4]. Así, se estima que este tipo de tumor es responsable de la muerte de aproximadamente 600.000 personas anualmente en todo el mundo, principalmente en los países en vías de desarrollo, pero con una incidencia preocupantemente creciente en los países desarrollados [1]. Consideramos que todos los datos actuales sobre incidencia y mortalidad del HCC, junto con su potencial tendencia a incrementarse, hacen interesante y pertinente el presente estudio que constituye nuestra Tesis Doctoral.

2.1.2 Factores etiológicos

Como veremos a continuación la etiología del HCC puede estar relacionada con múltiples agentes, si bien este tipo de tumor se desarrolla de forma más habitual a consecuencia de una enfermedad hepática subyacente y mayoritariamente asociada a la cirrosis [5]. El estudio de los agentes etiológicos del HCC resulta de gran interés, no solo desde el punto de vista del análisis molecular de la hepatocarcinogénesis, sino también desde el punto de vista clínico tanto para su prevención como para su tratamiento [6, 7]. Aunque, la etiología de la enfermedad subyacente al HCC varía geográficamente, la infección con el virus de la hepatitis B (HBV)

y/o con el virus de la hepatitis C (HCV) parecen ser la principal causa de HCC en la mayoría de las áreas geográficas. Un importante número de estudios han puesto de manifiesto que en aproximadamente el 85% de los casos de HCC existen marcadores positivos indicativos de la infección con HBV y/o HCV [3, 8, 8-16]. Esta asociación entre dichas infecciones víricas y el desarrollo del tumor ha sido firmemente demostrada tanto en estudios realizados en animales como en estudios epidemiológicos en humanos [17]. No obstante, cabe destacar que diferentes aspectos como el perfil genómico de los pacientes, raza, sexo o incluso factores propios del virus pueden modificar la prevalencia del HCC causada por HCV y/o HBV [3].

Otras etiologías importantes del HCC son la hepatitis alcohólica, la hemocromatosis o la presencia de hígado graso no asociado al alcohol (NASH) [18-21]. Además, también se ha relacionado la aparición de HCC con la exposición a sustancias como el cloruro de vinilo, el tabaquismo, la ingestión de alimentos contaminados con aflatoxina B1, la diabetes, la obesidad, el uso de contraceptivos orales, etc [1, 22-27]. Dichos factores etiológicos pueden actuar combinados en muchos casos y como ya hemos indicado la anteriormente su prevalencia varía según el área geográfica analizada [1].

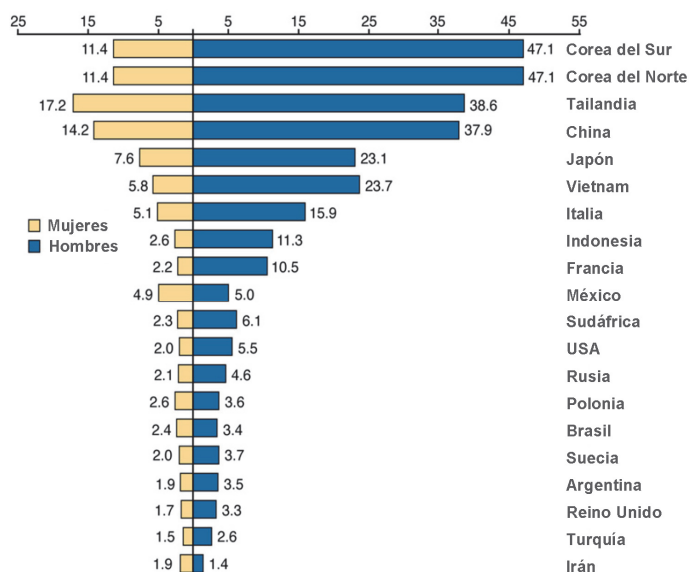


Figura 1.- Incidencia del HCC.

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 complejo 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 DNA. En este sentido, cada vez existen más evidencias que muestran la importancia de la reacción inflamatoria hepática durante la instauración del HCC [28]; por ejemplo, con frecuencia el sistema inmune no es capaz para eliminar la infección completamente en

pacientes con HCV, resultando en una estimulación crónica de la respuesta inmune antígeno-específica [29]. Además, el daño a los hepatocitos puede ser inducido por la expresión continuada de citoquinas y el reclutamiento de linfocitos activados en el hígado en un contexto en el que en muchos casos no existe la producción de anticuerpos anti-HCV [8]. Este ciclo persistente de inflamación y regeneración de hepatocitos favorece la aparición de un microambiente que puede favorecer el desarrollo del HCC [18, 30, 31]. En el caso de la infección por HBV, algunos estudios han puesto de manifiesto que su erradicación, con el consiguiente bloqueo de la inflamación, reduce la probabilidad de padecer HCC [32].

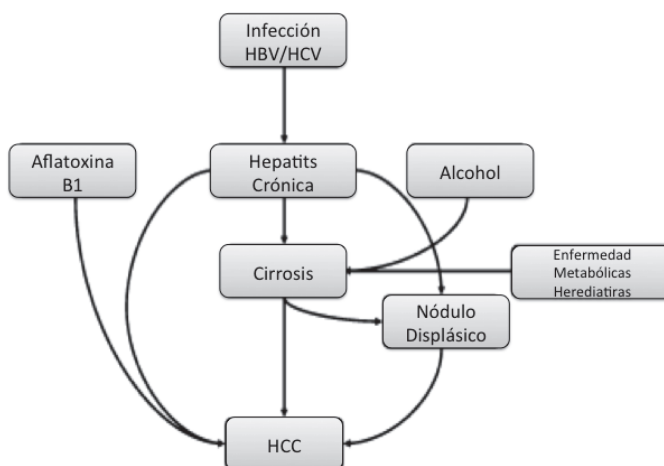


Figura 2.- Etiología del HCC. En la mayor parte de los casos, el HCC aparece en pacientes que presentan una enfermedad hepática crónica, como hepatitis crónica o cirrosis que puede ser inducida por múltiples agentes.

El HCC es un tumor asociado a diferentes etiologías y cuya formación requiere un proceso largo y complejo. Así, el incremento del recambio celular hepático, la inflamación sostenida y el daño al DNA pueden contribuir a 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 [33]. Como veremos a continuación, durante la instauración del HCC pueden aparecer múltiples alteraciones genéticas que confieren ventajas a las células tumorales frente a los hepatocitos sanos, favoreciendo tanto su proliferación como su supervivencia. Así, durante el estado preneoplásico, 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 claramente elucidados en detalle [34].

2.1.3 Hepatocarcinogénesis

Como ya hemos indicado en el apartado anterior el HCC es un tipo de tumor cuya etiología puede ser variada e incluso multifactorial. La formación del HCC, o hepatocarcinogénesis, es un proceso bastante largo en humanos que en la mayoría de los casos requiere hasta unos 30 años de desarrollo secuencial [34]. La gran heterogeneidad genética que exhibe el HCC sugiere que existen múltiples vías moleculares implicadas en la hepatocarcinogénesis [35].

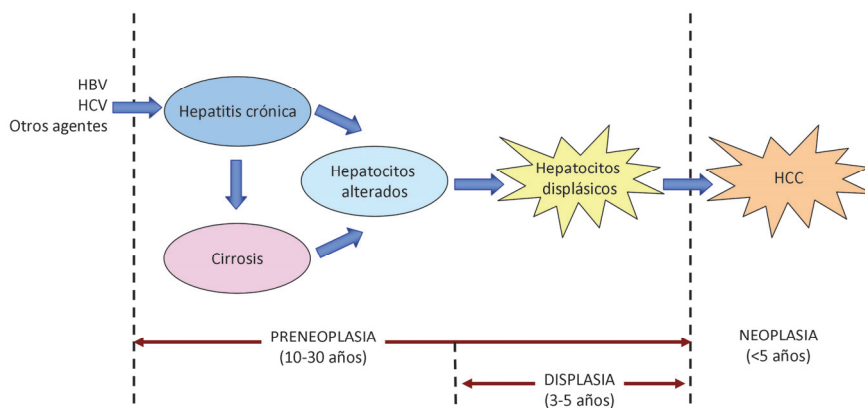


Figura 3.- Proceso de hepatocarcinogénesis. El proceso de hepatocarcinogénesis puede estar inducido por múltiples agentes etiológicos. La hepatocarcinogénesis humana puede prolongarse por un periodo de tiempo mayor de 30 años.

En una primera fase las lesiones que comúnmente preceden al HCC (hepatitis crónica y cirrosis) darán lugar a la

aparición de hepatocitos fenotípicamente alterados que pueden ir formando pequeños focos de células displásicas generalmente con diámetros menores a 1 mm. La formación de dichos focos ocurre durante la denominada fase de preneoplasia y puede llevar de 10 a 30 años [34, 36]. 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 cromosómica de tejidos que presentaban displasia nodular reflejaron un patrón muy similar de alteraciones observadas también en HCC [37]. Este hecho implica que la displasia nodular es una lesión precancerosa en el proceso de hepatocarcinogénesis [38].

Posteriormente, durante la denominada fase de displasia que puede durar de 3-5 años, los diámetros de dichos focos se incrementan (1 mm – 1 cm) formándose los nódulos displásicos, que puede considerarse ya lesiones precancerosas [39]. Tradicionalmente se diferenciaba entre displasia de células grandes y displasia de células pequeñas; aunque ambas están asociadas con el HCC, en la actualidad se considera que sólo la displasia de células

pequeñas puede considerarse como precursora directa en este tipo de tumor [40].

En la última fase de la hepatocarcinogénesis, neoplasia, ocurren modificaciones moleculares que llevan a las células displásicas a proliferar e incluso a evadir la muerte celular por apoptosis dando lugar al HCC. Dicha fase final de neoplasia ocurre en un espacio de tiempo más breve (< 5 años) TG. 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 cDNA 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 [41-47]. 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. Lógicamente, ocurren cambios en otros genes importantes como supresores de tumores como p53 o INK4/ARF, reguladores negativos de supresores de tumores como el Homólogo Humano del gen Murino *double minute 2* (MDM2) o la gankirina, genes relacionados con la parada del ciclo celular como p16 y p27, factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento

Transformante beta (TGF- β), genes que codifican para receptores como el Receptor 2 del Factor de Crecimiento de Tipo Insulínico (IGF2R), etc. También, pueden ocurrir modificaciones genéticas relacionadas con la modulación de la apoptosis y/o de diversas vías de regulación oncogénicas incluyendo las relacionadas con las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), myc, proteína quinasa B (AKT/p13K) o la proteína homóloga de la fosfatasa y la tensina (PTEN) [36]. Además, pueden estar involucradas vías relacionadas con el desarrollo como WNT/ β -catenina, Hedgehog y Met [48]. Todos estos factores convergen dando lugar a proliferación celular, aparición de células madre tumorales, inmortalidad celular e incluso reversión en el acortamiento de telómeros [49]. A todo ello habría que añadir la modulación de microRNA que pueden participar en la regulación de todos estos cambios genéticos contribuyendo a la hepatocarcinogénesis; así se han descrito incrementos en miR-21, 34a, 221/222 y 224, mientras que reducen su expresión miR-122, 145, 199a, 106a, 92, 17.5p, 20 o 18. Los adenomas y nódulos displásicos no muestran cambios en miR-21, 224, 106a, 203, 106, 222, 122a and 422b [50].

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 DNA y modificaciones de las histonas asociadas que modifican, de manera

estable, la transcripción génica pero no la secuencia del DNA. Estas modificaciones parecen jugar un papel importante siendo esenciales para el desarrollo y la diferenciación [51, 52]. Las más frecuentes están relacionadas con la metilación de las citosinas [53]. En mamíferos esta modificación se encuentra en los elementos CpG repetitivos o ligados a un promotor, siendo las más importantes las 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 [54, 55]. 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 E-cadherina, la familia 1A de asociación al dominio RAS (RASSF1A), glutatión S-transferasa pi-1 (GSTP1), la proteína supresora de la señalización de citoquinas (SOSC-1), proteína 1 relacionada con la proteína *frizzled* soluble (SFRP1) y PTEN [56-61]. Distintos estudios revelan que la metilación del DNA que codifica para genes supresores de tumor en un proceso temprano durante la hepatocarcinogenesis y también puede encontrarse en tejido hepático no tumoral [62-64], hallándose incrementada a medida que el tumor se va desarrollando pasando por los estadios previos al mismo [65, 66]. En células de mamífero la metilación del DNA se establece y mantiene debido a la existencia de unas enzimas denominadas DNA metiltransferasas (DNMT): DNMT3A y DNMT3B. Una tercera

enzima de este tipo es la denominada DNMT1 encargada únicamente del mantenimiento de las metilaciones [67-69]. Diversos investigadores han puesto de manifiesto la existencia de la sobreexpresión de estas tres enzimas en HCC [70].

Curiosamente, se ha propuesto un papel de las células madre hepáticas en la hepatocarcinogénesis, dichas células actúan normalmente como células progenitoras diferenciándose en hepatocitos y células de los ductos biliares. Así, se ha observado la existencia de unas células denominadas ovas, que no aparecen en el hígado sano pero cuyo número se incrementa según la cirrosis va progresando [71]. Muchos HCC expresan marcadores de células ovas, así como también aproximadamente el 50% de los focos displásicos y de los adenomas hepáticos. Además, muchos HCC contienen células que son ultraestructuralmente idénticas a las células progenitoras hepáticas, lo que podría suponer un nexo entre dichas células madre hepáticas y las células ovas [72]. Desgraciadamente, las células madre hepáticas que aparecen en los HCC son muy resistentes a la quimioterapia y favorecen por ello la progresión del tumor cuando se hallan dañadas. Se han realizado análisis para intentar establecer las similitudes y las diferencias entre las células madre hepáticas en hígados sanos y aquellas que aparecen en HCC, aunque este trabajo debe ser todavía completado [73]. Finalmente, aumentando más la complejidad de la potencial relación entre células madre y células ovas, se ha

descrito que además es posible que también células madre extrahepáticas, circunstancialmente, puedan diferenciarse en el tejido hepático pudiendo contribuir a la hepatocarcinogénesis [74].

2.1.4 Tratamiento actual

Como ya se ha indicado con anterioridad, la hepatocarcinogénesis en la mayoría de los casos va a estar ligada a la presencia de una enfermedad hepática crónica subyacente. En el ambiente clínico se puede detectar una lesión focal hepática, susceptible de tratarse de HCC, en dos ambientes totalmente diferentes: cuando se evalúa a un paciente sin enfermedad hepática conocida (ya sea en consulta ambulatoria u hospitalaria con alguna complicación como ictericia, ascitis, encefalopatía hepática, hemorragia digestiva o agravamiento del estado general) o en un paciente con cirrosis hepática ya conocida. En el primer caso, puede que el paciente presente un tumor ya muy evolucionado y en la mayoría de los casos no sea candidato a tratamiento curativo. En el segundo caso, se puede diagnosticar hasta un 30-40% de pacientes que puedan recibir tratamiento curativo [75, 76].

Una primera línea de lucha contra el HCC consiste en la prevención de dichas enfermedades crónicas, así se ha visto como el uso de antivirales o la vacunación frente al HBV contribuye en la

reducción de la incidencia de este tipo de tumor [77, 78]. Lógicamente, este tipo de medidas profilácticas no resultan útiles clínicamente para bloquear el desarrollo del HCC una vez que la cirrosis se ha establecido [79]. Desgraciadamente, los primeros estadios de esta enfermedad son asintomáticos y por ello muchos pacientes son diagnosticados en fases intermedias o avanzadas cuando la terapias resultan ya menos efectivas [80].

Con objeto de intentar incrementar el número de pacientes diagnosticados en los primeros estadios se han incluido programas de vigilancia periódica o *screening* en las Guías Clínicas [79]. En Japón aproximadamente el 30% de los pacientes son diagnosticados cuando los tumores tienen un diámetro menor a 2 cm; sin embargo, en USA menos de un 20% de los pacientes cirróticos que han desarrollado HCC han sido incluidos en algún programa de vigilancia [81]. No se conoce cuál es el procedimiento ideal de *screening* para el diagnóstico precoz del HCC, existe cierto debate sobre diversos aspectos a dilucidar como si se deben aplicar los programas de vigilancia a todos los pacientes cirróticos o solo aquellos de mayor riesgo, la periodicidad de las evaluaciones, las pruebas diagnósticas más adecuadas o incluso la eficiencia en términos coste-beneficio intentando mejorar el diagnóstico para lograr un mayor número de pacientes que puedan ser sometidos a un tratamiento curativo y de esta forma aumentar la supervivencia [75].

La estrategia terapéutica a utilizar va a variar mucho según el estadio del paciente. Como indicábamos en la introducción de esta Tesis Doctoral, en muchos casos y dependiendo del estadio del tumor, la mejor opción terapéutica puede pasar por la extirpación quirúrgica del tumor si es posible, o por el trasplante hepático. Sin embargo, existen factores limitantes como la recurrencia del HCC en el hígado subyacente, la escasez de órganos disponibles para su trasplante o a las largas listas de espera. Según el estadio del tumor hay disponibles otros tratamientos no quirúrgicos como la ablación percutánea con alcohol, la quimioembolización y la radiofrecuencia, pero que desgraciadamente en muchos casos obtienen resultados más bien discretos. Además, un importante problema en el tratamiento del HCC es su alta recurrencia en pacientes previamente tratados.

No resulta sencillo diseñar una buena clasificación pronóstica que tenga en cuenta las diversas variables de interés relacionadas con el tumor (estadio, agresividad y patrón de crecimiento), el estado general del paciente, la función hepática (medida mediante la escala de Child-Pugh) [82, 83] y el tratamiento que se aplique (Linares 2004). Las escalas más utilizadas son la Clasificación o Algoritmo de Barcelona (*BCLC – Barcelona Liver Cancer*) [84, 85], la clasificación de Okuda [86], la Clasificación CLIP (*Cancer of the Liver Italian Program Investigators*) [87, 88] y la TNM (Tumor-Nódulo-Metástasis) modificada [89, 90]. La más utilizada

en nuestro ambiente hospitalario es la BCLC, que ha sido aprobada para su uso clínico rutinario tanto por la Asociación Americana para el Estudio de la Enfermedades Hepáticas como por la Asociación Europea para el Estudio del Hígado. La clasificación BCLC sirve además, a los investigadores, para unificar los criterios de inclusión para el diseño y comparación de estudios clínicos [91].

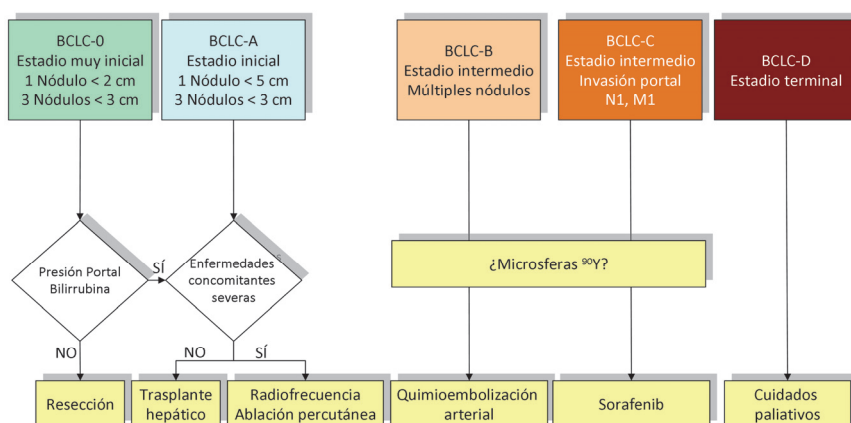


Figura 4.- Algoritmo para el tratamiento del HCC. Este algoritmo se basa en la clasificación en BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer).

Según el algoritmo BCLC, los pacientes en los primeros estadios del HCC (BCLC 0-A) deben ser sometidos a terapias radicales como la resección quirúrgica del tumor, el trasplante hepático y la ablación percutánea, obteniéndose ratios de supervivencia a los 5 años de entre el 60-70% [80]. En pacientes con un solo nódulo y sin hipertensión portal se recomienda la

resección; mientras que en aquellos con un solo nódulo (<5 cm) o con tres nódulos (<3 cm), pero con hipertensión portal o disfunción hepática, se debe llevar a cabo trasplante hepático según los criterios de Milán [92]. Se ha indicado que análisis moleculares del tejido tumoral y del tejido cirrótico subyacente pueden contribuir a seleccionar a los candidatos más adecuados para el trasplante. En el caso de pacientes con tumores pequeños y contraindicación para terapias quirúrgicas pueden ser tratados mediante técnicas ablativas [91]. Sin embargo, la recurrencia del HCC a los 5 años es del 70% después de la resección o ablación tumoral [93].

Según el algoritmo BCLC, los pacientes en estadios intermedios de la enfermedad (BCLC-B) son candidatos para la quimioembolización transarterial, técnica que permite un control locorregional del HCC e incrementa la supervivencia en 20-25 meses [94-96]. Los avances en esta técnica, como el uso de semillas que permiten la liberación del fármaco reduciendo la toxicidad sistémica típica de la quimioembolización transarterial convencional [97, 98]. En la actualidad, se están evaluando otras posibilidades como la radioembolización con microesferas de un isótopo del lantánido itrio denominado ^{90}Y con resultados bastante potencialmente interesantes [99].

Finalmente, pacientes con estadios avanzados de HCC (BCLC-C) son candidatos para ser tratados con sorafenib (400 mg/2

veces al día) [100]. Dicha recomendación se basa fundamentalmente en el ensayo clínico denominado SHARP (*Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol*) que demostró un incremento significativo, aunque discreto, de la supervivencia media de los pacientes tratados con sorafenib (10,7 meses) frente a los tratados con placebo (7,9 meses) [100].

Está claro, que una las herramientas más actuales en el tratamiento del HCC la constituye la administración de sorafenib. Sorafenib forma parte de las nuevas estrategias quimioterapéuticas que están comenzando a desarrollarse en el tratamiento del HCC, las denominadas terapias dirigidas a dianas moleculares. Dado que por ahora no existe una terapia sistémica efectiva en el tratamiento del HCC, los resultados satisfactorios aunque discretos del sorafenib han representado un importante avance, aunque no parece constituir aún la terapia ideal para este tipo de tumor [101]. Concretamente, el sorafenib es un pequeña molécula paninhibidora de quinasas capaz de actuar sobre las serín-treonin quinasas de la familia Raf, y sobre las vías de señalización del receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR) y del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) [18]. Esta estrategia puede resultar útil puesto que el HCC es un tumor que se caracteriza por un aumento de la angiogénesis y por la inducción de diversas vías de señalización intracelular en las que las quinasas juegan un papel

relevante [102]. El sorafenib bloquea diversas de estas vías de señalización como las relacionadas con la proliferación celular (MAPK-Ras), la angiogénesis (a través de VEGFR y PDGFR) e incluso otras vías relacionadas con receptores como KIT, FLT-3 y RET [103]. También, desde el punto de vista molecular, un estudio clínico en fase II con sorafenib mostró que los pacientes con tumores que expresaban mayores niveles de una proteína de la vía MAPK denominada quinasa regulada por señal extracelular (ERK), en su forma fosforilada, tenían mayor supervivencia que aquellos con menores niveles de pERK [104]; sin embargo, estos hallazgos no pudieron ser confirmados en el ensayo en fase III [91]. Desgraciadamente el uso de sorafenib no está exento de contraindicaciones y problemas; así, está contraindicado en pacientes aquejados de enfermedad cardiovascular, hipertensión portal o disfunción hepática (Child-Pugh >B7). Los pacientes con diabetes mellitus o hipertensión arterial deben ser tratados y controlados antes de comenzar el tratamiento con sorafenib. Una vez iniciado en tratamiento con ésta molécula los pacientes deben ser monitorizados para controlar la toxicidad asociada al fármaco. Las reacciones en la piel, incluyendo pies y manos, como sequedad, prurito, picor, desescamación, alopecia o erupciones de tipo psoriásico aparecen hasta en el 40% de los pacientes. Además, en hasta el 30% pueden aparecer toxicidades gastrointestinales como diarrea severa, estomatitis, náuseas o vómitos. Otros efectos

tóxicos que pueden aparecer incluyen fatiga, pérdida de peso, cambios en la voz o hipertensión [91]. Se ha observado que algunos pacientes que reciben sorafenib tienen valores elevados en las transaminasas hepáticas alanina aminotransferasa/aspartato aminotransferasas, alfa-fetoproteína y bilirrubina [103]. Finalmente, existen otros problemas con el sorafenib como la reducción de la eficacia a lo largo del tiempo debido a la aparición de resistencias a través de diversas vías como la resistencia al tratamiento anti-VEGF y otros mecanismos de compensatorios o de escape [105, 106].

Dados los resultados alcanzados con sorafenib, y la existencia de pacientes intolerantes al mismo, en la actualidad se están llevando a cabo más de 200 estudios clínicos con hasta 50 moléculas diferentes (erlotinib, linifanib, brivanib, everolimus, ramucirumab, etc), aunque los beneficios en la supervivencia de los pacientes parecen poco relevantes hasta ahora en la mayoría de los casos [91]. Desde nuestro punto de vista, está claro que es necesario llevar a cabo más investigaciones para mejorar los tratamientos actuales, implementar otros nuevos tratamientos de primera línea o incluso co-adyuvantes, con el objeto de mejorar la supervivencia de los pacientes y reducir la recurrencia del tumor. Dichas investigaciones deben realizarse coordinando la investigación básica, la clínica y la labor del médico que está tratando directamente a los pacientes. Por todo ello, es primordial fomentar la inter-relación entre los grupos de investigación tanto

básicos como clínicos y los profesionales sanitarios, favoreciendo la realización de estudios *in vitro* como el que nos ocupa en la presente Tesis Doctoral, *in vivo* y ensayos clínicos.

2.2 Ciclo celular

El ciclo celular es un proceso complejo en el que una célula debe completar una serie ordenada de acontecimientos que culminará originando dos células hijas iguales. La desregulación de la maquinaria molecular implicada en el ciclo celular es algo característico de la mayoría de los tumores [107, 108]

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 [109, 110].

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 primer punto de control denominado punto de restricción, *START* o de no retorno. 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. Dicha está controlada por activación e inactivación de quinasas dependientes de ciclinas (CDK), que desencadenan la transición a las siguientes fases del ciclo. Estas proteínas CDK son proteín-quinasa 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 CDK, 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 inhibitoras que se asocian a las CDK o al complejo ciclina CDK [111].

2.2.1 CDK y ciclinas

La actividad de las CDK requiere la unión de una proteína reguladora denominada ciclina. Cada CDK será capaz de interactuar con una o varias ciclinas específicas, formando complejos ciclina-CDK diferentes según el momento del ciclo celular. Así, Las ciclinas

se sintetizan y se destruyen en determinados momentos durante el ciclo celular, haciendo que las CDK estén activas solo temporalmente [112]. De todas las ciclinas existentes solo unas pocas formarán complejos ciclina-CDK implicadas en el control del ciclo [113].

Entre las CDK podemos, al menos, diferenciar las denominadas CDK de interfase (CDK2, CDK4 and CDK6), la CDK de la mitosis (CDK1 también conocida como CDC). Entre las ciclinas podemos diferenciar al menos diez proteínas 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 [114].

Las señales que inducen proliferación y mitosis, son capaces en última instancia de inducir la expresión de las ciclinas de tipo D (D1, D2 y 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 DNA [114]. 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 a CDK2 [115]. El complejo CDK2–ciclina E fosforila estas proteínas de la familia RB dando lugar a su

inactivación total [116, 117]. La disponibilidad de las ciclinas E durante el ciclo celular está estrechamente controlada y limitada hasta los primeros estadios de la síntesis de DNA, siendo este complejo esencial para controlar la transición entre G_1 y S [117]. Más tarde CDK2 es activada por la ciclina A, en los estadios tardíos de la replicación del DNA para conducir la transición entre la fase S y mitosis, periodo conocido como fase G_2 . 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 continuación de la mitosis celular. Así, cada fase del ciclo va a depender de la formación de complejos ciclina-CDK específicos, existiendo distintos niveles de regulación, como la síntesis/destrucción o la fosforilación/desfosforilación, para controlar la proliferación de los diversos tipos celulares [108].

2.2.2 Proteínas Inhibidoras de CDK (CKI)

La progresión a través del ciclo celular está regulada por las actividades coordinadas de los complejos ciclina-CDK. Dichos complejos están regulados de manera muy importante por la unión a los inhibidores de CDK (CKI) [118]. Se han descrito hasta el

momento dos familias de CKI: la familia INK4 y la familia 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 [119]. 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, la familia Cip/Kip es capaz de unirse tanto a las ciclinas como a las CDK, modulando la actividad de los complejos ciclina-CDK [120]. Por ello, la familia INK4 solo realiza su actividad durante la fase G₁, mientras que la familia Cip/Kip es capaz de funcionar durante todo el ciclo celular no estando restringido solamente a la fase G₁ [119].

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 la treonina 145 y en la serina 153 es capaz de inducir la retención citoplásmica de p21 [121-124]. Además, las proteínas de esta familia Cip/Kip también son capaces de modular la progresión del ciclo celular, independientemente de los complejos ciclina-CDK, a través de la inhibición de componentes de la maquinaria de replicación. Así por ejemplo, p21 y p57 son capaces de unirse al antígeno de

proliferación nuclear (PCNA), proteína cuya función principal es dar procesividad a la DNA polimerasa, bloqueándose en ese momento la síntesis de DNA [125, 126]. Curiosamente, aunque el tercer miembro de la familia, p27, no parece capaz de unirse a PCNA, puede bloquear la replicación por medio de la inhibición de la proteína 7 mantenimiento de minicromosomas (MCM7), subunidad de la helicasa de la horquilla de replicación [127].

La actuación de las proteínas CKI sobre los complejos CDK-ciclina sigue un protocolo relativamente complejo a lo largo del ciclo celular. Tanto CDK4 como CDK6, ambas CDK correspondientes a la fase G₁, tienen como sustrato principal a RB [128-130].

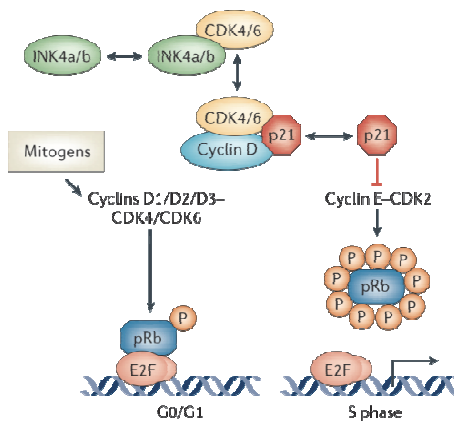


Figura 5.- Control de la progresión del ciclo celular entre fase G₀/G₁ y fase S. Los mitógenos estimulan la asociación de las ciclinas con sus respectivas CDK induciendo la fosforilación de pRb para la síntesis de proteínas requeridas en la fase S. Distintos CKI se pueden asociar a las

CDK o a los complejos CDK-ciclina evitando su acción y la progresión del ciclo.

En células en proliferación, a medida que el ciclo progresa, CDK4 forma complejos con ciclina D y p27 o p21, siendo en ese momento liberado p27 de los complejos CDK2-ciclina E y CDK2-ciclina A por los complejos CDK4-ciclina D, evento que hace que en ese momento 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 continuación del ciclo hacia la fase S. La unión directa de las proteínas CDK4 y CDK6 a la familia de proteínas INK4 bloquea los complejos catalíticamente activos de ciclina D-CDK [131]. Cuando existe una elevada expresión de proteínas de la familia INK se observa la parada del ciclo celular en G_1 , siendo éste dependiente de la existencia de RB funcional [132].

Por otro lado p19 no es capaz de unir CDK pero interacciona con mdm2 siendo capaz de conducir a la parada del ciclo en G_1 y G_2 [133-136]. Tal interacción conduce a la relocalización de mdm2 mediada por estabilización de p53, desde el núcleo al nucléolo [135, 137].

2.2.3 Vía de señalización RB/E2F

El denominado punto de restricción, *START* o punto de no retorno, se localiza en la fase G_1 , previo a entrada en fase S. En situaciones fisiológicas cuando las células superan dicho punto son están comprometidas 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 [138].

En este punto juega un papel clave el tándem formado por las proteínas RB y E2F. Básicamente, las proteínas de la familia RB actúan impidiendo la acción de E2F como factor de transcripción[139]. De esta forma, una vez que la existencia de estímulos mitóticos es suficiente, E2F puede liberarse de RB y se mantiene funcional independientemente de estímulos adicionales actuando como factor de transcripción favoreciendo la expresión de diversas proteínas relacionadas con el ciclo y la progresión celular. En cuanto al otro miembro del tándem, RB, se trata de una familia de proteínas que en mamíferos está compuesta por tres miembros, RB/p105, p107 y RB2/p130. Las proteínas RB son capaces de unirse a E2F, estando su actividad controlada por fosforilaciones, de modo que la hiper-fosforilación inactivará a las proteínas de la familia RB permitiendo la liberación de los factores de transcripción E2F que en ese momento actúan en el núcleo

induciendo la expresión proteica [140]. La sobreexpresión de cualquier miembro de la familia RB tiene como consecuencia la parada del ciclo en G_1 al secuestrar al E2F libre [141, 142].

Aunque cualquier miembro de la familia es capaz de unir factores de transcripción de la familia E2F, RB/p105 se une específicamente a E2F1, además p107 y p130 son capaces de unirse también a ciclinas e inhibir la actividad del complejo ciclina-CDK [143, 144]. La hiper-fosforilación de RB se lleva a cabo por los complejos ciclina D-CDK4 o ciclina D-CDK6 durante la fase G_1 temprana y media, y por el complejo ciclina E-CDK2 en G_1 tardía; siendo en el primer caso primero influida por las señales mitóticas e independiente en el segundo [115, 145]. Mientras RB está en su estado hipofosforilado, inactivo, está asociado junto a 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 G_1 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 respectivamente en la remodelación de nucleosomas, acetilación/deacetilación de histonas y mutilación [146].

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 del la proteína CKI p27 [147].

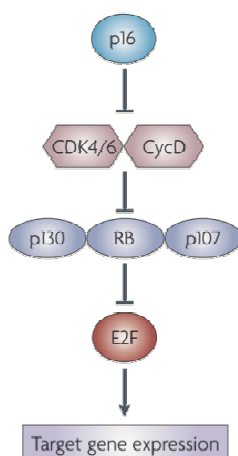


Figura 6.- Interacciones entre reguladores de la progresión hacia la fase S del ciclo.

2.2.4 Procesos de fosforilación y defosforilación de CDK

La actividad de los complejos ciclina-CDK también es controlada por mecanismos de fosforilación y defosforilación, habiendo sido descrito previamente que se mantienen inactivos

por la fosforilación de residuos importantes en su actividad por parte de las quinasas WEE1 y MYT1 [112]. La activación de estos complejos, cuando es necesaria, es realizada por una familia de fosfatasas denominada CDC25 que elimina tales fosforilaciones lo que permite activar al complejo ciclina-CDK. También, es necesaria la actividad de la denominada quinasa activadora de CDK (CAK) que fosforila al complejo con objeto de lograr su mayor actividad [148].

No todas estas proteínas se encuentran funcionales durante todo el ciclo celular, en concreto CDC25 está implicada en el control de la transición hacia la fase S (activando los complejos CDK2-ciclina E y CDK2-ciclina A) y en la transición hacia la fase M (activando el complejo CDK1-ciclina B) [149, 150]. Algo similar ocurre con la quinasa WEE1, que puede actuar evitando la entrada en la fase M al fosforilar al complejo CDK1-ciclina B [151].

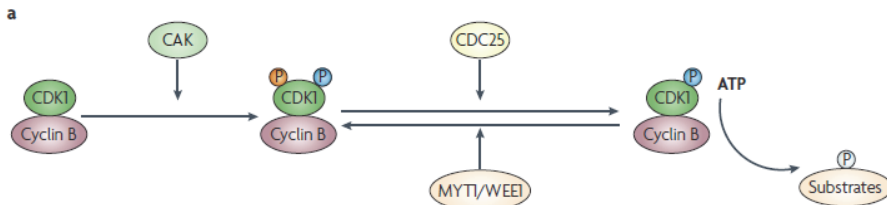


Figura 7.- Regulación mediante fosforilación de los complejos CDK-ciclina

2.2.5 Degradación proteica

Como ya hemos indicado anteriormente, la regulación de las CDK 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 [152]. Ello es debido tanto a la síntesis y como a la degradación (proteólisis) constante de las ciclinas, siendo este último proceso ejecutado por el sistema del ubiquitín-proteasoma (Ub/UPS) [153].

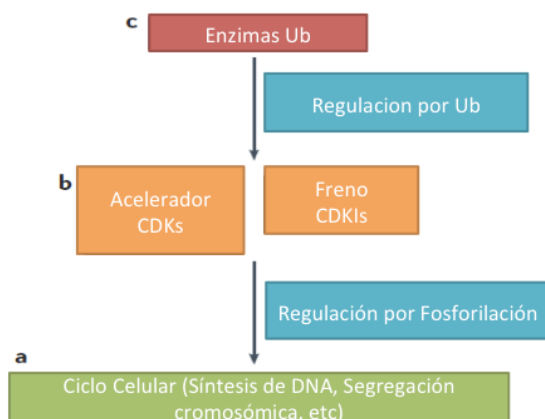


Figura 8.- Control del ciclo celular. Los fenómenos inmediatos (a) están controlados por fosforilaciones. El movimiento a través del ciclo (b) depende de la actividad de CDK y se reprime por medio de CKI. Las proteínas del ciclo se controlan mediante degradación por unión de Ub (c).

Además de las ciclinas, los CKI 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 [154]. La unión de múltiples moléculas de ubiquitina está mediada por tres enzimas: enzima activadora de ubiquitina (E1), enzima conjugadora de ubiquitina (E2) y la ubiquitín ligasa (E3) [155].

Se cree que dentro del Ub/UPS el componente E3 es responsable del reconocimiento de proteínas diana. Dos tipos de este componente E3, el primero denominado complejo SKP1–CUL1–F-box-protein 8 (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 [156, 157].

Las funciones del SCF y APC/C son distintas, actuando cada uno en un momento diferente del ciclo; así APC/C está activo desde anafase hasta el final de fase G_1 , mientras que SCF funciona principalmente en la transición entre G_1 y S, aunque es activo desde G_1 tardía hasta mitosis temprana [155].

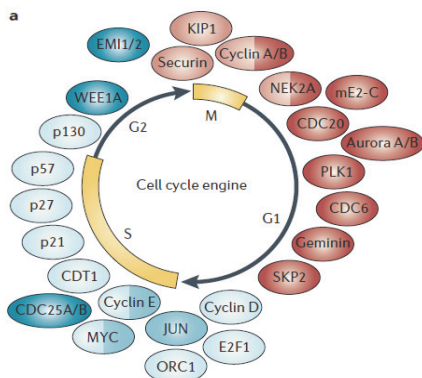


Figura 9.- Actuación de los complejos SCF y APC/C en distintos estadios del ciclo celular. El primero actúa desde G₁ tardía hasta fase M temprana, mientras que el complejo APC/C es activo desde fase M media hasta el final de G₁.

2.3 Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada consiste en un proceso ordenado por el que la célula muere ante estímulos extra o intracelulares [158]. Se trata por ello de un programa de muerte celular, secuencial y muy regulado, que puede ocurrir 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 [159]. Este tipo de muerte, al contrario de lo que ocurre en la necrosis, puede afectar a grupos de células o incluso a sola célula individualmente; ello permite minimizar el daño a células vecinas y evitar una respuesta inmune innecesaria [160]. Una vez dismantelada la célula, los restos celulares son eliminados por células fagocíticas [158].

La apoptosis es un proceso complejo, con gran importancia para comprender tanto la fisiología como la fisiopatología humana y animal, por lo que en su estudio se ha concentrado un gran esfuerzo investigador [161]. En todo este proceso de muerte celular juega un papel importante una familia de serín-treonin proteasas denominadas caspasas que procesan y lisan 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 [162-164]. 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 dependiente de receptores) y la intrínseca (vía mitocondrial) [159]. La modificación de los diversos reguladores de la apoptosis puede conducir a la disfunción de las caspasas y potencialmente contribuir a la aparición de tumores en distintos tejidos [165].

2.3.1 Vía Extrínseca o dependiente de receptores

La vía extrínseca puede ser activada a través de los receptores de muerte o *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 (ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral). La activación de cualquiera de los dos receptores resulta en la agregación y el reclutamiento de una molécula adaptadora denominada FADD (Dominio de muerte asociado a la proteína FAS) [166].

Los TNFR son una superfamilia de genes constituida por más de 20 miembros. Las proteínas TNFR presentan un amplio

rango de acciones biológicas, entre las que se encuentran la regulación de la muerte celular, supervivencia, diferenciación o control inmune [167, 168]. En los últimos años, esta familia de receptores ha emergido como un prometedor candidato en la terapia antitumoral, sin embargo todavía es necesario profundizar mucho más en su funcionamiento y en sus características específicas [169]. Estos receptores involucrados en la apoptosis comparten todos ellos un dominio intracelular denominado dominio de muerte (DD, *Death domain*). Dichos dominios juegan un papel crucial para transmitir la señal desde la superficie celular hacia el interior de la célula mediante diversas vías de señalización. Los mejor caracterizados son CD95 (APO-1/Fas), receptor 1 de TNF (TNFR1), receptores TRAIL 1 y 2 (TRAIL-R1 y TRAIL-R2 respectivamente) [168, 169]. Siendo diversos sus ligandos, como por ejemplo: el ligando CD95 (CD95L o FasL), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el factor de necrosis tumoral beta (TNF- β) y TRAIL. Una vez activado el receptor (CD95 L o TRAIL-R) se produce el reclutamiento de la molécula adaptadora FADD que va ser capaz de reclutar a la caspasa 8 para formar el complejo DISC (complejo de señalización inducido por CD95) [170]. La unión de la caspasa 8 para formar el complejo DISC conduce al autoprosesamiento de la misma y a su activación. Se inicia en ese momento una cascada de activación de diversas caspasas; así, la caspasa 8 será capaz de

activar a caspasas efectoras tales como la caspasa 3 que participará en la lisis de los diversos componentes celulares [166].

2.3.2 Vía intrínseca o dependiente de la mitocondria

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 proapoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2 [171]. Distintos estímulos citotóxicos y señales proapoptóticas convergen en la mitocondria siendo capaces de inducir dicha permeabilización de la membrana mitocondrial externa [171, 172]. Este proceso está regulado, además de por miembros de la familia de proteínas Bcl-2, por lípidos mitocondriales, proteínas que regulan el metabolismo energético y componentes del poro de transición mitocondrial [171]. 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 la endonucleasa G. Una vez en el citosol, estas proteínas proapoptóticas desencadenan la activación de las caspasas [173].

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 [174]. 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 [175]. 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 [176]. 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.

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 a una serie de inhibidores endógenos de las caspasas denominadas proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) tales como XIAP, cIAP1, cIAP2, Smac, survivina o Apollon [173, 175-179]. La existencia de moléculas capaces de inhibir IAP hace que exista un equilibrio dinámico entre los efectores pro y antiapoptóticos permitiendo a la célula una regulación estricta de la apoptosis por vía intrínseca. Si el daño mitocondrial es limitado, los IAP pueden bloquear la activación de caspasas iniciada por la liberación del citocromo C;

sin embargo, si el daño mitocondrial es más grave o afecta simultáneamente a muchos de estos orgánulos, las proteínas proapoptóticas superan y se imponen sobre las antiapoptóticas (IAP superadas por concentraciones citosólicas mayores de sus antagonistas como Smac y Htra2) neutralizándolas por su unión directa [166].

Tal vez las proteínas más importantes en el proceso de la apoptosis por vía son las de la familia Bcl-2 [180]. Esta familia puede dividirse en tres clases diferentes: antiapoptóticas, proapoptóticas y BH3-*only* [181]. Durante los últimos años, la familia Bcl-2 ha sido objeto de atención para el desarrollo de nuevas moléculas dirigidas contra las células tumorales que presentan resistencia a la apoptosis [180].

Entre los miembros de la familia Bcl-2 con función antiapoptótica, se incluyen las proteínas Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1 y Bcl-B. Estas proteínas antiapoptóticas actúan 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, existiendo evidencias de que cada tipo celular requiere la protección de al menos un miembro antiapoptótico 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 antiapoptóticos de la familia Bcl-2 aumenta la muerte celular en distintos tipos celulares, debido al balance con los miembros proapoptóticos [182-185].

A la segunda de las clases, con función proapoptótica, pertenecen las proteínas Bax, Bak y Bok. Dichas proteínas son muy importantes, ya que son capaces de inducir la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, con la consiguiente liberación de moléculas proapoptóticas de la mitocondria, conduciendo a la activación de las caspasas [181]. La inexistencia por separado de Bax y Bak 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 [186-188]. 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 [189-191]. 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 [189, 190, 192, 193]. Se cree que tanto los polímeros de Bax como de Bak provocan o contribuyen a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial,

permitiendo la salida de proteínas proapoptóticas aunque el mecanismo todavía es causa de controversia existiendo distintos modelos [194].

La tercera clase de la familia Bcl-2, la formada por las denominadas proteínas *BH3-only*, está constituida por las proteínas Bad, Bik, Bid, HrK, Bim, Bmf, NOXA y PuMA. Estas proteínas contienen un dominio que les da nombre, dominio BH3, capaz de unir y regular a las proteínas antiapoptóticas de la familia y conducir a la muerte celular en respuesta a programas de desarrollo o daño intracelular [195]. Se cree que estas proteínas actúan, uniéndose y neutralizando a los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2, para lo cual necesitan el concurso de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak [186, 196]. 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) [197, 198].

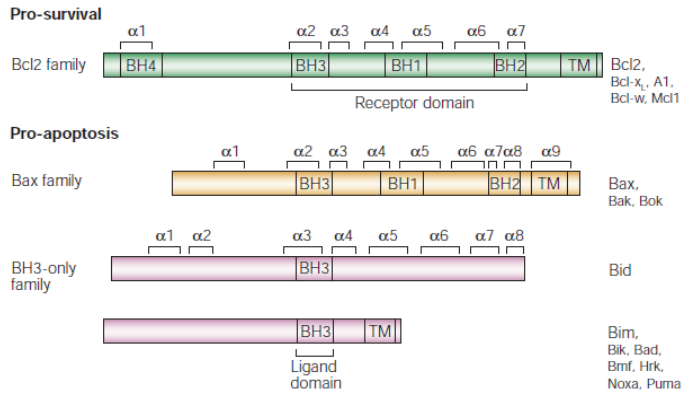


Figura 10.- Subfamilias de proteínas Bcl-2. La mayoría de los miembros tienen un dominio carboxi-terminal hidrofílico que ayuda a la asociación con membranas intracelulares, siendo las excepciones A1 y las proteínas BH3-only. Se han descrito muchos otros homólogos multidominio, pero su función no está todavía clara.

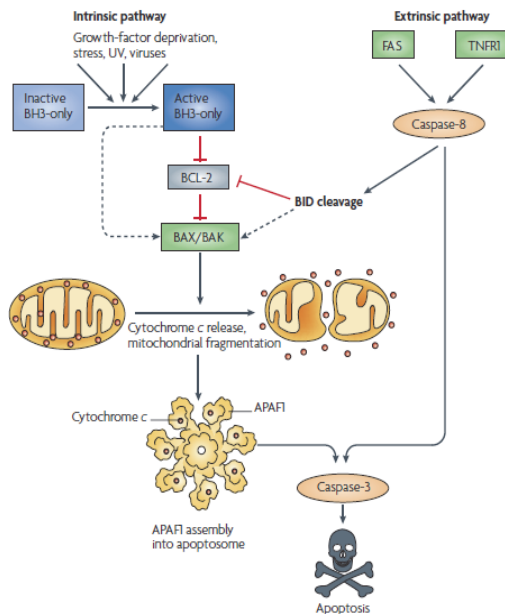


Figura 11.- Esquema de la inducción de la apoptosis intrínseca y extrínseca. La apoptosis puede ser inducida desde receptores de superficie, o por diversos agentes genotóxicos o metabólicos.

2.3.3 Apoptosis en el HCC

El desarrollo y la progresión de tumores hepáticos, tanto HCC como tumores del árbol biliar, ha sido asociado con apoptosis insuficiente. Existen evidencias que indican una disrupción de la apoptosis durante la hepatocarcinogénesis, sobretodo en etapas tempranas como durante la promoción tumoral [199]. Además, existen gran número de estudios, tanto *in vitro* como *in vivo* y con pacientes, analizando la contribución de la inhibición o bloqueo de la apoptosis al desarrollo y progresión del HCC [102]. Está claro, que la inducción de la apoptosis en las células tumorales podría suponer una opción interesante en el tratamiento del HCC.

La expresión de Fas se reduce mucho en el HCC, correlacionándose de forma inversamente proporcional con la diferenciación del tumor [200, 201]. Por el contrario, la sobre-expresión de Fas inducida por p53 es capaz de incrementar la apoptosis cuando células derivadas de HCC son tratadas con diversos agentes quimioterapéuticos [202]. Sin embargo, la reducción de la expresión de Fas no es suficiente por si sola para escapar de la apoptosis y muchos HCC sobre-expresan también proteínas como Bcl-XL lo que les confiere resistencia a la apoptosis por vía intrínseca [203]. Un buen número de moléculas usadas en

quimioterapia (etopóxido, camptotecina, norcantharidina, etc) son capaces de inducir la sobre-expresión de Fas e incrementar la sensibilidad del HCC a la apoptosis [199].

Se ha descrito también que las mutaciones en p53 son frecuentes en algunos HCC. La disfunción de p53 permite a las células tumorales escapar de la apoptosis y favorece la progresión tumoral [199]. Así, muchos agentes quimioterapéuticos inducen apoptosis a través de la activación de p53, mientras que los tumores que no expresan p53 son generalmente resistentes a la quimioterapia y están asociados a peores pronósticos [204]. También, se ha descrito que una reducción en la función de p53 contribuye a la pérdida en la expresión de CD95 y reduce la sensibilidad del HCC a la apoptosis por vía extrínseca [202]. La microinyección con p53 *wild-type* el tratamiento con bleomicina restaura la sensibilidad a la apoptosis inducida por CD95. Sin embargo, en modelos en roedores, la liberación de DNA recombinante de p53 no parece suprimir el crecimiento del HCC [205]. Desgraciadamente, las pruebas clínicas llevadas a cabo con terapia génica basada en p53 no ofrecen todavía datos concluyentes de su eficacia en el tratamiento del HCC [102].

La inhibición de la apoptosis en el HCC también puede estar relacionada con diversas IAP que inhiban la activación de las caspasas. Un importante miembro de la familia IAP, la survivina,

puede jugar un papel importante en la progresión del HCC promoviendo la proliferación de los hepatocitos tumorales, y su expresión está correlacionada de forma directa con la recurrencia del tumor y con un mal pronóstico [206]. Algunos estudios *in vitro*, transfectando células HepG2 con oligonucleótidos antisentido contra survivina muestran una reducción en la proliferación celular; además, el tratamiento sistémico, en modelos en ratón, con dichos oligonucleótidos parece capaz de inhibir el crecimiento de tumores implantados mediante trasplante ortotópico [207].

Se han observado incrementos de los niveles de la proteína c-FLIP que pueden contribuir a la apoptosis inducida por CD95, TRAIL-R1 y TRAIL-R2. Así, la reducción de la expresión de c-FLIP mediante el tratamiento con ciclohexamida y actinomicina D induce una resensibilización a la apoptosis en células tumorales [208]. También, incrementos en la expresión de TRAIL-R1 parecen relacionados con los incrementos de la apoptosis inducidos por el cisplatino en células derivadas de HCC [209]. Además, diversos estudios han mostrado que diferentes agentes como inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), interferón gamma (INF- γ) o un antagonista del receptor mitocondrial de la benzodiazepina denominado PK111195, son capaces de incrementar la sensibilidad del HCC a los agentes quimioterapéuticos y a la radioterapia mediante mecanismos relacionados con una mayor sensibilidad a la apoptosis [210].

Nuevas estrategias basadas en los RNA de interferencia pueden tener utilidad en el tratamiento del HCC por su capacidad para modular la apoptosis en los hepatocitos. Así, el bloqueo mediante RNA de interferencia de la sobre-expresión de la proteína proapoptótica Mcl-1 (miembro de la familia Bcl-2) aumenta la sensibilidad de células derivadas de HCC frente a diversos agentes quimioterapéuticos [211]. Por otro lado, la inhibición, mediante RNA de interferencia, del gen Gli-1 parece inducir apoptosis a través de una reducción en la expresión de Bcl-2 [212]. Para evitar los potenciales efectos negativos de los RNA de interferencia sobre la población de hepatocitos sanos se han desarrollado diferentes estrategias como adenovirus capaces de suministrar de forma específica moléculas de TRAIL o caspasa 8 a las células tumorales [213, 214]. Sin embargo, se han obtenido algunos resultados contradictorios que muestran que la inyección intraarterial de dichos adenovirus, a pesar de su especificidad hacia las células tumorales, no parece totalmente efectiva contra el HCC cuando es administrada en las condiciones estándar en este tipo de tratamientos [215].

2.4 MAPK

La vía MAPK consiste en la activación secuencial de quinasas y funciona como un mecanismo de transducción

intracelular de señales muy conservado a lo largo de la evolución. Hasta la fecha han sido descritas cuatro cascadas dentro de la vía MAPK que son denominadas con el nombre de su enzima clave: ERK (concretamente ERK1 y ERK2), quinasa N-terminal c-Jun 1/2/3 (JNK, existiendo JNK1-3), p38 y ERK5 [216].

Cada cascada consiste en tres clases de serín-treonin quinastas muy conservadas a lo largo de la evolución y que actúan secuencialmente: MAPK, MAPK quinasa (MAPKK) y MAPKK quinasa (MAP3K). MAP3K es generalmente activada a través de fosforilación debido a su interacción con pequeñas proteínas de unión a GTP de la familia Ras/Rho en respuesta a estímulos extracelulares. Cuando MAP3K esta activa se encarga de fosforilar y activar a MAPKK que a su vez fosforila y activa a MAPK [18]. Finalmente, las proteínas MAPK, una vez activas, actúan sobre sus sustratos fosforilándolos en residuos de Serina o Treonina que van a estar seguidos por residuos de prolina, convirtiendo a estos sustratos en quinastas dirigidas de prolina lo que limita su especificidad [217].

Las diversas cascadas incluidas dentro de la familia MAPK permiten transmitir señales extracelulares, y controlar gran número de procesos fisiológicos, incluso opuestos entre sí, como son la proliferación, diferenciación, supervivencia, apoptosis, desarrollo, respuesta al estrés, etc [218]. Además, las funciones de

las MAPK pueden afectar a diferentes organelas subcelulares [216]. La desregulación de MAPK se ha relacionado con diversas patologías como por ejemplo el cáncer o la diabetes [218]. Además de tener un rol importante en la fisiología hepática, se ha descrito que la desregulación de MAPK puede contribuir a la hepatocarcinogénesis [18].

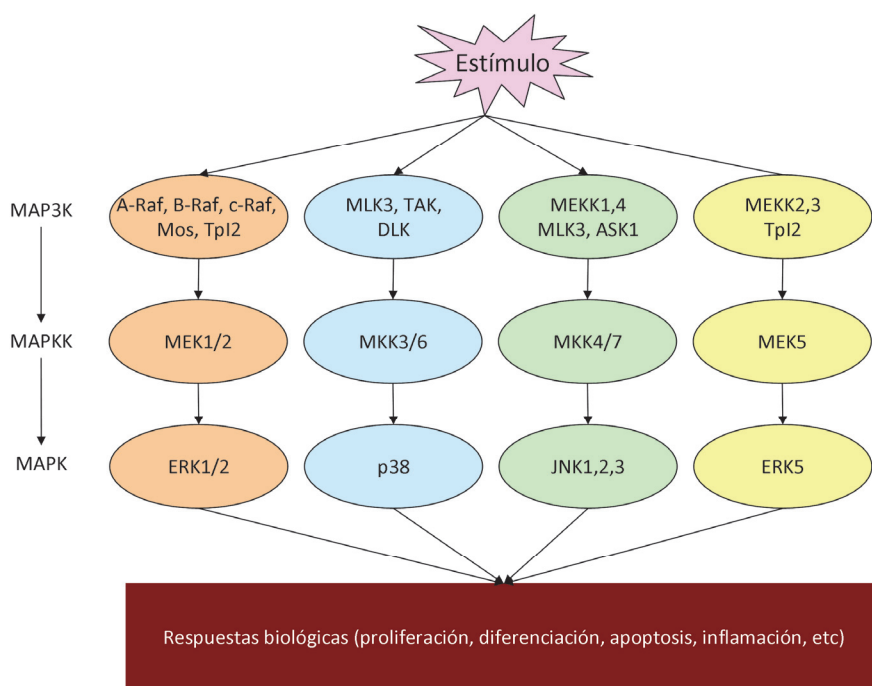


Figura 12.- Cascada de activación de MAPK.

Muchas de las funciones reguladas por MAPK implican la fosforilación de un gran número de sustratos, incluyendo

miembros de una familia de quinasas denominadas proteín-quinadas activadas por MAPK (MAPKAPK) [219, 220]. Esta familia incluye a las quinasas S6 ribosomales p90 (RSK), a las quinasas activadas por estrés y mitógenos (MSK), a las quinasas de interacción con MAPK (MNK), proteín-quinadas 2/3/5 activadas por MAPK (MK2/3/5) [217].

Aparte de las cascadas MAPK que hemos indicado, se han descrito otras moléculas similares a MAPK que han sido denominadas ERK3/4, ERK7/8 y quinasa similar a la proteína Nemo (NLK), pero hasta el momento no está claramente elucidado si son activadas mediante cascadas de fosforilación, por lo que no pueden ser consideradas MAPK genuinas [217, 221].

2.4.1 ERK1/2

ERK1 fue la primera MAPK de mamífero clonada y caracterizada. Fue originalmente descrita por su capacidad para inducir fosforilaciones en respuesta a factores de crecimiento [222-224]. ERK1 y ERK2 tiene una similitud del 83% en su secuencia aminoacídica y son expresadas en prácticamente todos los tejidos, con niveles particularmente altos en cerebro, músculo esquelético, timo y corazón [225].

Entre los factores de crecimiento que son capaces de

activar a ERK1 y ERK2 se incluyen PDGF, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento neural (NGF) y la presencia de insulina [225]. También pueden ser activados por ligandos para receptores ligados a proteínas G heterodiméricas (GPCR), citoquinas, estrés osmótico y desorganización de microtúbulos [226].

La cascada del ERK1/2 consiste en MAP3K (concretamente A-Raf, B-Raf y Raf-1, y adicionalmente en algunos tejidos específicos: MEKK1, Mos y Tp1/2), MAPKK (concretamente MEK1 y MEK2) y MAPK (ERK1 y ERK2) [226, 227].

En células quiescentes todos los componentes de la cascada ERK1/2 están localizados en el citoplasma, pero una vez activados una proporción significativa pasa a acumularse en el núcleo [228, 229]. Tras su estimulación ERK1/2 fosforila a un buen número de sustratos, algunos de ellos localizados en el citoplasma (proteín-quinasa asociada a muerte –DAPK-, complejo 2 de la esclerosis tuberosa –TSC2-, RSK, MNK, etc), en el núcleo (c-Fos, c-Myc, Activador de la transcripción y transductor de señales –STAT3-, factor nuclear activado en células T –NF-AT-, Elk-1, etc), asociados a membranas (CD120a, Syk y calnexina) o al citoesqueleto (neurofilamentos y paxilina) [217].

ERK1/2 parece jugar en muchos casos un papel importante en la proliferación celular. Así, ERK1/2 es rápidamente estimulado por agentes mitogénicos, y es necesario para la progresión de la

fase G₁ a la fase S del ciclo celular en células sanas. ERK1/2 parece controlar la proliferación celular mediante múltiples mecanismos como la inducción de reguladores positivos del ciclo celular [230]. ERK1/2 fosforila y activa a Elk-1 que actúa como factor de transcripción induciendo la expresión de genes tempranos en el ciclo como c-Fos y la estabilización de su proteína [231, 232]. Una vez estabilizada la proteína c-Fos ésta puede asociarse con c-Jun y formar complejos transcripcionalmente activos con el factor de transcripción denominado proteína activadora 1 (AP-1) [233]. AP-1 es necesario para la expresión de la ciclina D1 que formará complejos con CDK permitiendo la transición del ciclo G₁/S [234].

2.4.2 JNK

A esta cascada también se la denomina proteín-quinasa activada por estrés (SAPK). El primer miembro de la familia JNK fue originalmente descrito como una quinasa MAP-2 activada por ciclohexamida y posteriormente fue purificada mediante co-inmunoprecipitación con la proteína c-Jun [235, 236]. Actualmente se conocen tres isoformas de JNK, denominadas JNK1, JNK2 y JNK3 (también conocidas como SAPK γ , SAPK α Y SAPK β respectivamente), con más de 85% de homología e su secuencias [217]. Mientras JNK1 y JNK2 están distribuidas en prácticamente todos los tejidos, la localización de JNK3 es más restringida

(principalmente en neuronas, testículos y cardiomiocitos) [237].

Las diferentes isoformas de JNK son activadas intensamente en respuesta a varios tipos de estrés celular entre los que se incluyen: estrés oxidativo, estrés térmico, radiación ionizante, daño al DNA, citoquinas, radiación ultravioleta (UV), presencia de agentes inhibidores de la síntesis de DNA y proteínas, ausencia de factores de crecimiento, determinados factores de crecimiento, algunos ligandos de GPCR o incluso suero [238]. La activación de las isoformas de JNK requiere la fosforilación dual en residuos de treonina y tirosina por parte de MAPKKs (en este caso MKK4 y MKK7, la primera de ellas también conocida como SEK1 [239]. A su vez, MKK4/7 son fosforiladas y activadas por un buen número de MAP3K (principalmente MEKK1/2/3/4, MLK1/2/3, Tp1/2, DLK, TAO1/2, TAK1 o ASK1/2 [240, 241].

Al igual que ocurre con ERK1/2, una buena proporción de las proteínas JNK activadas pasan al núcleo [242]. Además, el factor de transcripción c-Jun es también un importante sustrato de JNK [243]; por ejemplo, se ha descrito que en algunos casos JNK1/2 es regulador positivo de c-Jun y por ello podrían inducir la proliferación celular [244]. Así, a través de c-Jun JNK1/2 son capaces de promover la formación de complejos con AP-1 e inducir la transcripción de genes relacionados con el control del ciclo celular (como ciclina D1) y de otros genes que contengan el sitio específico para la unión de AP-1 [245]. Adicionalmente, y aunque

existe poca información al respecto, parece que otros factores de transcripción pueden ser fosforilados por JNK como p53, STAT3, c-Myc, JunB, etc [226, 238].

También se ha descrito un papel de JNK en la apoptosis en respuesta a estrés celular [246]. Se ha demostrado que los fibroblastos de embriones aislados de ratones *knockout* $Jnk1^{-/-}/Jnk2^{-/-}$ son resistentes a la apoptosis inducida por daño al DNA y por radiación UV [247]. La inactivación de JNK1 y JNK2 parece inhibir la salida de citocromo C desde la mitocondria, indicando un potencial papel de JNK en la modulación de la vía intrínseca de la apoptosis [217].

2.4.3 p38

El primer miembro de esta cascada, p38 α (también conocido como CSBP o SAPK2), que fue descrito simultáneamente en 1994 por tres grupos de investigación, observándose que tenía un 50% de homología con ERK2 [248-250]. Más tarde, se identificaron tres isoformas adicionales p38 β , p38 γ y p38 δ [251]. Mientras que p38 α y p38 β son expresadas de forma ubicua en la mayoría de las líneas celulares y tejidos, p38 γ y p38 δ se expresan de forma más restrictiva y parecen tener funciones muy específicas[252]. Debido a que p38 α es la isoforma con el nivel de expresión clara y netamente más elevado, en la mayoría de los artículos científicos publicados se usa el término p38 como sinónimo de p38 α [217].

En la mayoría de células de mamíferos estudiadas p38 es intensamente activado por citoquinas inflamatorias (como TNF- α o la interleuquina 1, IL-1), estrés oxidativo, radiación UV, hipoxia o isquemia [251]. Por ejemplo, TNF α e IL-1 son capaces de promover la activación de varias MAP3K implicadas en la activación de p38. Las isoformas de p38 también pueden ser activadas por GPCR y por guanosín-trifosfatasas (GTPasas) miembros de la familia Rho (concretamente Rac y Cdc42) [253, 254]. Las principales MAPKK

responsables de la activación de p38 son MKK3 y MKK6, que a su vez son fosforiladas y activadas por un buen número de MAP3K (principalmente MEKK1/2/3, MLK2/3, Tp1/2, DLK, TAO1/2 y TAK1) [251].

Al igual que ocurre con otras cascadas MAPK, p38 está presente tanto en el núcleo como en el citoplasma de células quiescentes pero se acumula a nivel nuclear en situaciones de estrés [255]. Existe un gran número de sustratos de p38 tanto a nivel citoplasmático (Bax, Tau, MK2/3, MNK1/2, etc) como nuclear (p53, Elk1, GADD153, etc) [251]. p38 parece jugar un papel importante en la respuesta inmune e inflamatoria, siendo activada por numerosos mediadores inflamatorios extracelulares como lipopolisacárido, citoquinas, quimioquinas, etc [251]. Además, p38 puede regular la producción de citoquinas proinflamatorias a través de una modulación del factor de transcripción κ B (NF- κ B) o a nivel de mRNA [256].

En algunos estudios, se ha descrito que p38 pudiera modular la proliferación y la supervivencia celular. Así, p38 α regula negativamente la progresión del ciclo celular (principalmente a nivel de las transiciones G₁/S y G₂/M) mediante diferentes mecanismos como la reducción en la expresión de ciclinas y la sobre-expresión de CKI [257]. Existe aún cierta controversia sobre el efecto de p38 α en la supervivencia celular, habiendo estudios que lo relacionan con funciones pro-supervivencia aunque la

mayoría lo asocian con la apoptosis inducida por estrés celular (a través de vías relacionadas con proteínas de la familia Bcl-2 tanto pro- como antiapoptóticas o incluso a través de receptores de muerte) [258].

Finalmente, cabe destacar que las isoformas de p38 pueden actuar fosforilando y activando a un buen número de proteínas de la familia MAPKAPK (incluyendo a MNK1 o MK2/3/5) [217].

2.4.4 ERK5

ERK5 (también conocido como quinasa 1 MAP grande – BMK1-) tiene el doble de tamaño que el resto de MAPK (aproximadamente 100 kDa), su extremo N-terminal contiene un dominio quinasa con una homología de 51% respecto de ERK2 [259-261]. Se caracteriza por tener un único extremo C-terminal que contiene una señal de localización nuclear y una región rica en prolina, habiendo sido descritas tres isoformas hasta la fecha (ERK5a, ERK5b y ERK5c) [262]. ERK5 se expresa en muchos tejidos, pero aparece en mayores niveles en cerebro, timo y bazo [263].

ERK5 se activa en respuesta a factores de crecimiento, estrés oxidativo, hiperosmolaridad o tras la administración de suero [264]. La principal MAPKK implicada en la activación de ERK5 es MEK5, que a su vez es activada por MAP3K como MEKK2 y MEKK3 [265].

Tal como ocurre con otras MAPK, ERK5 se transloca al núcleo cuando es activada, pero también cuando es co-expresada con MEK5 [264]. Entre los principales sustratos de ERK5 se encuentran c-Myc, conexina, Bad y otras proteínas [264, 266]. Al igual que ocurre con ERK1/2, la activación de ERK5 parece promover la transición del ciclo celular en G₁/S a través de un mecanismo relacionado con el incremento en la expresión de la ciclina D1 [267]. Adicionalmente, parece que ERK5 favorece la entrada del ciclo en la fase S en respuesta a factores de crecimiento [266].

2.4.5 MAPK en el HCC

La gran heterogeneidad genética que exhibe el HCC sugiere que existen múltiples vías moleculares implicadas en la hepatocarcinogénesis y por ello potenciales dianas para su tratamiento [35, 268]. Dada su relación con procesos de proliferación, supervivencia y apoptosis, entre dichas vías moleculares se pueden incluir las cascadas MAPK. Debido a su papel fundamental en diversas funciones celulares, la desregulación de MAPK ha sido implicada en el desarrollo de diversos tipos de tumores, entre ellos el HCC [269]. Así, la activación aberrante de ERK ha sido relacionada con el incremento del tamaño de los tumores en HCC [270, 271]. Además, algunos

autores han descrito incrementos en los niveles expresión y de fosforilación de ERK1/2 en el 91% y 69% de los HCC respectivamente [272]. Otros autores han indicado incrementos en la actividad de ERK1/2 al comparar tejido tumoral de HCC humano con el tejido adyacente no tumoral; dicha actividad se correlacionaba directamente con un incremento en la expresión de la ciclina D1 en el tumor, lo que favorecería su progresión [273].

Como ya hemos puesto de manifiesto, entre los agentes etiológicos responsables del desarrollo del HCC se pueden citar HBV, HCV y otras situaciones en las que puede existir un incremento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 que a su vez pueden activar diferentes MAPK como JNK o p38 [274]. A pesar del papel descrito de las MAPK en la proliferación y supervivencia, a día de hoy todavía existe cierta controversia al haberse publicado efectos de estas quinasas en la inducción de apoptosis bajo determinadas situaciones [274]. Así, por ejemplo se ha descrito que la activación de p38 es capaz de inducir apoptosis en células derivadas de HCC, y que su reducción puede favorecer la resistencia a la apoptosis llevando a un crecimiento incontrolado de las células tumorales [274]. Resultados similares se han descrito utilizando células tumorales no hepáticas; así, se ha descrito que la activación de p38, junto con la supresión de ERK, es capaz de inducir la vía intrínseca de la apoptosis y activar a la caspasa 8 produciendo la muerte de células

derivadas de linfoma y de cáncer de pulmón [275].

Aproximadamente del 50% al 60% de los HCC muestran un incremento de la expresión de JNK1 al compararlos con el tejido adyacente, mientras que no existe dicho incremento en el caso de JNK2 [276-278]. Esos datos parecen indicar que JNK, especialmente JNK1, juega un papel importante en el desarrollo del HCC. Estudios *in vitro* han demostrado que diferentes proteínas presentes en HBV y HCV pueden activar a la vía JNK e incrementar la proliferación celular, indicando su papel en el HCC de origen viral [277, 279-281]. Otros estudios han puesto de manifiesto que hepatocitos *Jnk1^{-/-}* proliferan menos (con reducción en el marcador Ki67) que los *wild-type* tras hepatectomía parcial en ratones. Dicha reducción en la proliferación parece relacionada con un incremento en la expresión del inhibidor del ciclo celular p21, junto con la reducción en la expresión de c-Myc (a su vez regulador negativo de p21) en los hepatocitos *Jnk1^{-/-}*. Sin embargo, los hepatocitos *Jnk2^{-/-}* mostraban una proliferación similar a los *wild-type* [276]. La administración de dietilnitrosamina, molécula comúnmente utilizada para inducir HCC en modelos animales, produce un importante incremento en la activación de JNK, con incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), cuando se bloquea previamente al factor de transcripción NF- κ B [282]. Adicionalmente, JNK1 parece tener un papel importante en la angiogénesis del HCC a través de incrementos en

la expresión de VEGF [276]. Sin embargo, hay algunos estudios que muestran que la deficiencia de JNK simultáneamente en hepatocitos y en células mieloides parece capaz de reducir la inflamación hepática y el desarrollo de HCC tras administración de dietilnitrosamina en ratones *Jnk1^{-/-}/Jnk2^{-/-}* [283]. Está claro que son necesarios más estudios para elucidar claramente el efecto dual que JNK puede tener en la hepatocarcinogénesis.

Por otro lado, en ratones *knockout* para *p38α* se observa un incremento en la acumulación de ROS, con activación de JNK, daño hepático y aumento proliferación celular tras la administración de dietilnitrosamina [284]. Además, el bloqueo específico de *p38α* lleva a un incremento en la liberación de IL-1a en los hepatocitos necróticos que puede inducir a las células de Kupffer a producir diferentes citoquinas como TNF- α , interleuquina 6 (IL-6) o factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), promoviendo la proliferación de hepatocitos (Nakagawa 2012). La activación de *p38* y de NF- κ B, tanto en hepatocitos como en células mieloides (como las células de Kupffer), reduce la expresión de dichas citoquinas tras la administración de DEN, lo que sugiere que un papel protector frente al HCC [282, 284]. Otros estudios, indican que el papel antitumoral de *p38α*, en el HCC avanzado, también podría estar relacionado con la supresión de la proliferación de los hepatocitos malignos, puesto que el bloqueo de *p38α* resulta en la sobreexpresión de JNK/c-Jun [285]. Dichos resultados están en

concordancia con otros que muestran una reducción de la vía p38 al comparar tejidos derivados de HCC humanos con los tejidos adyacentes, observándose que cuanto mayor era la extensión del HCC menor era la expresión de p38 [274].

Finalmente, cabe indicar que al estudiar las complejas interrelaciones entre JNK y p38 recientes estudios han sugerido la posible intervención diversas MAP3Ks en el proceso de hepatocarcinogénesis [18]. Así, parece que la proteína TAK1 podría, a través de la activación de la vía dependiente de NF- κ B, actuar como supresora de tumores en hepatocitos [286, 287]. Además ASK1, otra MAP3K que activa selectivamente a JNK y a p38 respuesta a diversos estímulos, podría jugar un importante papel no sólo en la hepatocarcinogénesis sino también en el tratamiento del HCC, pues puede inducir apoptosis. En este sentido, es necesario indicar que la activación de JNK y la hiperfosforilación de Bim, fenómenos necesarios para la inducción de la apoptosis por vía extrínseca, se ven atenuados en ratones *Ask1^{-/-}*, efecto que se ve acompañado de una menor expresión de p38 [288].

2.5 Melatonina

Como veremos a continuación la melatonina es una molécula natural producida por un gran número de seres vivos y que, por lo tanto, aparece en dichos organismos de forma normal a niveles fisiológicos. Dadas sus múltiples propiedades, en los últimos años esta molécula está siendo objeto de atención por la comunidad científica.

Como ya se ha indicado, en la presente Tesis Doctoral se evaluarán los efectos que la melatonina puede tener sobre la proliferación y la apoptosis de hepatocitos tumorales humanos, aspecto desconocido hasta el inicio de nuestros experimentos.

2.5.1 Estructura y síntesis

La melatonina (N-acetil-5-metóxitriptofano), es una neurohormona de naturaleza indólica, concretamente una indolamina, altamente conservada a lo largo de la evolución. La presencia de la melatonina ha sido descrita en una gran variedad de seres vivos desde bacterias y protozoos, hasta plantas, hongos e invertebrados. En vertebrados y en concreto en mamíferos, la melatonina se sintetizada principalmente en la glándula pineal, o

epíflisis, aunque existen otras fuentes de melatonina como son la retina, la médula ósea, la piel, el tracto gastrointestinal, etc [289].

La molécula de la melatonina posee características tanto hidrofílicas como lipofílicas, pudiendo atravesar fácilmente la mayoría de las barreras biológicas incluyendo la barrera hematoencefálica o la placenta [290-293].

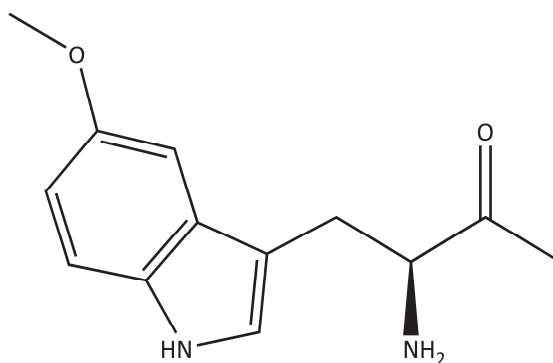


Figura 13.- Estructura de la molécula de la melatonina.

La producción pineal de la melatonina se lleva a cabo a lo largo de determinados momentos del día, en lo que se podría calificar como secreción rítmica, ejerciendo efectos cronobiológicos en el organismo [294, 295]. Sin embargo, la producción extra-pineal de melatonina, incluso en la retina, es muy reducida y su contribución a los niveles sistémicos de hormona poco importante [296].

La síntesis de la melatonina parte del triptófano y es directamente dependiente de la disponibilidad del mismo. Dicha síntesis a nivel fisiológico es un proceso altamente regulado [297].

Así, el triptófano es transformado en serotonina (5 hidroxitriptamina) y posteriormente en N-acetilserotonina en una reacción catalizada por la enzima aril-alquil-amina N-acetiltransferasa (NAT) que constituye uno de los pasos limitantes en la síntesis. Finalmente, la N-acetilserotonina se transforma en melatonina en una reacción catalizada por la enzima hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), que constituye el otro paso clave de la ruta biosintética [298].

La secreción de melatonina viene determinada por los ciclos de luz/oscuridad, información que es captada por la retina y alcanza el núcleo supraquiasmático del hipotálamo a través de los nervios espinalámicos. Así, en humanos y en el resto de especies con actividad diurna, tiene lugar durante la noche, alcanzando los niveles máximos de melatonina entre las 3 y las 4 de la madrugada, mientras que los niveles diurnos son indetectables o muy bajos[289]. En dicho control de la secreción fisiológica de la melatonina parecen actuar diversos factores de transcripción, como principalmente AP-1 y la proteína de unión a elementos de respuesta al AMP cíclico (CREB) [299].

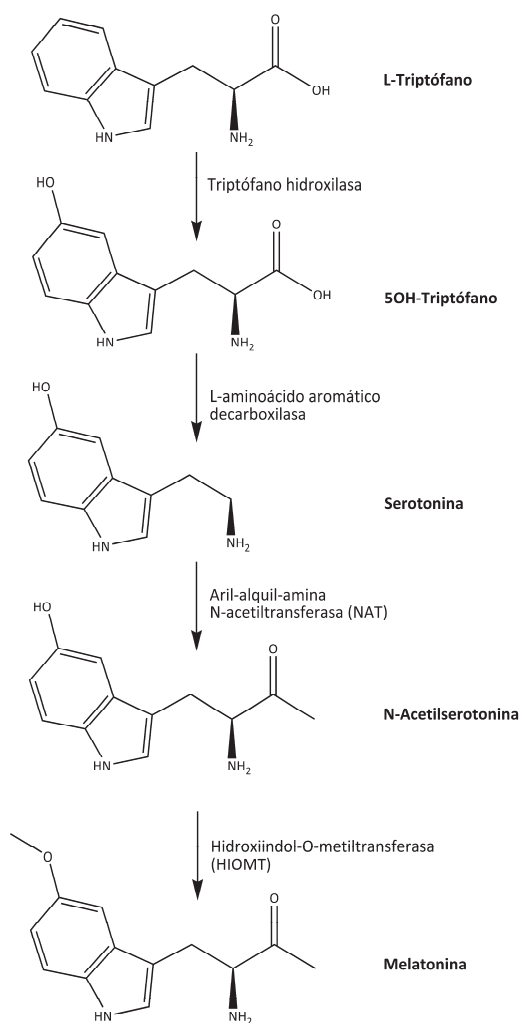


Figura 14.- Síntesis de la melatonina.

No existe un tejido concreto de almacenamiento para esta hormona, por lo que los niveles detectados en plasma son los empleados como reflejo de la actividad de la glándula pineal. La

melatonina se caracteriza por una gran solubilidad tanto en agua como en lípidos, propiedad que facilita el paso través de las membranas celulares de forma directa o a través de receptores, llegando a todos los fluidos, tejidos y compartimentos celulares [289].

La degradación de la melatonina tiene lugar principalmente en el hígado, donde se metaboliza el 90% de la melatonina circulante, siendo excretada en la orina en forma mayoritaria como sulfato y en menor medida en forma de conjugado con glucurónico [300].

2.5.2 Receptores celulares

Los efectos de la melatonina, tanto a nivel fisiológico como farmacológico, parecen depender de procesos tanto dependientes como independientes de sus receptores celulares [301]. Así, se ha descrito la presencia de diversos tipos de receptores, tanto de membrana como citosólicos o nucleares en diferentes especies y tejidos [302].

En cuanto a los receptores de melatonina, existen tres receptores de membrana en vertebrados, aunque solamente dos han sido identificados en humanos, MT1 (o Mel1a) y MT2 (Mel1b).

Éstos, pertenecen a familia de receptores acoplados a proteína G, su unión inducirá cambios en la síntesis de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) que puede iniciar una cascada de señalización intracelular. Estos dos receptores están constituidos por siete dominios transmembrana que comparten una elevada homología en cuanto a sus aminoácidos y difieren en su localización tisular, y en la localización génica dentro de los cromosomas [301]. La proteína G a la que van ligados consta de dos subunidades G_i/G_o y su activación va acoplada a la inhibición de la adenilato ciclasa (lo que induce una reducción en la síntesis de cAMP), así como a la activación de la fosfolipasa C. Tal activación conduce a la formación de diacilglicerol capaz de activar la proteína quinasa C (PKC) que conduce a la fosforilación y activación de la fosfolipasa A2 con la consecuente liberación de ácido araquidónico [303, 304].

Además, la enzima quinona reductasa tipo 2 (NQO2) ha sido identificada como el primer receptor citosólico de la melatonina siendo denominada MT3. Esta enzima pertenece a un grupo de reductasas que participan en la protección celular frente al estrés oxidativo previniendo la transferencia de electrones desde diversas quinonas [305]. Así se han realizado estudios con ratones deficientes en MT3, en los que dichos ratones mostraron una disminución en la unión a ^{125}I , 5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamina, un radioligando específico y análogo de la melatonina [306]. Otros estudios mutacionales y mediante la

utilización de resonancia magnética, plantean la hipótesis de que pese que el indol es capaz de unirse a la quinona, dicha unión no se produce en el centro activo del enzima, por lo que no parece modificar su actividad metabólica [307, 308].

Dada la capacidad de la melatonina para atravesar membranas lipídicas dicha hormona podría interactuar con receptores nucleares, pudiendo mediar a través de los mismos el crecimiento y la diferenciación celular [309]. Dichos receptores presentes en el núcleo forman parte de la superfamilia de receptores para hormonas esteroides y más concretamente a la familia del receptor huérfano relacionado con el ácido retinoico/ receptor Z de retinoides/ (ROR/RZR). A fecha de hoy se han descrito 2 de estos receptores nucleares para la melatonina: el denominado receptor nuclear alfa de la melatonina ($ROR\alpha$) y el receptor nuclear beta de la melatonina ($ROR\beta$). Curiosamente, mientras que $ROR\alpha$ es expresado en gran número de células y tejidos, el receptor $ROR\beta$ ha sido solamente detectado en el cerebro y en la retina [310]. La unión de la melatonina a los receptores ROR hace que éstos se unan a regiones concretas de ciertos genes y promuevan, por este mecanismo la transcripción de genes diana implicados en funciones como la supervivencia, la proliferación y la diferenciación celular [311].

2.5.3 Principales efectos conocidos

En la actualidad existen una pléyade de estudios indicando los muy diversos efectos que la melatonina pudiera tener en diversos procesos tanto fisiológicos como fisiopatológicos. Esta molécula parece ser capaz de afectar a diversas vías de señalización intracelular y proteger a las células sanas frente a distintos tipo de daño [294-296, 300, 312]. A nivel fisiológico, los principales efectos de la melatonina están relacionados con su capacidad para regular la producción hormonal y la regulación de los diversos ritmos circadianos e incluso estacionales en algunos animales [294].

Entre los diversos efectos de la melatonina se encuentra su capacidad para actuar como antioxidante, neutralizando a los ROS producidos durante el metabolismo normal de la célula. El ROS más abundante formado durante el metabolismo celular es el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Dicho radical es capaz de formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de la reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). El peróxido de hidrógeno en presencia de metales de transición por medio de la reacción de Fenton, se convierte a radical hidroxilo ($\cdot OH$) [313, 314]. El radical hidroxilo es el ROS más dañino producido por las células, siendo capaz de reaccionar con cualquier molécula de la célula, destruyéndola [314]. La melatonina es capaz de neutralizar

directamente a los principales ROS y con ello inhibir la peroxidación lipídica. Además es capaz de estimular distintas enzimas antioxidantes como son la SOD, la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa y la catalasa (CAT). Así, aumenta los niveles de glutatión intracelulares estimulando la γ -glutamylcisteina sintetasa. Junto con estas enzimas es capaz de inducir la glutatión reductasa, GPx, glucosa 6-fosfato deshidrogenada, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD o CAT, disminuyendo las enzimas prooxidantes como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la lipooxigenasa, lo que reduce además la formación de aductos en el DNA, siendo por todos estos efectos una molécula considerada antiapoptótica en células normales [315, 316].

Por otro lado, se ha descrito que la melatonina, junto con sus efectos antioxidantes en las células, presenta efectos inmunomoduladores. De esta forma parece ser capaz de inducir la estimulación de las células T, células B, *Natural Killer* o monocitos, aumentando la proliferación de los timocitos e incluso, en determinadas circunstancias, incrementando la liberación de citoquinas [300].

También están claros los efectos anti-inflamatorios que la administración de melatonina tiene en diversas situaciones. Dichos efectos parecen relacionados con la regulación de diversas vías moleculares. Así, parece capaz de inhibir la expresión de la iNOS y

de la COX-2, limitando la producción de óxido nítrico (NO), prostanoïdes y leucotrienos, además de otros mediadores inflamatorios como citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión. La melatonina parece capaz de modular a diversos factores de transcripción como NF- κ B, el factor inducible por hipoxia (HIF) o el factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Erf2) [312].

Se ha demostrado que la melatonina tiene actividad oncostática tanto *in vivo* como *in vitro* en distintos tipos de tumores, siendo estas acciones mediadas por su influencia en el sistema neuroendocrino y sus propiedades inmunoestimuladoras, incluyendo también un efecto directo sobre la proliferación de las células neoplásicas [302, 317-324]. Muchos de los datos que existen sobre la acción oncostática de la melatonina se derivan de estudios en cáncer de mama, donde la melatonina en concentraciones fisiológicas tiene efectos inhibitorios sobre el crecimiento de células en cultivo *in vitro*, debido a la inducción a través de la melatonina una parada del ciclo celular en la fase G₂, debido a la inhibición de la síntesis de DNA [325, 326].

Aparte de los datos existentes en células de cáncer de mama en cultivo, existen distintas investigaciones realizadas con otras células que también describen un efecto oncostático de la melatonina, siendo ejercido el efecto de la melatonina a través de

la regulación de los receptores esteroideos, a través de la señalización Ca^{2+} -calmodulina o de la activación de los receptores de membrana o de la supresión de la captación de ácidos grasos mediado por la activación de los receptores de membrana [327, 328]. Sin embargo, hasta el inicio de nuestro trabajo no se conocía el efecto directo que la melatonina podría tener sobre la proliferación y la apoptosis en el HCC, ni cuáles eran los mecanismos implicados en dichos efectos.

3. - MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Ámbito y financiación del trabajo. Consideraciones legales y éticas.

Este trabajo de experimentación se ha desarrollado en su totalidad en las instalaciones del Instituto Universitario de Biomedicina (IBIOMED) de la Universidad de León.

Para la realización del trabajo se ha recibido financiación de la *Fundación Investigación Sanitaria de León* y de la *Junta de Castilla y León* (Ref LE117A11-2).

La presente investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Universidad de León, respetándose los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los Derechos Humanos y la Biomedicina, en la Declaración Universal de la UNESCO sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos [329-332]. Además, se cumplió con los requisitos establecidos en la Ley 14/2007, de julio, de Investigación Biomédica [333]. Todos los experimentos realizados se ejecutaron siguiendo las pautas recogidas en la normativa internacional GLP (Good Laboratory Practices [334]).

3.2 Cultivo celular

Para la realización del estudio se ha utilizado la línea celular HepG2, derivada de hepatocarcinoma humano. Dicha línea celular fue adquirida a la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, Virginia, EE.UU.).

De forma rutinaria las células se crecieron 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 4mM (Life Technologies) y piruvato sódico 100µg/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.), renovando el medio cada 48 horas. Además, las células eran pasadas al alcanzar la máxima confluencia, aproximadamente una vez cada diez días, utilizando un volumen final de cultivo de 10 mL.

Para el procedimiento de pase de las células se utilizó el procedimiento de tripsinización. Mediante este método, tras la eliminación del medio de cultivo, por aspiración, y la eliminación

de remanentes del mismo mediante el lavado con tampón fosfato salino (Phosphate Buffer Saline, PBS, Life Technologies), se añadió tripsina (Life Technologies) a las células. Tras 5 minutos de incubación 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, proceder a su conteo. Tras el proceso, las células eran diluidas con medio de cultivo y sembradas en flasks T75 a razón de dos millones de células por flask.

3.3 Diseño experimental

Una vez que las células HepG2 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 hasta alcanzar una confluencia del 95%, momento en el que se procedía al tratamiento de las células a las concentraciones y tiempos indicados para cada experimento. La melatonina y otros reactivos se obtuvieron de Sigma (St Louis, Missouri, EE.UU.) a menos que se indique lo contrario en el texto.

3.3.1 Grupos experimentales

Para llevar a cabo el estudio sobre los efectos de la melatonina a distintas concentraciones y tiempos de administración sobre células de HCC humano, las células HepG2 fueron sembradas en las condiciones ya indicadas en el capítulo sobre cultivo celular. Transcurridas 24 horas las células eran tratadas con melatonina a diversos periodos de tiempo dependiendo del experimento (0, 2, 4, 6, 8 y 10 días).

La melatonina empleada para los tratamientos fue disuelta previamente en dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,2% para preparar seguidamente una solución madre de melatonina 10000 μM a partir de la cual se realizaron diluciones con medio de cultivo, hasta las concentraciones utilizadas que se indican en los diversos experimentos.

Como control se utilizó un grupo, con medio sin melatonina, que se mantuvo en las mismas condiciones y tiempos que el resto de los grupos tratados.

Además, se añadió un grupo tratado con vehículo, que consistía en medio de cultivo con DMSO al 0,2% para estudiar los posibles efectos de dicha sustancia en nuestras condiciones experimentales.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1. Viabilidad celular mediante el ensayo de MTT

Fundamento

La reducción de sales de tetrazolio es ampliamente aceptada como un modo fiable de medir la proliferación celular. El compuesto denominado MTT (químicamente 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 un compuesto coloreado denominado formazán púrpura. El número de células vivas será directamente proporcional a la cantidad de formazán sintetizado. Dicho compuesto puede ser solubilizado y fácilmente cuantificado por métodos espectrofotométricos [335].

Procedimiento

Transcurridas 24 horas tras la siembra de alícuotas de 15.000 células en placas de 24 pocillos (BD Biosciences), se

procedió al inicio del tratamiento con la melatonina. En este experimento se analizaron los efectos de la melatonina a concentraciones de 0 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM , 1000 μM , 2500 μM , 5000 μM y 10000 μM , cuando era administrada en periodos de tiempo de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 días.

Tras la incubación a los diversos con el indol, se procedió a cambiar el medio de las células por medio sin suero y a añadir 100 μL de una solución conteniendo 5 mg/mL de MTT (Sigma –Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.). Al cabo de tres horas en el incubador, se retiró el medio y se disolvieron las sales de formazán utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich). Tras ello se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm. (Synergy HT, Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, EE.UU.).

3.4.2. Viabilidad celular mediante la liberación de lactato deshidrogenasa al medio de cultivo

Fundamento

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática que se encuentra en la mayoría de las células (incluyendo los hepatocitos) encargándose en la transformación de lactato en piruvato durante el metabolismo celular. La liberación de dicha enzima citoplasmática al medio de cultivo, debido a la

pérdida de la integridad celular, se utiliza usualmente para método complementario para la cuantificación de la viabilidad celular. Existen diversos métodos para la determinación de la cantidad de LDH al medio de cultivo, la mayoría se basa en la capacidad de la enzima LDH para transformar NAD a su forma reducida NADH debido a la oxidación de lactato en piruvato. A continuación, una reacción acoplada catalizada por la enzima diaforasa, utilizando el NADH recién formado, catalizará la transformación de una sal de tetrazolio en formazán rojo cuya absorbancia puede ser detectada espectrofotométricamente en longitudes de onda comprendidas entre 490 y 520 nm. La cantidad de formazán rojo producido será proporcional a la cantidad de LDH liberado al medio de cultivo por la ruptura celular [336].

Procedimiento

Para este análisis se utilizó un kit comercial denominado *In Vitro Toxicology Assay kit Lactic Dehydrogenase Based* (Sigma, St Louis, Missouri, EE.UU.).

Al igual que en el ensayo del MTT, Transcurridas 24 horas tras la siembra de las células HepG2 en placas de 24 pocillos (BD Biosciences), a razón de 15000 células por pocillo, se procedió al inicio del tratamiento con la melatonina. En este experimento se analizaron los efectos de la melatonina a concentraciones de 0 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM , 1000 μM , 2500 μM , 5000 μM y 10000

μM , cuando era administrada en periodos de tiempo de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 días.

Trascurridos los diversos tiempos de tratamiento, se procedió a la aspiración del medio de cultivo y su análisis según lo indicado por el fabricante del kit. Básicamente, tras la aspiración del medio alícuotas de 5 μL fueron transferidas a una placa de 96 pocillos e incubadas con 10 μL del sustrato comercial de la reacción, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a parar la reacción mediante la adición de 1,5 μL de HCl. Finalmente, se procedió a la cuantificación de la absorbancia a 490 nm utilizando un lector de placas (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, EE.UU.).

3.4.3 Ciclo Celular mediante citometría de flujo

Fundamento

La citometría de flujo, o FACS (del inglés *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) es una metodología que se basa en que células o partículas en suspensión atraviesen una fuente de luz (generalmente un láser), recogándose los datos de la fluorescencia o la luz reflejada lo que permite obtener información sobre sus características físicas y/o químicas. Se trata de una técnica que

permite examinar un gran número de células en un breve espacio de tiempo. La cuantificación de las fases del ciclo celular por citometría de flujo o FACS, se basa en la utilización de un fluoróforo capaz de unirse de forma no covalente al DNA de las células, siendo este el yoduro de propidio. Una vez en el interior celular, el yoduro de propidio es excitado por un laser a una determinada longitud de onda emitiendo fluorescencia proporcional a la cantidad de DNA de la célula [337].

Procedimiento

Trascurridas 24 horas tras la siembra de 200000 células por flask T25 (25 cm²)(BD Biosciences), se dio inicio al tratamiento con la melatonina, a tiempos de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 días, con la dosis de 1000 µM, la dosis más baja con la que se había observado un descenso significativo en la viabilidad celular. Finalizados los tratamientos, se llevo a cabo la tripsinización y recogida de las células. A continuación, se centrifugaron dichas células durante 5 min a 1500 rpm, procediéndose a la aspiración del sobrenadante y al lavado y posterior resuspensión en 500 µL de PBS frío (Life Technologies). La fijación de las células se realizó con etanol al 70% (Merck, Whitehouse Station, New Jersey, EE.UU.) en PBS durante 2 horas 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 se resuspendieron en 1 mL de solución de Ioduro de Propidio con RNAasa (BD Biosciences) y se incubaron 15 min a temperatura ambiente para permitir la acción de la RNAasa. 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 se establecieron los siguientes plots:

- FSC – SSC (Tamaño relativo – complejidad interna).
- FL2A (Medición del área de la señal de fluorescencia 564-604 nm, del ioduro de propidio).
- FL2H (intensidad de la fluorescencia del ioduro de propidio, medida como altura de la señal).
- FL2A – FL2W (área de la señal de la fluorescencia del ioduro de propidio – anchura de la señal de dicha fluorescencia).

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

3.4.4 Preparación de homogeneizados totales

Fundamento

Se denomina homogeneizado total o fresco al obtenido tras proceder a la lisis celular utilizando un tampón que sea capaz de romper las membranas celulares, obteniendo de esta forma el total de las proteínas celulares. Para ello las células son tratadas con un tampón, conteniendo diversas sales y detergentes, cuya concentración tenga la suficiente capacidad iónica para producir la lisis de las membranas. En el presente procedimiento se utiliza un buffer conteniendo, entre otros elementos, cloruro sódico, detergente NP-40 y varios inhibidores de proteasas para así evitar la degradación de las proteínas presentes en las muestras [338].

Procedimiento

En todos los casos en los que fue necesaria la preparación de homogeneizados totales, 24 tras la siembra de las células éstas eran tratadas con melatonina a los diversos tiempos y concentraciones indicados en cada experimento. Tras los tiempos de incubación, las células eran lavadas dos veces con PBS frío, añadiéndose posteriormente 100 µL de tampón IPB7 (conteniendo Trietanolamina 20 mM, cloruro sódico 0,7 M y detergente NP-40 0,5% y deoxicolato sódico 0,2%, todos ellos de la casa comercial Sigma Aldrich), dicho tampón era suplementado con inhibidores

para las diversas proteasas: fluoruro de sodio 1 mM, aproptinina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, leupeptina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF), ortovanadato sódico 1 mM, inhibidor de tripsina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y pepstatina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (también todos ellos de Sigma Aldrich). Posteriormente, las células eran despegadas de las placas o flasks mediante raspaje, siendo recogidas en crioviales que fueron inmediatamente sumergidos en nitrógeno líquido. Tras este proceso fueron almacenadas a -20°C para su posterior procesamiento. Tras descongelarse, las muestras eran agitadas en un vortex y se centrifugadas durante 20 minutos a 14000 rpm y 4°C de temperatura recogiendo a continuación el sobrenadante. Dicho sobrenadante era posteriormente inmediatamente utilizadas para su análisis o congeladas a -80°C .

3.4.5 Fraccionamiento subcelular

Fundamento

La combinación de tampones con suficiente fuerza iónica y de sucesivas centrifugaciones permite el fraccionamiento subcelular para la obtención de la fracción citosólica, y mitocondrial. En el presente procedimiento se utiliza un buffer conteniendo, entre otros elementos sacarosa y varios inhibidores

de proteasas para así evitar la degradación de las proteínas presentes en las muestras [339].

Procedimiento

En todos los casos en los que fue necesaria la preparación de homogeneizados totales, 24 tras la siembra de las células éstas eran tratadas con melatonina a los diversos tiempos y concentraciones indicados en cada experimento. Tras los tiempos de incubación, las células eran lavadas dos veces con PBS frío, añadiéndose posteriormente 5 mL de tampón de homogeneización a pH 7,3 conteniendo sacarosa 320 mM, ácido 2-[4-(2-hidroxi-1-piperacilil-(1))] etanosulfónico-KOH (HEPES-KOH) 50 mM, Ácido etilén diamino tetraacético (EDTA) 1 mM y ditioneitol (DTT) 1 mM, todos ellos de la casa comercial Sigma Aldrich); dicho tampón era suplementado con inhibidores para las diversas proteasas: fluoruro de sodio 1 mM, aproptinina 1 µg/mL, leupeptina 1µg/mL, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF), ortovanadato sódico 1 mM, inhibidor de tripsina 100 µg/mL y pepstatina 1µg/mL (también todos ellos de Sigma Aldrich). Posteriormente, las células eran despegadas de las placas o flasks mediante raspaje, siendo recogidas en tubos y homogeneizadas en hielo con un homogeneizador manual Dounce. El homogeneizado obtenido fue posteriormente centrifugado durante 10 minutos a 1000 xg y 4°C de temperatura recogándose a continuación el sobrenadante.

Dicho sobrenadante fue de nuevo centrifugado, durante 10 minutos a 7500 xg y 4°C de temperatura, para la obtención de la fracción mitocondrial. A continuación, el sobrenadante obtenido fue de nuevo centrifugado, durante 30 minutos a 10000 xg y 4°C para la obtención de la fracción citosólica. Todas las fracciones fueron inmediatamente utilizadas para su análisis o congeladas a -80°C .

3.4.6 Determinación de la concentración de proteínas

Fundamento

La cuantificación de la concentración de proteínas es un proceso previo a la realización de otras analíticas como la determinación de la expresión proteica. Existen diversos métodos para dicha cuantificación; en nuestro caso se llevó a cabo utilizando el método de Bradford. Este método se basa en la utilización de azul de Coomassie, molécula capaz de unirse específicamente a los residuos de lisina de las proteínas. Dicha unión puede monitorizarse mediante técnicas espectrofotométricas fácilmente [340].

Procedimiento

Tras la preparación de los homogeneizados totales provenientes de las diversas muestras a analizar, alícuotas de éstas fueron incubadas durante 10 minutos con el reactivo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, California, EE.UU.) a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Posteriormente, se procedió a la lectura de la absorbancia en un lector de microplacas Synerty (Bio-Tek Instruments) a una longitud de onda de 595 nm.

Para facilitar la cuantificación de la concentración de proteínas de nuestras muestras, se preparó un curva patrón utilizando albúmina sérica bovina (fracción V, Sigma-Aldrich) a concentraciones conocidas. Dichos patrones fueron analizados en las mismas condiciones que las muestras tras su incubación con el reactivo de Bradford.

3.4.7 Actividad de las caspasas 3, -8 y -9

Fundamento

Las actividades de caspasas se determinaron utilizando técnicas fluorimétricas según el método de Hasegawa et al

modificado. Básicamente, el ensayo se basa en el procesamiento de sustratos, específicos para cada caspasa, que generarán productos fluorescentes que pueden ser fácilmente detectados en un espectrofluorímetro. La fluorescencia obtenida en cada ensayo será directamente proporcional a la actividad de la caspasa analizada [341].

Procedimiento

Trascurridas 24 horas tras la siembra de 200000 células por flask T25 (25 cm²)(BD Biosciences), se dio inicio al tratamiento con la melatonina, a tiempos de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 días, con la dosis de 1000 µM, la dosis más baja con la que se había observado un descenso significativo en la viabilidad celular. Finalizados los tratamientos, se llevo a cabo la tripsinización y recogida de las células. A continuación, se obtuvieron los homogeneizados totales como previamente se ha indicado.

El análisis de la actividad de cada caspasa se realizó de forma individual. Para ello, tras la obtención de los homogeneizados totales, éstos se incubaron durante una hora a una temperatura 37°C, con un tampón de pH 7,5 conteniendo HEPES, 20 mM, glicerol 10% y DTT 2 mM (todos ellos de la casa Sigma Aldrich) y el correspondiente sustrato fluorigénico específico para caspasa a analizar. Los sustratos específicos para cada caspasa

fueron adquiridos a la firma comercial Alexis Biochemicals (San Diego, California, EE.UU.), siendo los siguientes:

- Sustrato específico para la caspasa 3: 100 μ M de 7-amino 4-metilcumarina N-acetil-L-aspartil-L-glutamil-L-valil-L-aspartico amida (Ac-DEV-AMC).
- Sustrato específico para la caspasa 8: 100 μ M de 7-amino 4-trifluorometilcumarina N-acetil-L-isoleucil-L-glutamil-L-treonil-L-aspartico amida (Ac-IETD-AFC).
- Sustrato específico para la caspasa 9: 100 μ M de 7-amino 4-metilcumarina N-acetil-L-leucil-L-glutamil-L-histidil-L-aspartico amida (Ac-LEHD-AMC).

Tras la incubación el procesamiento de cada sustrato fluorogénico se monitorizó por medio de un lector de microplacas (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Inc.) a las siguientes longitudes de onda:

- Sustrato específico para la caspasa 3: longitud de onda excitación 360 nm, longitud de onda de emisión 460 nm.
- Sustrato específico para la caspasa 8: longitud de onda excitación 360 nm, longitud de onda de emisión 460 nm.

- Sustrato específico para la caspasa 9: longitud de onda excitación 360 nm, longitud de onda de emisión 460 nm.

Finalmente, la actividad de cada caspasa se expresó en forma de unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) por miligramo de proteína y minuto de incubación (UAF/mg prot/min).

3.4.8 Western Blot

Fundamento

Para los estudios de expresión de proteínas se utilizó la técnica de Western blot o inmunoblotting utilizando el método de Laemmli modificado [342]. En esta técnica se utilizan anticuerpos para detectar el antígeno o los antígenos específicos de interés. La especificidad de la unión antígeno–anticuerpo permite la detección de una única proteína dentro de una mezcla compleja de otras proteínas.

Se procede inicialmente a la separación de las proteínas contenidas en una muestra mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Posteriormente, las proteínas ya separadas en función de su diferente peso molecular se transfieren a una segunda matriz (Blotting o Transferencia), generalmente una

membrana de nitrocelulosa o de floruro de polivinideno (PVDF). A continuación, se bloquea la membrana para evitar la unión inespecífica a su superficie de los anticuerpos que se van a utilizar para la detección de la proteína de interés (Bloqueo). En el siguiente paso, se une la proteína transferida de interés un anticuerpo específico marcado, o a un anticuerpo específico (primario) al que posteriormente se añade otro anticuerpo marcado (secundario) capaz de unirse específicamente al primario. Finalmente, se procede a la detección de la señal producida por el marcaje, para lo que puede ser necesario la adición de un sustrato apropiado. En la actualidad, los métodos más sensibles emplean sustratos quimioluminiscentes que cuando se combinan con la enzima correspondiente, producen luz como producto final, que puede detectarse mediante autorradiografía en película o con una cámara de alta resolución. La intensidad de la señal se correlaciona con la cantidad del antígeno en la superficie de la membrana.

Es necesario destacar que no sólo debemos analizar en nuestras muestras la presencia/cantidad de la proteína que nos interesa estudiar; debemos analizar también la presencia/cantidad de alguna proteína producto de un gen de referencia o “*housekeeping*” cuya expresión sepamos sea lo menos variable posible entre nuestras muestras para utilizarlo como referencia para la estandarización y posterior cuantificación (β -actina, GADPH, etc).

Procedimiento

Tras la obtención de los homogeneizados totales provenientes de los experimentos con las células, se procedió a la determinación de la concentración de proteínas mediante el método de Bradford tal como se ha indicado anteriormente. Según la proteína cuya expresión quisiera determinarse se utilizó una concentración de proteína total igual en todas las muestras a analizar (normalmente comprendida entre 10-100 μg). En todos los casos se completó el volumen con agua milliQ hasta 75 μL y con 25 μL adicionales de tampón de carga a pH 6,8 (sacarosa 0,27 M, dodecil sulfato sódico SDS 0,27 M, β -mercaptoetanol 2,8 M, azul de bromofenol 1,4 mM y Tris-HCl 0,5 M, todos ellos de Sigma Aldrich), procediéndose a incubación durante 3 minutos a 100°C antes de la realización de la electroforesis.

1). Electroforesis

A continuación, en cubetas Mini Protean (Bio-Rad), se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). El gel utilizado era de tipo discontinuo, esto es, con 2 zonas diferenciadas: *Stacking* (en la parte superior, donde las muestras se concentran mediante isotacoforésis) y *Running* (en la zona inferior, donde se produce la separación efectiva de las diversas proteínas presentes en la muestra a analizar).

La preparación y colocación de los geles en el sistema Mini Protean fue el siguiente:

- *Gel Running*: los geles preparados se realizaron a concentraciones entre 8 y 12% de poliacrilamida. Para la preparación de dichos geles se utilizó:
 - 1,6-2,4 ml de mezcla de acrilamida/bis-acrilamida 29:1 (Bio-Rad).
 - 2-2,8 ml de H₂O milliQ.
 - 1,5 ml de tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 (Sigma-Aldrich).
 - 60 µL de SDS al 10% (Bio-Rad).
 - 30 µL de persulfato de amonio (APS) al 10% (Bio-Rad).
 - 3 µl de Tetrametiletilendiamida (TEMED) (Bio-Rad).

Tras la preparación y mezcla de los componentes del gel *Running*, éste se dispuso entre los cristales del sistema Mini Protean con objeto de su polimerización ocupando aproximadamente el 75-80% de la altura del espacio.

- Gel *Stacking*: este gel, de naturaleza concentradora, de preparó con un porcentaje de poliacrilamida del 4%. Para su preparación se utilizó:
 - 0,4 ml de mezcla acrilamida/bis acrilamida (Bio-Rad).
 - 2 ml de H₂O milliQ.
 - 3,3 ml de tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 (Sigma-Aldrich).
 - 33,3 µL de SDS al 10% (Bio-Rad).
 - 16,7 µL de APS al 10% (Bio-Rad).
 - 3,3 µl de TEMED (Bio-Rad).

Una vez preparada la mezcla se introdujo en los cristales, encima del gel *Running* y ocupando aproximadamente el 20% de la altura. Posteriormente, se introdujo un peine para formar los pocillos de carga dónde se iban a introducir las muestras a separar.

II) Transferencia y bloqueo

Tras la separación mediante electroforesis de las diversas proteínas incluidas en cada muestra, éstas fueron transferidas a

una membrana de PVDF (Bio-Rad) donde quedarían fijadas para permitir su exposición a los anticuerpos específicos. Para dicha transferencia, una vez extraído el gel de los cristales del sistema Mini Protean se equilibró en un tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 0,2 M, y metanol 20%, todos de Sigma-Aldrich). La transferencia se realizó mediante el denominado método de electroelución húmeda, a 100 V durante 100 minutos.

Para evitar los sitios de unión de la membrana sin reaccionar con el antígeno, reduciendo así la unión inespecífica de las proteínas durante los siguientes pasos, se procedió al bloqueo. Para ello, se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos en una solución de bloqueo consistente en 2,5% de 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 todos ellos de Sigma Aldrich, y detergente Tween-20 al 0,05% de Bio-Rad).

III) Incubación con el anticuerpo primario y secundario

En nuestros análisis mediante Western blot utilizamos el denominado sistema indirecto de incubación. Así, se incuba la membrana primero con un anticuerpo específico no marcado (anticuerpo primario) al que posteriormente se añade otro anticuerpo marcado (anticuerpo secundario) capaz de unirse específicamente al primario. Entre sus ventajas destacamos el incremento de la sensibilidad (cada primario contiene numerosos epítomos a los que puede unirse el secundario marcado, lo que

permite la amplificación de la señal), inmunoreactividad del primario intacta (pues no se marca), o la gran variedad de secundarios marcados que pueden usarse con un primario con el consiguiente ahorro económico.

Así tras el bloqueo de la membrana ésta era incubada durante una noche con el anticuerpo específico contra la proteína de interés (anticuerpo primario), disuelto en leche preparada en PBS-Tween. Transcurrido ese tiempo se lavó la membrana varias veces durante 1 hora (seis lavados de 10 minutos) con PBS-Tween. Posteriormente, se incubó durante 60 minutos con el anticuerpo secundario de elección, generalmente un anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo o de ratón unido a peroxidasa de rábano picante (HRP), (Dako, Glostrup, Dinamarca). Más tarde, se procedió a lavar durante 1 hora con PBS-Tween (seis lavados de 10 minutos).

IV) Detección de las proteínas

La detección de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia utilizando el reactivo comercial de quimioluminiscencia incrementada ECL (Santa Cruz Biotechnology, California, EE.UU.) exponiendo la membrana durante 1 minuto a la mezcla reactiva comercial.

Posteriormente se realizó una autorradiografía, para ello se introdujo la membrana en una cassette hermética junto con una

película (Fujifilm Super RX, Tokyo, Japon), durante tiempos variables según la proteína a determinar (20 segundos – 30 minutos). A continuación, se procedió al revelado, fijado y secado de la película para su posterior cuantificación.

Finalmente, la cuantificación de las bandas se realizó por densitometría utilizando el programa Scion Image 4.02 (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EE.UU.).

V) Deshibridación y detección de *housekeeping*

En todos los Western blot, con objeto de verificar una carga idéntica en todas las muestras analizadas de la misma concentración total de proteínas, las membranas fueron deshibridadas y analizándose la expresión proteica de algún gen de referencia o *housekeeping*. Para ello, las membrana se lavaron en tampón de deshibridación a pH2,2 (glicina 0,2 M, 3 mM SDS, 1% Tween-20, de Sigma-Aldrich) durante 10 minutos. Posteriormente, se lavaron dos veces durante 10 min en PBS, y finalmente otras dos veces durante 5 minutos en PBS-Tween. A continuación se bloquearon durante 1 hora en leche al 2,5% disuelta en PBS-T para posteriormente, también mediante el método indirecto de hibridación, analizar la expresión del gen de referencia o *housekeeping* actina (42kDa) (Sigma-Aldrich).

3.4.9 Extracción y cuantificación del RNA total

Fundamento

La clave de la purificación de RNA radica en evitar su degradación por acción de las ribonucleasas. Por ello, la mayoría de los protocolos existentes se basan en la rápida inactivación de dichas enzimas. En nuestro caso se utilizó una modificación del denominado método del paso único (*single-step method*) desarrollado por Chomczynski y Sacchi, que permite la purificación de RNA total, DNA y proteínas mediante centrifugación en diversos solventes [343].

Procedimiento

El aislamiento de RNA se realizó utilizando TRI Reagent (Ambion, Life Technologies) que utiliza fenol y tiocianato de guanidina para inhibir rápidamente la actividad RNAasa. Homogenar una muestra en TRI Reagent junto con la adición de cloroformo permite la separación mediante centrifugación del RNA, DNA y las proteínas en tres fases, acuosa, interfase y fase orgánica respectivamente. La utilización a continuación de isopropanol y finalmente etanol permite la precipitación y el lavado del RNA para ser posteriormente solubilizado.

Así, tras la tripsinización de las células éstas fueron sembradas a razón de 150.000 células en placas de 6 pocillos (BD Biosciences). 24 horas después se comenzó el tratamiento de las mismas. Transcurrido el tiempo de tratamiento se aspiró el medio y se añadió a cada pocillo 1 mL de TRI Reagent (Ambion, Life Technologies, Paisley, Reino Unido) en el que se homogeneizaron y lisaron las células, siendo trasvasados los elementos resultantes a tubos de 2 mL de capacidad. TRI Reagent se basa en la utilización de fenol y tiocianato de guanidina (con objeto de inhibir rápidamente a las RNAsas).

Transcurridos 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, permitiendo así la distrupción de los complejos de nucleoproteínas, se añadió a cada tubo 200 μ L de cloroformo (Sigma-Aldrich). 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. El cloroformo facilita la separación de RNA, DNA y proteínas por centrifugación (fases acuosa, interfase y fase orgánica respectivamente). Finalizada la centrifugación se procedió a recoger la fase acuosa superior a un tubo nuevo, donde se encontraba el RNA.

A continuación se añadieron 500 μ L de isopropanol (Sigma-Aldrich), se agitaron durante 10 segundos, se incubaron a temperatura ambiente 10 min, y se centrifugó cada tubo a 12000

xg durante 8 min a 4°C, obteniendo el pellet de RNA y eliminando el sobrenadante. Obtenido el precipitado de RNA, se lavó el mismo con 1 mL de etanol al 75% (Merck). De nuevo se volvió a centrifugar a 7500 xg durante 5 minutos a 4°C, para después aspirar el etanol y secar el pellet de RNA durante 1-2 horas. Para terminar el aislamiento de RNA se disolvió el pellet obtenido en agua milliQ con dietilpirocarbonato (DEPC) (Ambion, Life Technologies) y se mantuvo a -20°C durante 24 horas.

Para la cuantificación del RNA 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 específico Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). La pureza del RNA 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 contaminación con proteínas.

Se finalizó el procedimiento con el tratamiento del RNA obtenido con DNAasas con el objeto a fin de evitar interferencias en la posterior retrotranscripción y análisis por reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-qPCR). Para el tratamiento con DNAasas se utilizó la siguiente mezcla reactiva:

- 16 µL de RNA en H₂O milliQ tratada con DEPC (Ambion, Life Technologies).

- 2 μL de tampón de reacción 10X de DNAasa RQ1 (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EE.UU.).
- 1 μL de DNAasa RQ1 libre de RNAasa (Promega).

Dicha mezcla se incubó durante 30 minutos a 37°C en un termociclador. Posteriormente, se paró la reacción de la DNAasa añadiendo 1 μL de una solución comercial denominada *DNAasa RQ1 Stop Solution* (Promega) que se dejó actuar durante 10 minutos, a 65°C, en un termociclador.

Es necesario indicar que se realizó un control negativo (sin retrotranscriptasa) en paralelo.

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

Fundamento

Para el análisis de la expresión de mRNA existen diversas técnicas disponibles. En este caso se ha utilizado la denominada RT-qPCR, que consiste en la retrotranscripción (RT) del RNA mensajero (mRNA) transformándolo en el denominado DNA complementario (cDNA). Una vez obtenido el cDNA celular se realizará una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

(qPCR) con objeto de amplificar sólo aquellas zonas objeto de estudio mediante sondas específicas unidas a fluoróforos. La monitorización continua de la fluorescencia permitirá la cuantificación de los niveles de expresión de los genes de interés [344].

Procedimiento

Tras la purificación y determinación de la concentración y pureza del RNA total de las muestras objeto de estudio se procedió a la retrotranscripción y posterior amplificación mediante RT-qPCR.

I. Retrotranscripción

En este paso se procedió a la obtención del cDNA a partir del RNA de cada muestra mediante la utilización de transcriptasas reversas y un kit comercial específico denominado *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Life Technologies). Para ello se preparó la siguiente mezcla reactiva:

- 1 µg de RNA.
- 4 µL de tampón RT 10X.
- 4 µL de cebadores 10X.

- 1,6 μ L de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) 25X.
- 2 μ L de retrotranscriptasa M-MLV (Roche Applied Science, Basilea, Suiza).
- 1 μ L de inhibidor de RNAasa (1U/ μ L).

Dicha mezcla se incubó de forma secuencial en un termociclador en las siguientes etapas:

- 10 minutos a 25°C: incubación inicial.
- 120 minutos a 37°C: reacción de la retrotranscriptasa.
- 5 minutos a 85°C: fase de inactivación de la retrotranscriptasa

Finalmente se congeló a -20°C el cDNA obtenido hasta el momento de su amplificación.

I. Amplificación mediante RT-qPCR.

Mediante este procedimiento secuencial se consiguió amplificar de forma selectiva secuencias específicas de cDNA complementarias del mRNA de los genes cuya expresión estábamos interesados en conocer. La PCR utiliza dos oligonucleótidos o fragmentos cortos de DNA como cebadores o

iniciadores de la síntesis. Dichos cebadores se unen a secuencias complementarias que flanquean la región a amplificar, uno en cada una de las cadenas del DNA. En nuestro caso utilizamos un método a tiempo real que permite la cuantificación del fragmento amplificado (qPCR). Así, se utilizó el sistema TaqMan (Applied Biosystems, Life Technologies), donde los cebadores están unidos a sondas fluorescentes, que por medio de la actividad exonucleasa 5'-3' de la DNA polimerasa, se liberan al medio siendo posible la detección de la fluorescencia en tiempo real.

En la PCR existen una serie de fases secuenciales que pueden repetirse para la obtención de producto. Dichas fases son:

- **Desnaturalización:** Las cadenas de DNA 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:** unión de los cebadores a secuencias específicas del DNA de la región que se pretende amplificar. La temperatura óptima para el anillamiento se estima de forma empírica y viene determinada por la composición de nucleótidos de los dos iniciadores.

- Elongación a partir de los cebadores: una vez anillados los cebadores comienza el proceso de copia de una nueva cadena. El resultado del proceso es la formación de copias de las cadenas de DNA diana.

En nuestros experimentos utilizamos placas de 96 pocillos en las que se preparó la siguiente mezcla reactiva con un volumen final de 20 μL :

- 1 μL de sonda primer específica para el gen objeto de estudio (Applied Biosystems, Life Technologies).
- 1 μL de sonda primer específica para el gen de control (Applied Biosystems, Life Technologies).
- 1 μL de cDNA de la muestra a analizar
- 1 μL de tampón reactivo comercial denominado Fast Start Universal Master Mix (Roche Applied Science).
- 7 μL de H_2O milliQ libre de nucleasas (Ambion, Life Technologies).

Gen	Sonda primer <i>Gen bank (número de acceso)</i>
MT1	NM_005958 y Hs00195567_m1
MT3 (NQO2)	NM_000904.3 y Hs00168552_m1
RORα	NM_134260.2 y Hs00931968_m1
β-actina	NM_001101.2 y Hs99999903_m1

Tabla 1.- Sondas utilizadas en la RT-qPCR. Dichas sondas fueron utilizadas para la amplificación de zonas correspondientes a los genes que codifican para los receptores celulares de la melatonina presentes en los hepatocitos.

La RT-qPCR se llevó a cabo en un termociclador Step One Plus (Applied Biosystems, Life Technologies), siendo las fases y condiciones de la misma las siguientes:

1. Desnaturalización inicial: 10 minutos a 95°C
2. Desnaturalización: 15 segundos a 95°C
3. Anillamiento/elongación: 1 minuto a 60°C

Las fases 2 y 3 se repitieron a lo largo de 60 ciclos. Además, como control interno para normalizar la señal (*housekeeping*) se amplificó un fragmento específico del gen β -actina.

Además cada experimento incluyó, un control negativo de cada una de las muestras conteniendo RNA no sometido a retrotranscripción. Dichos controles negativos no dieron lugar a producto alguno en la PCR, lo que sirvió para confirmar la ausencia de DNA genómico contaminante.

La expresión génica en cada una de las muestras fue determinada según la aproximación matemática del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [344].

3.4.11 Determinación de la cantidad de cAMP por inmunoensayo

Fundamento

El cAMP es un importante segundo mensajero que ha sido implicado en diferentes procesos tanto fisiológicos como fisiopatológicos, permitiendo la transducción de señales extracelulares al interior de la célula. En nuestro trabajo utilizamos un kit comercial, basado en inmunoensayo, que permite la determinación cuantitativa de la concentración de cAMP en muestras biológicas. Dicho kit utiliza placas de 96 pocillos en cuyo fondo hay adherida proteína G capaz de anclarse eficientemente a un anticuerpo policlonal anti-cAMP [345].

Procedimiento

Transcurridas 24 horas tras la siembra de las células en placas de Petri de 9,6 cm² (BD Biosciences), se realizó el tratamiento con melatonina a concentraciones de 1000 μM y 2000 μM durante 24 y 48 horas.

Para la determinación de la concentración de cAMP se utilizó un kit comercial denominado *cAMP Direct Immunoassay Kit* (Abcam, Cambridge, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente indicar que finalizados los tratamientos, el medio de cultivo fue aspirado, incubándose durante 20 minutos las células con 270 μL de HCl 0,1 M con objeto de inactivar a las esterasas que pudieran degradar el cAMP. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y recogidas, para ser centrifugadas a 15000 xg durante 10 minutos. La concentración total de proteínas fue determinada tal como se ha indicado previamente en el texto de este capítulo material y métodos, procediendo a diluir las muestras en el rango especificado por el fabricante del kit (0,02-2 μM).

Para la determinación de la concentración de cAMP se utilizó una recta patrón realizada con diversas concentraciones estándar de cAMP (0,1-10 pmol). Todas las muestras y estándares fueron acetiladas antes del ensayo para incrementar la sensibilidad de la detección. La densidad óptica de las muestras y los estándares fue monitorizada en un lector de placas Synergy HT

Multi-Mode Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Inc.) a 450 nm.

3.5 Análisis estadístico

Los datos numéricos obtenidos en las distintas determinaciones fueron almacenados utilizando el programa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, Redmond, Washington, EE.UU.).

Para la expresión de los resultados del presente trabajo experimental 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 experimentos donde aparecían diferencias significativas, se realizó posteriormente el test de Newman-Keuls. Se consideró que existían diferencias significativas cuando la significación era $p < 0,05$. Para el tratamiento de los datos y su análisis estadístico se utilizó el software comercial SPSS versión 21.0 (IBM, Armonk, Nueva York, EE.UU.).

4.- RESULTADOS

4.1 Efecto de la administración de melatonina sobre la viabilidad celular de la línea HepG2.

El primer experimento de nuestro trabajo consistió en la realización de un estudio o screening analizando el efecto de diversas dosis y tiempos de administración sobre la proliferación celular de la línea derivada de HCC humano HepG2.

Tal como se ha indicado se realizó mediante el ensayo del MTT, compuesto que sólo es capaz de penetrar y transformarse dando señal en las células vivas.

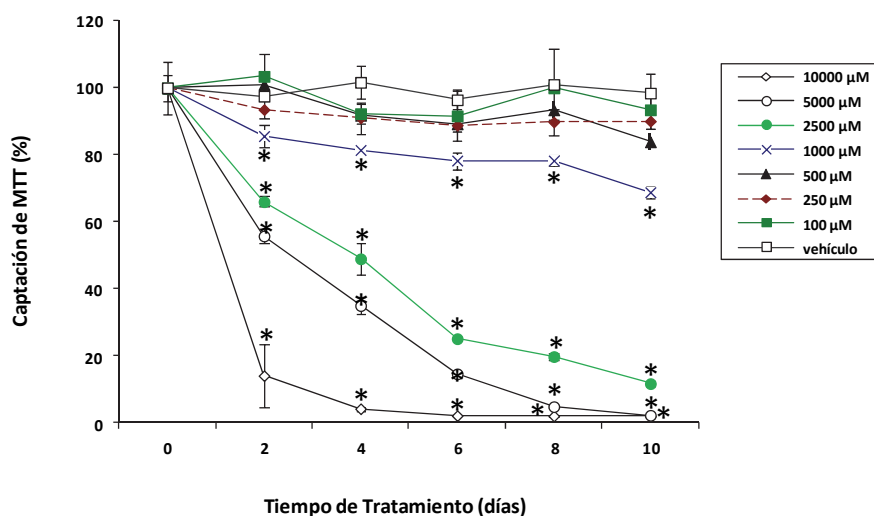


Figura 15.- Viabilidad celular en la línea celular HepG2 tratada con melatonina. Captación de MTT. Valores medios \pm E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Además, se cuantificó la liberación de LDH al medio de cultivo. Dicha que se produce cuando existe citotoxicidad y lisis celular.

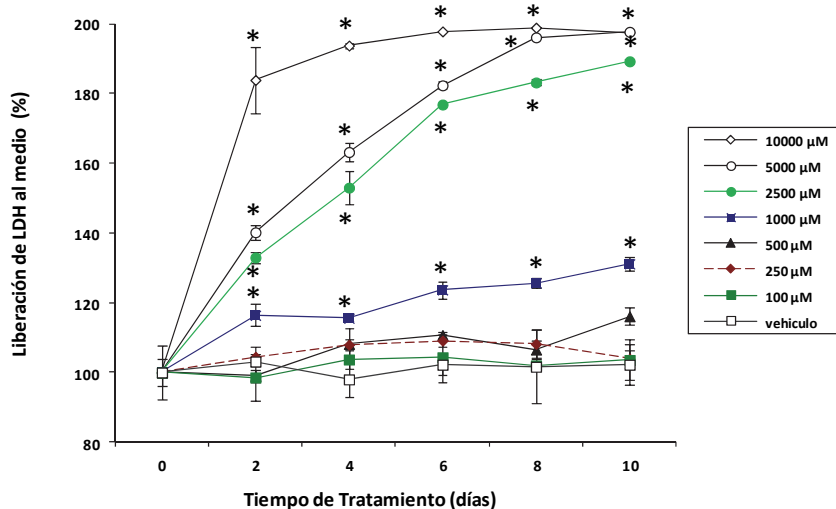


Figura 16.- Viabilidad celular en la línea celular HepG2 tratada con melatonina. Liberación de LDH al medio de cultivo. Valores medios \pm E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Como puede observarse en la figura 15 y en la figura 16, la primera reducción, estadísticamente significativa, en la viabilidad celular se produjo con la dosis de 1000 μ M a partir de los 2 días de tratamiento (viabilidad del 85% respecto el grupo control). Dicha inhibición en la viabilidad celular fue dosis y tiempo dependiente, alcanzando un máximo de cuando las células eran tratadas durante

10 días a la mayor dosis testada de 10000 μ M (viabilidad del 1,95% respecto al grupo control).

4.2 Efecto de la administración de melatonina sobre la muerte celular por apoptosis

4.2.1 Efecto de la melatonina sobre diversos marcadores de apoptosis

Tras determinar el efecto del tratamiento con melatonina sobre la viabilidad celular, se quisieron conocer las posibles consecuencias que tendría dicho tratamiento sobre la muerte celular por apoptosis. Considerando que el pico más elevado de la concentración de melatonina en el plasma de humanos es de aproximadamente 300 pM [346], decidimos analizar si la reducción en la viabilidad celular podía estar relacionada con un incremento en la apoptosis cuando administrábamos el indol a la dosis más baja capaz de reducir dicha viabilidad.

Así, analizamos dos marcadores típicos de apoptosis como son la actividad de la caspasa 3, evento común en todos los procesos apoptóticos. Para ello, tras los tratamientos las células fueron incubadas con el sustrato fluorogénico Ac-DEVD-AMC

específico para dicha caspasa. Además, analizamos la hidrólisis de la proteína poli adenosil ribosa polimerasa 1 (PARP-1). En presencia de un proceso apoptótico PARP-1, de 116 kDa de tamaño, es hidrolizada por acción de la caspasa 3 formándose un fragmento de 85 kDa [347].

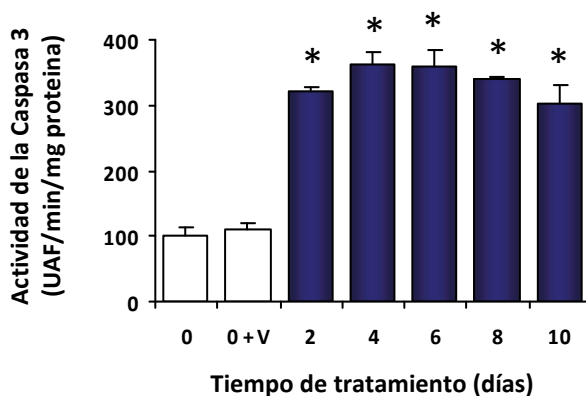


Figura 17.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la actividad de la caspasa 3. Valores medios \pm E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

En la figura 17, se encontró una marcada elevación en activación de la caspasa 3, caspasa terminal ejecutora, con un incremento de 350% a 470% respecto al grupo control a lo largo del tratamiento).

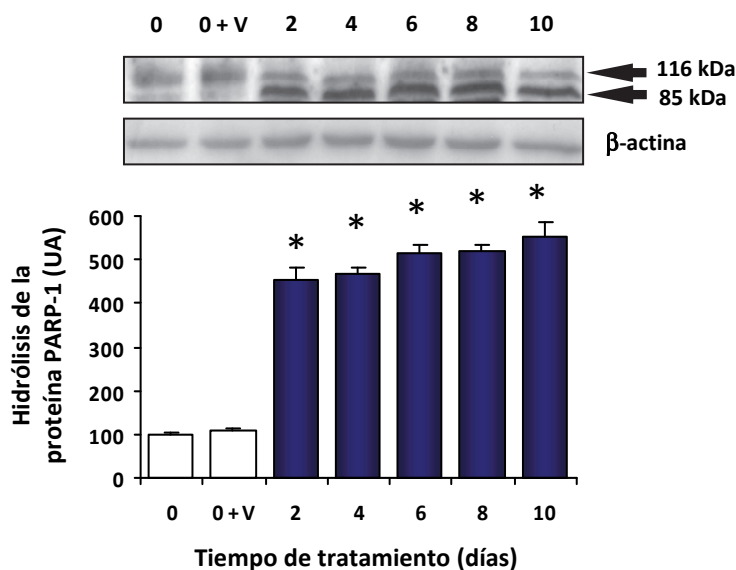


Figura 18.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μM sobre la hidrólisis de la proteína PARP-1. Valores medios \pm E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Además, tal como se puede observar en la figura 18, se encontró una marcada elevación en la hidrólisis de la proteína PARP-1, con un incremento en la formación de la banda característica de 85 kDa (350% a 450% respecto al grupo control a lo largo del tratamiento).

4.2.2 Efecto de la melatonina sobre la vía intrínseca de la apoptosis

Una vez determinada la capacidad pro-apoptótica de la melatonina sobre las células HepG2 decidimos analizar sus efectos sobre la vía intrínseca de la apoptosis.

Para ello se procedió a analizar 3 marcadores de dicha vía: la actividad de la caspasa 9 mediante ensayo fluorimétrico, y la presencia de la proteína pro-apoptótica Bax en la mitocondria junto con la liberación de la proteína C desde la mitocondria hacia el citoplasma mediante Western Blot.

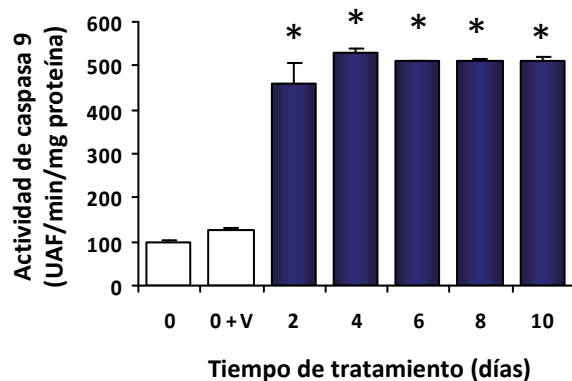


Figura 19.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μM sobre la actividad de la caspasa 9. Valores medios \pm E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

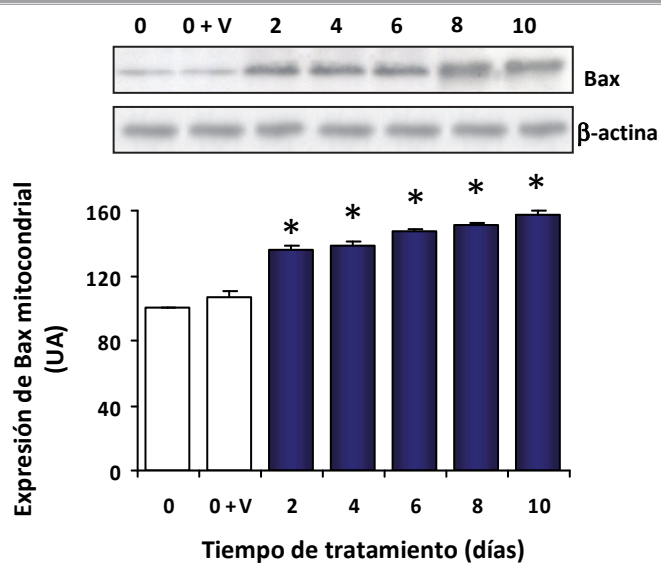


Figura 20.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μM sobre la expresión de Bax mitocondrial. Valores medios \pm E.E.M.

**Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).*

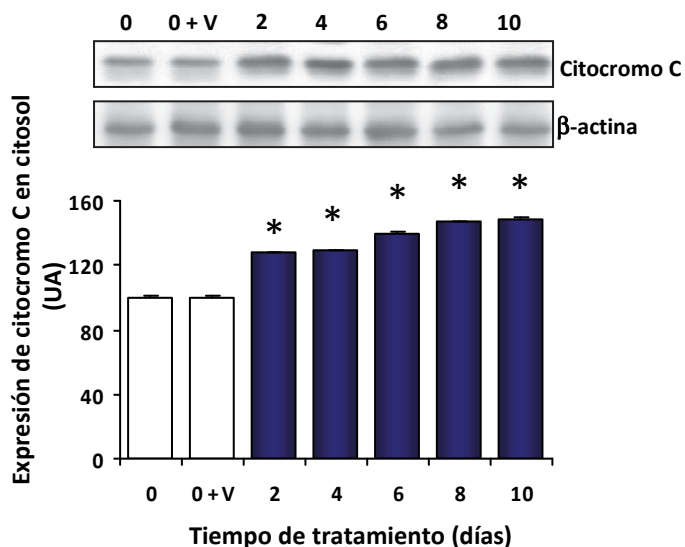


Figura 21.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la actividad de la expresión de citocromo C en el citosol mitocondria. Valores medios \pm E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Como ya se indicó en el capítulo de Revisión Bibliográfica, la activación de la caspasa 9 es un evento típico de la vía intrínseca de la apoptosis. En este proceso juega un papel importante la proteína Bax, miembro de la familia Bcl-2 con efecto proapoptótico, contribuyendo a los cambios de la permeabilidad de la membrana mitocondrial que favorecen la liberación de citocromo C al citosol y posterior activación de la caspasa 9.

Como puede observarse en la figura 19, en nuestros experimentos la administración de melatonina fue capaz de inducir un aumento significativo en la actividad de la caspasa 9 (260% a 470% respecto al grupo control). Dicha activación parece estar relacionada con el incremento detectado en la liberación de citocromo C al citosol (124% a 150% respecto al grupo control, figura 20), consecuencia de la sobre-expresión de Bax que se encontró tras los tratamientos con melatonina (129% a 156% respecto al grupo control, figura 21).

4.2.3 Efecto de la melatonina sobre la vía extrínseca de la apoptosis

Una vez claramente establecido el efecto pro-apoptótico que la administración de melatonina ejercía sobre las células HepG2 derivadas de HCC humano, en el que se veía implicada al menos la vía intrínseca de la apoptosis, se procedió a la cuantificación del efecto de la administración de dicho indol sobre la vía extrínseca.

Para ello se analizaron los dos principales marcadores de dicha vía: la actividad de la caspasa 8 y la expresión proteica de FasL mediante técnicas fluorimétricas y por Western Blot respectivamente.

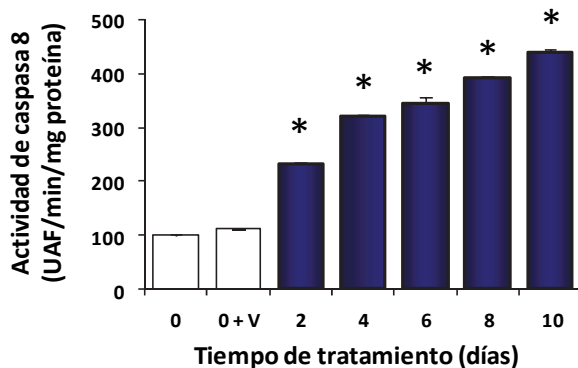


Figura 22.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la actividad de la caspasa 8. Valores medios \pm E.E.M.

**Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).*

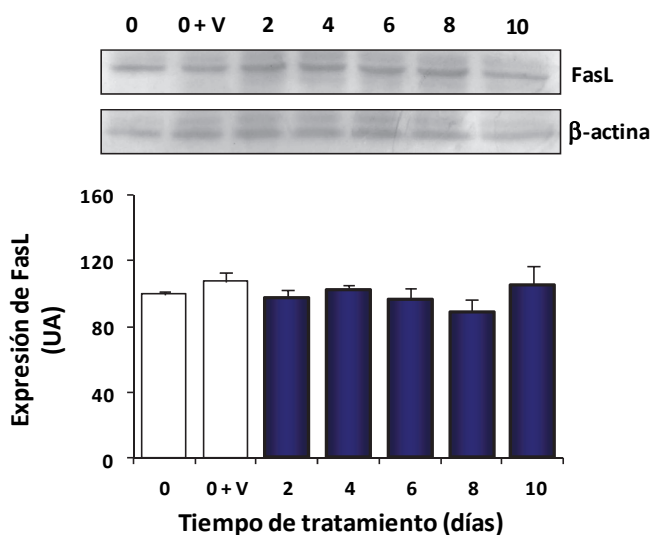


Figura 23.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la expresión de FasL. Valores medios \pm E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos mostraron un incremento estadísticamente significativo de la actividad de la caspasa 8 inducido por la melatonina (232% a 439% respecto al grupo control, figura 22). Sorprendentemente, la expresión del principal ligando relacionado con la vía extrínseca de la apoptosis, FasL, no se vio modificada por la administración de la melatonina.

4.3 Efecto de la administración de melatonina sobre el ciclo celular

Tras la obtención de nuestros primeros resultado indicando la capacidad de la melatonina para reducir la viabilidad de los hepatocitos tumorales de la línea humana HepG2, y que dicha capacidad parecía relacionada, al menos en parte, con un efecto pro-apoptótico, nos propusimos analizar su potencial efecto sobre el ciclo celular. Para la determinación de la distribución de las fases del ciclo, tal como hemos indicado ya anteriormente en el capítulo de Material y Métodos, utilizamos una técnica basada en la citometría de flujo.

Grupo	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0	67,39 ± 1,43	3,83 ± 0,53	28,78 ± 1,68
0+V	66,06 ± 0,52	4,72 ± 0,70	29,22 ± 0,68
2	51,94 ± 0,65*	4,47 ± 0,92	43,59 ± 1,47*
4	50,91 ± 0,43*	3,72 ± 0,41	45,38 ± 0,25*
6	52,17 ± 1,18*	4,92 ± 0,72	42,91 ± 1,54*
8	50,31 ± 0,19*	4,92 ± 0,14	45,39 ± 1,54*
10	49,57 ± 0,70*	5,15 ± 0,78	45,29 ± 1,54*

Tabla II.- Efecto de la administración de melatonina sobre las diversas fases del ciclo celular. Valores medios ± E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos demuestran que la progresión del ciclo celular se ve afectada en los hepatocitos tumorales de la línea HepG2 debido a la administración de melatonina. Así, el indol fue capaz de inducir un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de células en G_2/M a lo largo del tiempo (43%-45% frente al 28% en el grupo control). Dicho incremento fue acompañado por una progresiva reducción en el porcentaje de células en fase G_0/G_1 (51%-49% frente al 67% en el grupo control). Todo ello parece indicar la posible capacidad de la melatonina para detener el ciclo en G_2/M en las células derivadas de HCC humano de la línea HepG2.

4.4 Efecto de la administración de melatonina sobre la expresión de p53 y p21

Tras la obtención de los resultados anteriormente indicados, mostrando la reducción en la viabilidad celular en HepG2 mediante la administración de melatonina y que dicho efecto antitumoral parecía relacionado tanto con una inducción de la muerte celular por apoptosis como mediante una parada del ciclo celular, se continuó analizando la expresión de las proteínas p53 y p21.

Como ya hemos puesto de manifiesto en el capítulo de revisión bibliográfica se ha involucrado a la vía dependiente de p53, de la que forma parte p21, en diversos mecanismos pro-apoptóticos y citostáticos. Por ello, en cualquier estudio que se lleve a cabo relacionado con la fisiopatología y la búsqueda de nuevas terapias en el tratamiento del HCC, y de la mayoría de los tumores, es necesario analizar la contribución de p53 y p21.

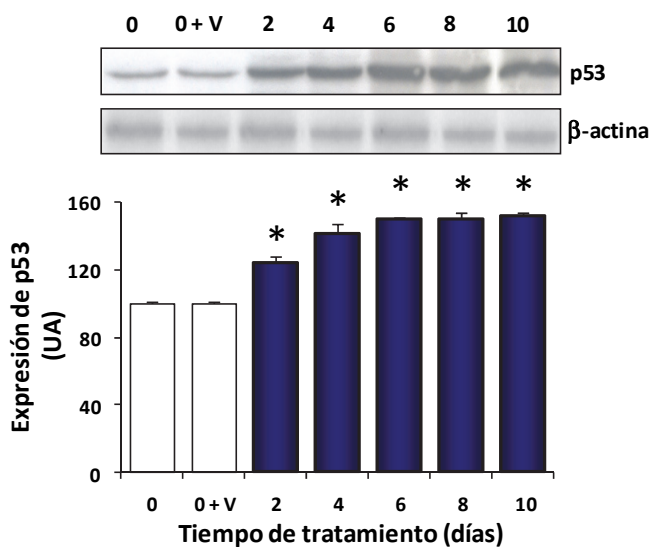


Figura 24.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la expresión de p53. Valores medios \pm E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

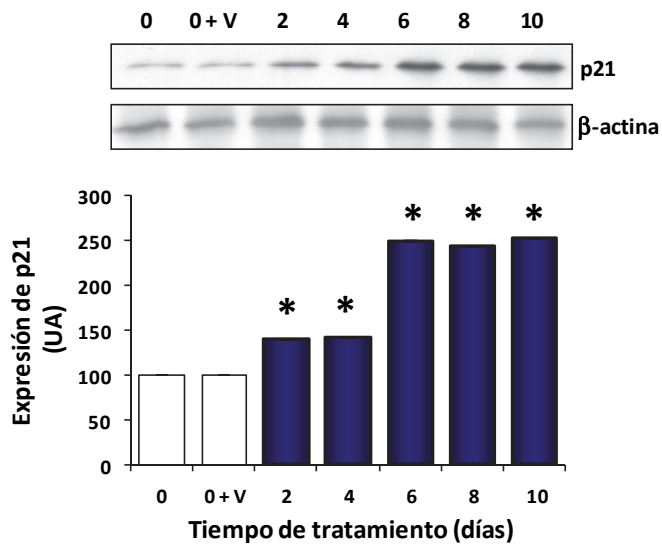


Figura 25.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la expresión de p21. Valores medios \pm E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

En nuestros experimentos la administración de melatonina incrementó tanto la expresión de p53 (125% a 159% respecto al grupo control, figura 24) como de p21 (140% a 245% respecto al grupo control, figura 25).

4.5 Efecto de la administración de melatonina sobre la vía MAPK

La contribución de la vía MAPK a la fisiopatología y el tratamiento del cáncer es de gran importancia. En nuestro caso, interesados en el HCC, nos decantamos por el análisis de una serie de miembros específicos de esta superfamilia concretamente ERK, JNK y p38.

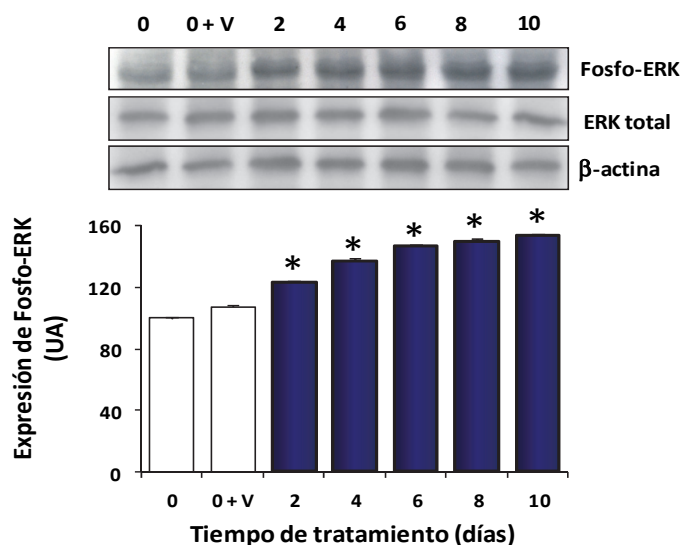


Figura 26.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la expresión de fosfo-ERK. Valores medios \pm E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

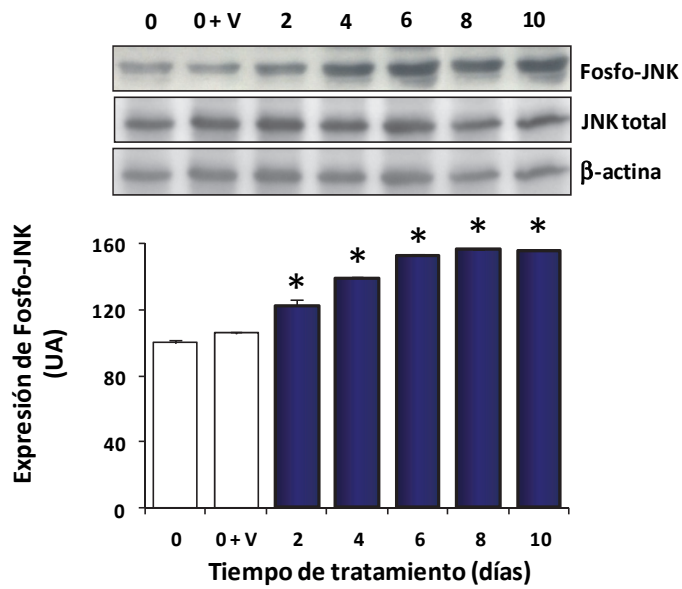


Figura 27.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la expresión de fosfo-JNK. Valores medios \pm E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

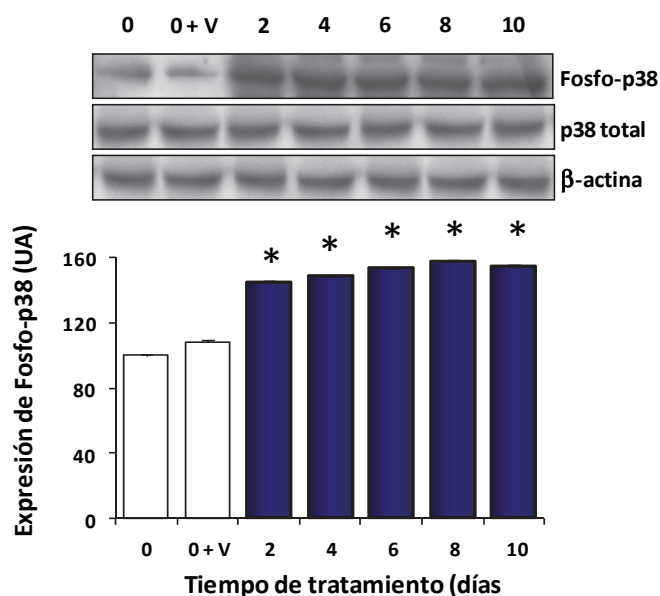


Figura 28.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M sobre la expresión de fosfo-p38. Valores medios \pm E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

En nuestro trabajo la administración de melatonina fue capaz de inducir un incremento estadísticamente significativo en la activación por fosforilación de los diversos miembros de la familia MAPK analizados. Así, observamos incrementos en la expresión de fosfo-ERK (123% a 154% respecto al grupo control, figura 26), de fosfo-JNK (125% a 155% respecto al grupo control, figura 27) y de fosfo-p38 (140% a 158% respecto al grupo control, figura 28).

4.6 Efecto de la administración de melatonina sobre la expresión de sus receptores celulares

Tras la comprobación del efecto antiproliferativo y proapoptótico de la melatonina se quiso analizar si su administración era capaz de inducir modificaciones en la expresión de sus propios receptores celulares. Para ello, se decidió trabajar acortando los tratamientos con melatonina (0, 2, 4 y 6 días) y utilizar las dosis de 1000 μM y 2500 μM (las dos dosis más bajas y efectivas).

Se analizó la expresión proteica y a nivel de mRNA (mediante Western blot y RT-qPCR respectivamente) del receptor de membrana MT1, del receptor citosólico MT3 y del receptor nuclear ROR α .

La expresión del receptor de membrana MT2 fue analizada en nuestras muestras; sin embargo, tal como podía esperarse en muestras de origen hepático, no fue detectada expresión alguna de dicho receptor ni a nivel proteico ni a nivel de mRNA.

4.6.1 Efecto de la melatonina sobre la expresión de MT1

MT1 es el principal receptor de membrana de la melatonina en tejido hepático, por ello fue el primero analizado por nosotros.

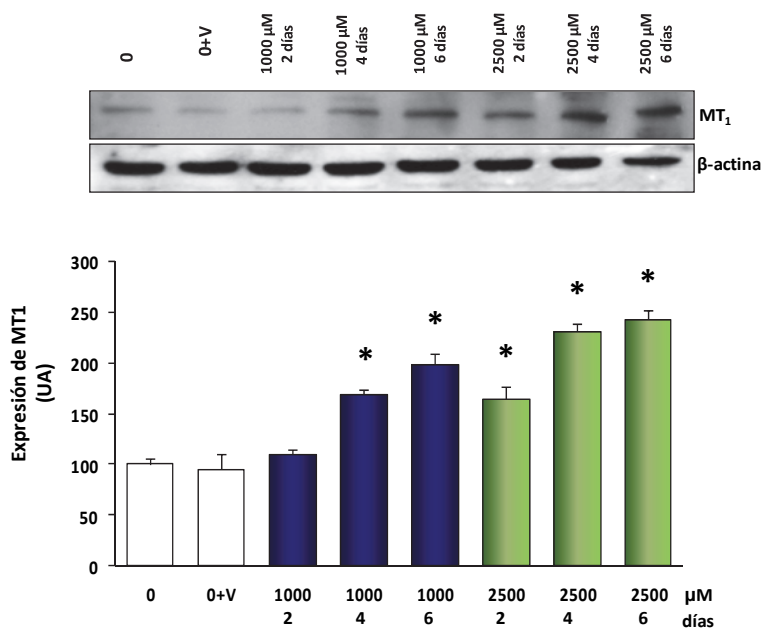


Figura 29.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μM y 2500 μM sobre la expresión proteica de MT1. Valores medios ± E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Además, de analizar la expresión proteica de MT1 se procedió al análisis de la expresión de su mRNA mediante RT-qPCR.

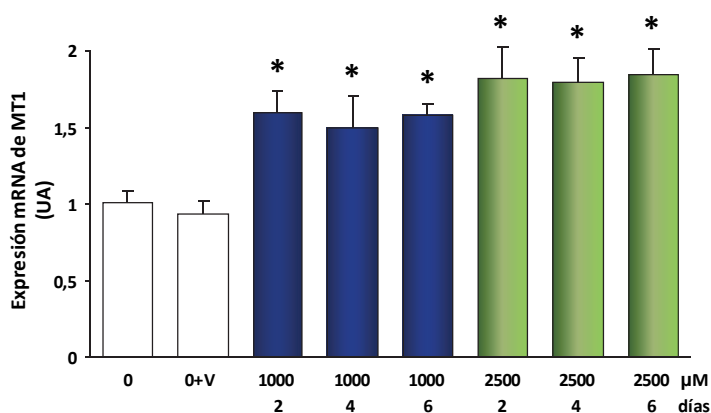


Figura 30.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μM y 2500 μM sobre la expresión del mRNA de MT1. Valores medios \pm E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Nuestros análisis demostraron que la melatonina era capaz de inducir un incremento estadísticamente significativo en la expresión de su propio receptor de membrana MT1 tanto a nivel proteico (123% a 238% respecto a control, figura 29) como a nivel de mRNA (151% a 188% respecto a control, figura 30).

4.6.2 Efecto de la melatonina sobre la expresión de MT3

MT3 es el receptor de citosólico de la melatonina, habiendo sido identificado con la enzima NQO2.

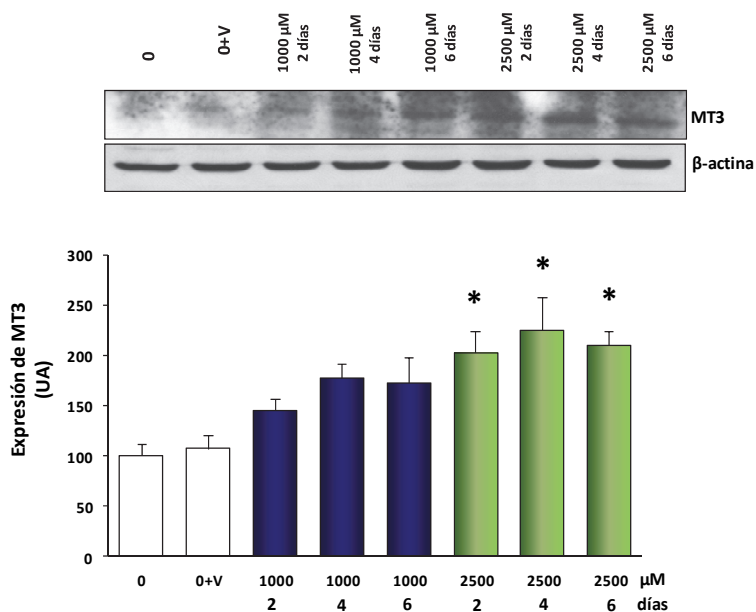


Figura 31.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μ M y 2500 μ M sobre la expresión proteica de MT3. Valores medios \pm E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Además, de analizar la expresión proteica del receptor citosólico de la melatonina, MT3, se procedió al análisis de la expresión de su mRNA mediante RT-qPCR.

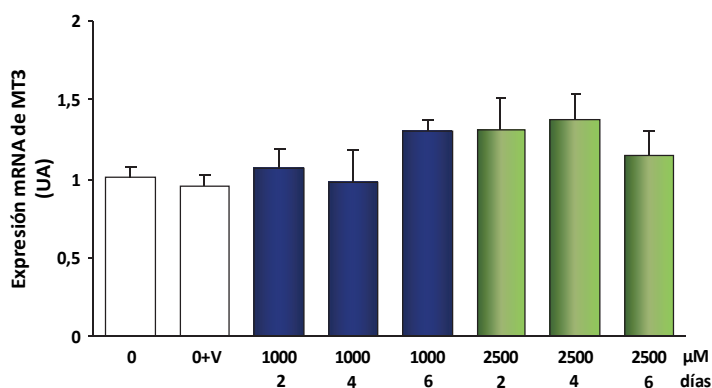


Figura 32.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μM y 2500 μM sobre la expresión del mRNA de MT3. Valores medios ± E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Estos análisis indicaron que la melatonina sólo era capaz de inducir modificaciones en la expresión proteica de MT3 a la dosis de 2500 μM (190% a 213% respecto al grupo control, figura 31). Sin embargo, ninguna de las dos dosis fue capaz de inducir cambios en la expresión del mRNA de MT3 (figura 32).

4.6.3 Efecto de la melatonina sobre la expresión de RORα

RORα es el único receptor nuclear de la melatonina actualmente descrito, por ello se procedió a su análisis en nuestros experimentos con células HepG2.

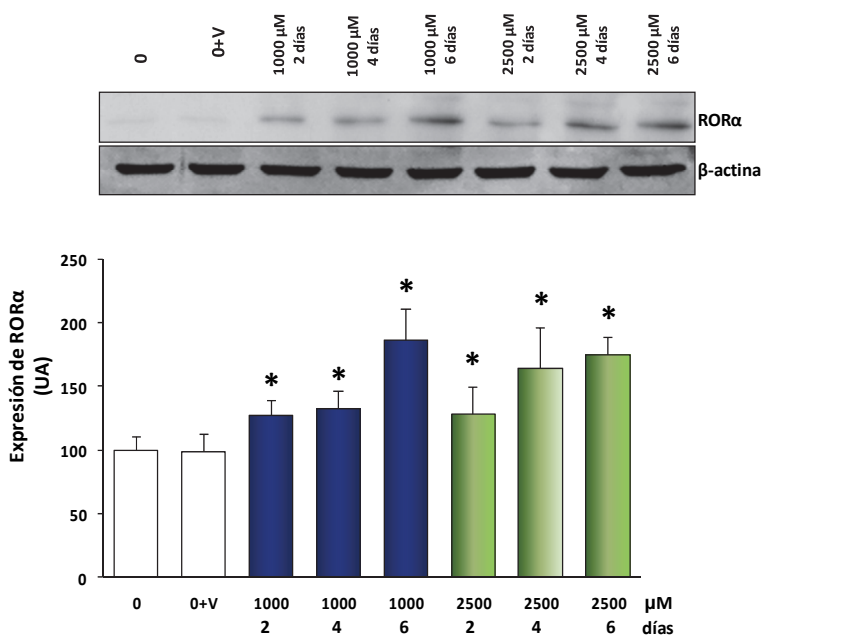


Figura 33.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μM y 2500 μM sobre la expresión proteica de RORα. Valores medios ± E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Además, de analizar la expresión proteica del receptor nuclear de la melatonina, RORα, se procedió al análisis de la expresión de su mRNA mediante RT-qPCR.

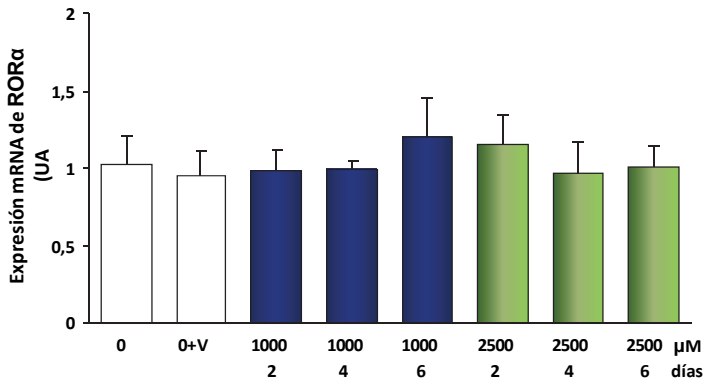


Figura 34.- Efecto del tratamiento con melatonina a la dosis de 1000 μM y 2500 μM sobre la expresión del mRNA de ROR α . Valores medios \pm E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Estos análisis indicaron que la melatonina sólo era capaz de inducir modificaciones en la expresión proteica de ROR α tanto a la dosis de 1500 μM como de 2500 μM (125% a 185% respecto al grupo control, figura 33). Sin embargo, ninguna de las dos dosis fue capaz de inducir cambios en la expresión del mRNA de ROR α (figura 34).

4.7 Efecto de la inhibición de MT1 sobre los efectos antitumorales de la melatonina

Todos los resultados obtenidos hasta este momento nos indicaban que la capacidad antitumoral de la melatonina podría estar, al menos en parte, relacionada con el incremento en la expresión de sus receptores nucleares. Entre dichos receptores, el único presente en hígado, y que sufrió modificación en su expresión tanto proteica como a nivel de mRNA, era MT1.

Por todo lo anterior, decidimos analizar diversos parámetros relacionados con efecto antitumoral de la melatonina cuando inducíamos la inhibición del receptor MT1 mediante la administración de un inhibidor químico específico denominado luzindol (N-Acetil-2-bencil triptamina, Tocris Bioscience, Ellisville, Missouri, EE.UU.).

En estos experimentos las células HepG2 eran pre-incubadas con luzindol durante 60 minutos, a la dosis de 1 μ M, inmediatamente antes del inicio de los tratamientos con melatonina a 1000 y 2500 μ M. Para evitar una degradación excesiva del inhibidor los tratamientos con melatonina en estos experimentos fueron acortados a 24 y 48 horas.

4.7.1 Efecto de la inhibición de MT1 sobre la viabilidad celular en HepG2

En primer lugar se realizó un ensayo de captación de MTT, que como ya hemos visto anteriormente marcará solamente a las células vivas.

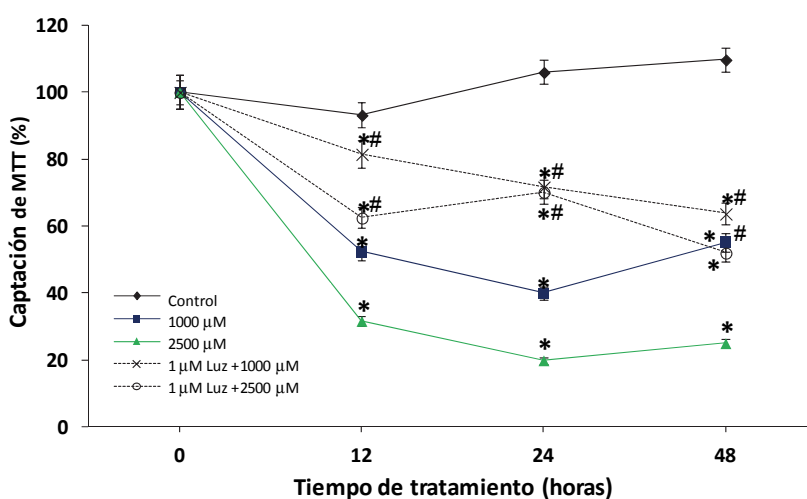


Figura 35.- Viabilidad celular en la línea celular HepG2 tratada con melatonina y/o Luzindol (Luz). Captación de MTT. Valores medios \pm E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$). #Diferencias significativas respecto al respectivo grupo tratado con melatonina 24 h ($p < 0,05$).

Este resultado nos mostró una importante recuperación de la viabilidad celular cuando las células habían sido previamente incubadas con luzindol.

4.7.2 Efecto de la inhibición de MT1 sobre la concentración de cAMP

MT1 es un receptor de membrana acoplado a una proteína G que al activarse induce una reducción en la síntesis de cAMP. Por ello, nos propusimos analizar el efecto que la melatonina y la inhibición de MT1 tendría sobre la concentración de cAMP.

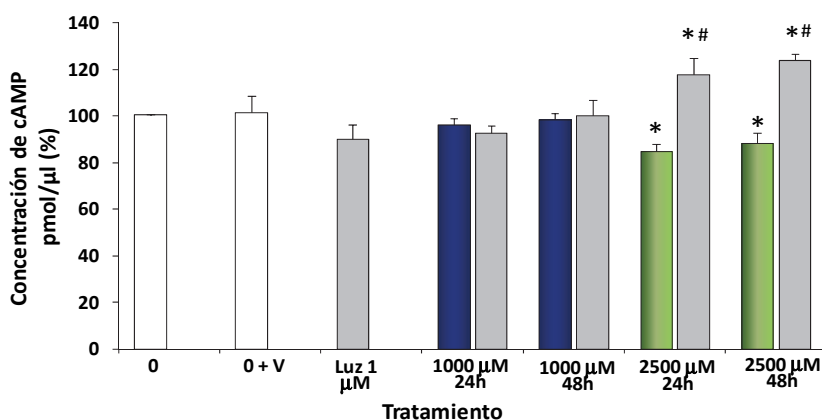


Figura 36.- Concentración de cAMP en la línea celular HepG2 tratada con melatonina y/o Luzindol (Luz). Captación de MTT. Valores medios \pm E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$). #Diferencias significativas respecto al respectivo grupo tratado con melatonina en su respectivo tiempo ($p < 0,05$).

Este análisis nos mostró que, con unos periodos más cortos de administración, la melatonina fue capaz de reducir significativamente la concentración de cAMP cuando el indol era

utilizado a 2500 μM . Dicho efecto era bloqueado con la pre-incubación con luzindol.

4.7.3 Efecto de la inhibición de MT1 sobre la vía MAPK

Dado que el efecto antitumoral de la melatonina parece, al menos en parte, relacionada con su capacidad para influenciar la vía de las MAPK quisimos analizar qué efectos tendría la administración del inhibidor de MT1 sobre dicha vía.

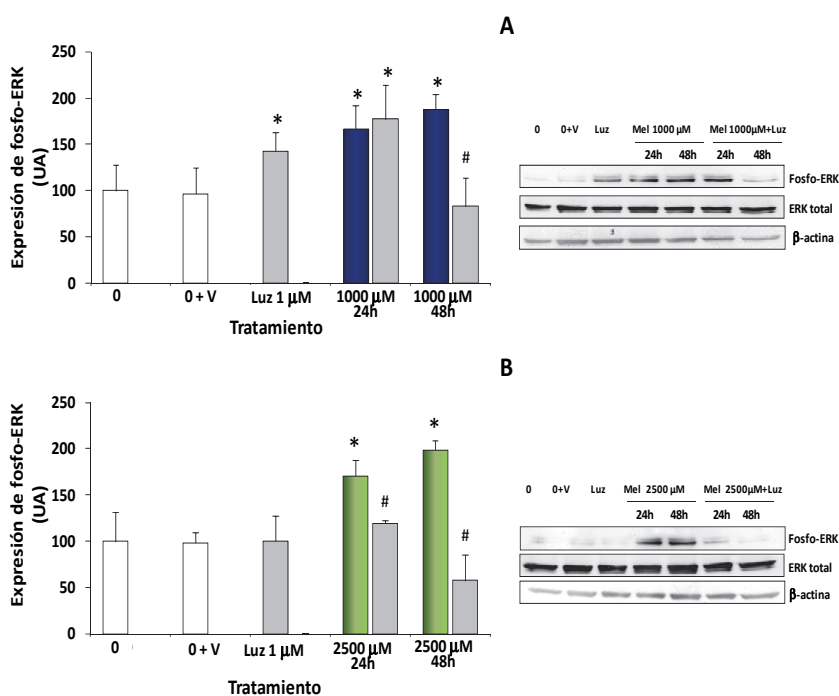


Figura 37.- Efecto del tratamiento con melatonina y/o Luzindol (Luz) sobre la fosforilación de ERK. Panel A: melatonina 1000 µM. Panel B: melatonina 2500 µM. Valores medios ± E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$). #Diferencias significativas respecto al respectivo grupo tratado con melatonina en su respectivo tiempo ($p < 0,05$).

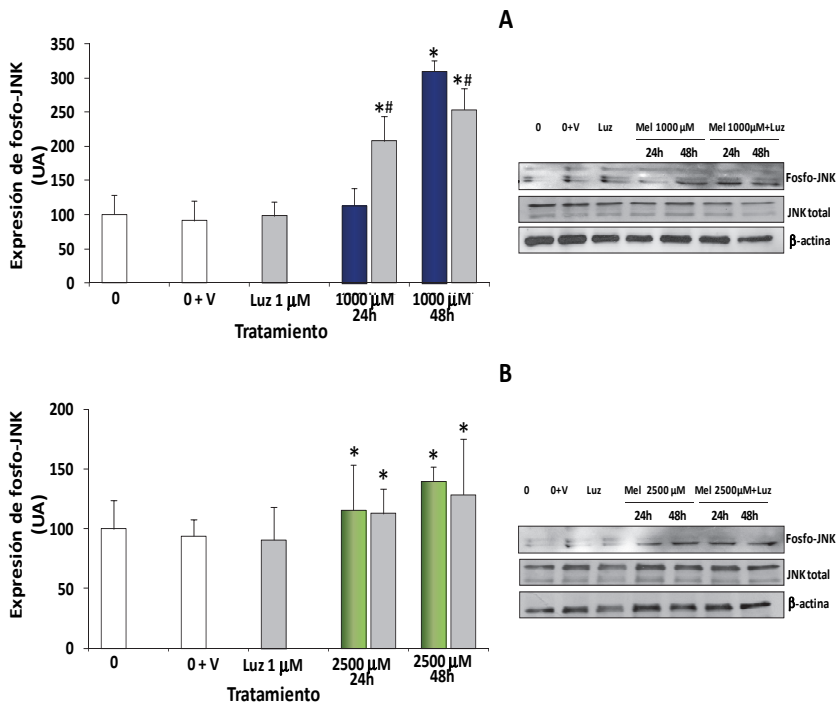


Figura 38.- Efecto del tratamiento con melatonina y/o Luzindol (Luz) sobre la fosforilación de JNK. Panel A: melatonina 1000 μM. Panel B: melatonina 2500 μM. Valores medios ± E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$). #Diferencias significativas respecto al respectivo grupo tratado con melatonina en su respectivo tiempo ($p < 0,05$).

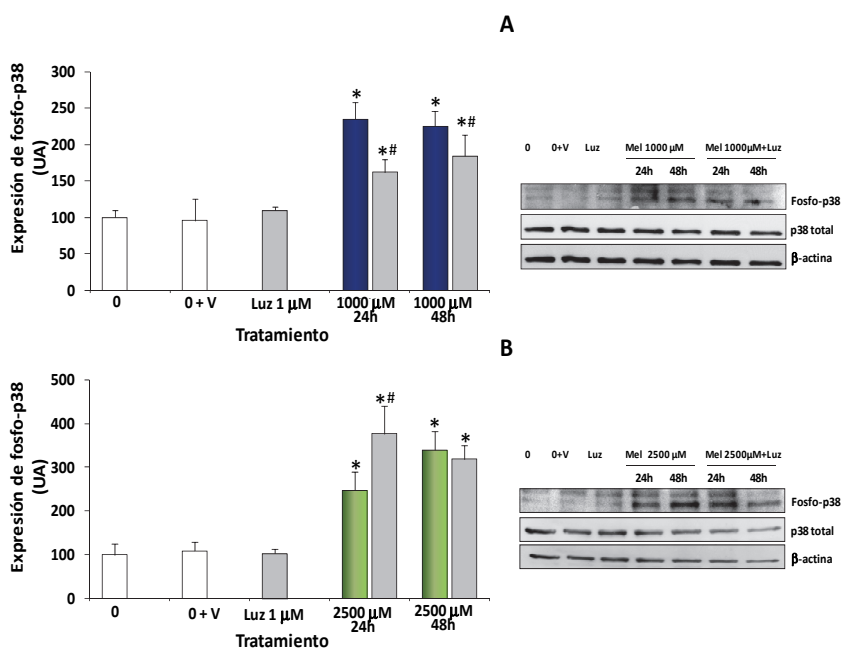


Figura 39.- Efecto del tratamiento con melatonina y/o Luzindol (Luz) sobre la fosforilación de p38. Panel A: melatonina 1000 μM. Panel B: melatonina 2500 μM. Valores medios ± E.E.M. *Diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$). #Diferencias significativas respecto al respectivo grupo tratado con melatonina en su respectivo tiempo ($p < 0,05$).

El tratamiento con melatonina fue capaz de inducir incrementos en la activación por fosforilación en todos los miembros de la vía MAPK analizados (ERK, JNK y p38). La preincubación con el inhibidor de MT1 luzindol fue capaz de provocar, aunque con diferencias, la reducción de dichas fosforilaciones en la mayor parte de los casos. Así, bloqueó la fosforilación de ERK tanto

en la dosis de 1000 μ M como de 2500 μ M de melatonina tras 48 horas de tratamiento (figura 37). En el caso de la fosforilación de JNK el bloqueo fue parcial (sin llegar a valores del grupo control, figura 38). Finalmente, la pre-incubación con luzindol no fue capaz de bloquear la fosforilación de p38 (figura 39).

5.- DISCUSIÓN

5.1 Efecto de la melatonina en la viabilidad de las células HepG2: potencial interés en el tratamiento del HCC.

El HCC constituye el principal tumor hepático a nivel mundial, siendo relativamente frecuente tanto en hombres como en mujeres con el 8% y 6,5% respectivamente de todos los casos de cáncer. Desgraciadamente, la incidencia del HCC está sufriendo un incremento preocupante en los últimos tiempos en la mayoría de los países desarrollados [1]. En la actualidad, en nuestro entorno los ratios de incidencia de este tipo de tumor pueden considerarse como medios (10-20 casos por 100.000) [2]. Con todo, este tipo de tumor constituye la tercera causa de muerte por cáncer a nivel mundial, siendo responsable de la muerte de unas 600.000 personas anualmente [1].

A pesar de la gran cantidad de investigaciones realizadas, tanto clínicas como básicas, todavía existe controversia en la comunidad médica sobre la mejor aproximación terapéutica para el tratamiento del HCC. Se considera que la primera línea de actuación contra el HCC debe consistir en la prevención de las diversas enfermedades crónicas asociadas con el tumor como por ejemplo la infección con HBV [77]. Sin embargo, una vez que la cirrosis se ha establecido se hace necesario utilizar diferentes aproximaciones terapéuticas en los pacientes afectados [79]. Por desgracia, la evolución hacia el HCC es en muchos casos

prácticamente silente, permaneciendo los pacientes asintomáticos, lo que hace que sean diagnosticados en fases intermedias o avanzadas del tumor cuando las terapias ya son menos efectivas [80]. En muchos casos, el mejor tratamiento pasa por la resección quirúrgica del tumor o del órgano completo, pero existe el peligro de la recurrencia en el hígado subyacente y la dificultad que supone la escasez de órganos disponibles para su trasplante. Otras posibilidades de tratamiento, potencialmente útiles según el estado del paciente, pasan por la ablación con alcohol, la quimioembolización o la radiofrecuencia, pero obtienen en la mayoría de los casos resultados más bien discretos y presentan un alto índice de recurrencia [93, 96].

En los últimos años, la administración de sorafenib ha constituido el principio del desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas contra dianas moleculares, y más aún en el caso del HCC en el que no existía una terapia sistémica efectiva. No obstante, los resultados aunque satisfactorios son discretos, y parece necesario el desarrollo de nuevas terapias contra este tipo de tumor [101]. Además, tal como hemos puesto de manifiesto en la revisión bibliográfica al principio de la presente Tesis Doctoral, el tratamiento con sorafenib no está exento de efectos secundarios, contraindicaciones e incluso aparición de resistencias [91, 103, 105, 106].

La melatonina es una indolamina presente en el organismo humano como neurohormona. Se trata de una molécula ubicua altamente conservada a lo largo de la evolución que ha sido descrita no solo en el hombre y otros mamíferos, sino también en todos los vertebrados e incluso en invertebrados, bacterias, protozoos, plantas y hongos [289]. Desde el punto de vista químico tiene la ventaja de poseer tanto características hidrofílicas como lipofílicas, lo que le permite atravesar la mayoría de las barreras biológicas incluyendo incluso la barrera hematoencefálica y la placenta, por lo que puede constituir una versátil molécula en diversos procesos fisiológicos [295, 348]. Dada su naturaleza química, la melatonina parece ser capaz de afectar a diversas vías de señalización intracelular y proteger a las células sanas frente a muy diversos tipos de daño. Así, se ha descrito su gran capacidad antioxidante frente a los diversos tipos de daño causados por el estrés oxidativo en diferentes situaciones fisiopatológicas, resultando en células sanas incluso un agente antiapoptótico [315, 316]. Incluso parece ejercer efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios en diversas situaciones fisiopatológicas [300, 312], lo que la hace una molécula de gran interés en diversos campos de investigación biomédica.

En el campo de la oncología, la melatonina ha demostrado tener actividad antitumoral cuando ha sido analizada en diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, muchos de los experimentos realizados se derivan de estudios basados en el

cáncer de mama, donde incluso concentraciones fisiológicas parecen tener efectos inhibitorios sobre el crecimiento de las células tumorales cuando éstas son cultivadas *in vitro*, observándose una parada del ciclo celular en la fase G₂ [325, 326]. Existen algunas investigaciones realizadas con otras células cancerosas (principalmente derivadas de colon, coriocarcinoma, próstata, etc) que refieren también efectos antitumorales de la melatonina, administrada a dosis farmacológicas, que son dirigidos por diferentes vías moleculares [327, 328, 349].

Nuestro estudio, centrado en los potenciales efectos antitumorales que la melatonina podría ejercer en el HCC, hemos utilizado una línea celular establecida derivada de HCC humano. Todos nuestros fueron realizados por nosotros mismos en colaboración con el equipo del Dr. González-Gallego y el Dr. Mauriz en el Instituto Universitario de Biomedicina (IBIOMED) de la Universidad de León. Se trata de un estudio que se enmarca en una línea de investigación interesada por la realización experimentos *in vitro* utilizando melatonina en el tratamiento de tumores hepáticos, en la actualidad centrada en el hepatocarcinoma pero que posiblemente se extienda en un futuro próximo también hacia el colangiocarcinoma.

En nuestros experimentos, inicialmente testamos el efecto que la administración de melatonina podía ejercer sobre la viabilidad de las células tumorales HepG2. Los primeros resultados

mostraron un efecto antiproliferativo en forma dosis y tiempo dependiente, ya desde los 2 días de incubación con melatonina a la dosis de 1000 μM y alcanzando un máximo con 10 días de administración a la dosis de 10000 μM (Figuras 15 y 16 respectivamente). Estos datos concuerdan con otros publicados por otros autores indicando que dosis farmacológicas de este indol de entre 1000 μM a 6000 μM tienen efectos antiproliferativos en células tumorales humanas como en el caso de las derivadas de cuello uterino (líneas ME-180 y HELA), ovario (OAW-42) y colon (HT-29), o derivadas de tumores murinos de colon (CT-26) [317-319, 321, 346, 350]. Además, otros estudios han puesto de manifiesto que, en determinados tipos de cáncer, la melatonina tiene efectos antiproliferativos incluso a dosis menores (en el rango nanomolar), tal como ocurre en líneas celulares derivadas de cáncer de mama o coriocarcinoma [328, 351].

5.2 Efecto de la melatonina en la apoptosis de las células HepG2.

A la hora de analizar si el efecto antiproliferativo de la melatonina sobre la línea HepG2 estaba relacionado con la inducción de la apoptosis, decidimos centrarnos en la dosis de 1000 μ M por ser la más baja en la que observamos inicialmente algún tipo de efecto antitumoral. Hemos de indicar, que todas las dosis utilizadas en nuestro estudio pueden calificarse como farmacológicas, por hallarse muy por encima de la concentración fisiológica que ha sido determinada en humanos sanos que se estima en aproximadamente 300 pM [346]. Tal como puede observarse en las figura 17 y 18, nuestro estudio mostró que la administración de melatonina a la dosis de 1000 μ M durante 2-10 días era capaz de inducir incrementos en la actividad de la caspasa 3 (caspasa efectora terminal de los procesos de apoptosis) y en la proteólisis de la proteína PARP (uno de los principales efectos de la apoptosis a nivel nuclear). Ambos resultados son claros indicadores de una significativa inducción de la apoptosis por parte de la melatonina en las células HepG2. Resultados similares, con inducción de la apoptosis en células tumorales, han sido descritos en experimentos *in vitro* realizados con células derivadas de melanoma, neuroblastoma, cáncer prostático, tumores de mama, o cáncer de colon cuando se administró melatonina de forma aislada o en combinación con otros compuestos [325, 352-356].

Curiosamente, también en hígado, aunque en modelos animales estudiando situaciones fisiopatológicas diferentes al cáncer como por ejemplo en el daño hepático inducido por el envejecimiento, la malaria o la isquemia-reperfusión, se ha descrito el efecto contrario al observado por nosotros indicándose una reducción de la apoptosis al administrarse melatonina [357-359]. Sin embargo, cuando nos centramos en tumores hepáticos, existen claras evidencias que apoyan los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, mostrando la existencia de mecanismos pro-apoptóticos inducidos por la administración de melatonina en hepatocitos tumorales murinos de las líneas H22 y HEPA diferentes a las células HepG2 humanas utilizadas en nuestros experimentos [353, 360].

En nuestro estudio quisimos también conocer si la inducción de la apoptosis en las células HepG2 por parte de la melatonina implicaba a una o a ambas vías de la apoptosis. Por ello, analizamos una serie de marcadores de la vía intrínseca y de la vía extrínseca de la apoptosis.

Es ampliamente conocido que la caspasa 3 es una proteína ejecutora que es activada tanto por la vía intrínseca como por la vía extrínseca de la apoptosis. Además, existe una gran variedad de agentes y situaciones fisiopatológicas capaces de inducir la sobre-expresión y traslocación de la proteína proapoptótica Bax hacia la mitocondria, lo que favorecerá la salida de citocromo C y posterior inducción de la caspasa 9 que concluirá con la activación de la

caspasa 3 que lleva a la muerte celular por apoptosis [361]. Nuestros resultados mostraron incrementos en la expresión de la proteína proapoptótica Bax (figura 20), junto con la salida de citocromo C al citosol desde la mitocondria (figura 21) y el incremento de la actividad de la caspasa 9 tras la administración de la melatonina a las células tumorales HepG2 (figura 19), demostrando la activación de la vía intrínseca de la apoptosis cuando se administra melatonina. Dichos resultados están en concordancia con los experimentos de otros investigadores que también han indicado que la melatonina parece capaz de inducir la activación de la vía extrínseca de la apoptosis, con liberación de citocromo C acompañada de sobre-expresión de Bax, en células derivadas de prolactinomas de rata o derivadas de linfoma B y células mieloides humanas [362-364].

En cuanto a la vía intrínseca, ésta suele estar mayoritariamente relacionada en el hígado con unión FasL a su receptor Fas lo que va a inducir la formación de complejos de muerte, la activación de la caspasa 8 y la posterior activación de la caspasa ejecutora terminal 3 lo que conlleva el inicio del proceso de muerte celular por apoptosis. Sorprendentemente, en nuestro trabajo observamos como existió una activación de la caspasa 8, pero sin cambios en la expresión de FasL (figura 22 y figura 23 respectivamente). Estos aparentemente contradictorios resultados pueden ser explicados por el hecho de que la caspasa 8 puede, ser activada también por un mecanismo, aun poco conocido e

independiente de FasL, consecuencia de la salida de citocromo C al citosol durante la activación de la vía intrínseca [365].

A la vista de todo lo anterior, podríamos señalar que en nuestro modelo experimental la administración de melatonina es capaz de inducir la muerte celular por apoptosis en las células HepG2, principalmente a través de la vía intrínseca y en menor medida a través de la activación de la caspasa 8 independiente de FasL.

5.3 Efecto de la melatonina sobre la progresión del ciclo celular en las células HepG2.

En nuestro trabajo la reducción en la viabilidad de las células tumorales HepG2 estuvo relacionada no solo con la muerte celular por apoptosis sino también con un efecto citostático. Así, la apoptosis fue acompañada por una reducción en el porcentaje de células en la transición G_0/G_1 e incremento en el porcentaje en G_2/M , lo que indica una parada del ciclo celular en G_2/M (Tabla II). Resultados similares han sido publicados por otros autores, relacionando fenómenos de apoptosis con incrementos en G_2/M , como por ejemplo tras la administración de análogos de nucleósidos, estrés oxidativo o administración de resveratrol a

células gástricas tumorales [366-368]. Además, al igual que ocurre en nuestros experimentos, la administración de melatonina también se ha relacionado con parada del ciclo celular en G₂/M e inducción de la apoptosis en células derivadas de neuroblastoma humano [354]. Como es bien conocido, el gen supresor de tumores p53 parece ser capaz de inhibir la proliferación celular y/o inducir apoptosis. Incluso, no sólo se ha descrito ya previamente que la expresión de p21 (proteína relacionada con la parada del ciclo celular) puede ser inducida por p53, sino que Bax y otras proteínas proapoptóticas de la familia Bcl2 pueden ser también sobreexpresadas por el mismo mecanismo transcripcional a través de p53 [369, 370]. En los presentes experimentos pudimos observar como la melatonina era capaz de inducir un significativo incremento en la expresión proteica de p53, que a su vez incrementó la expresión de p21 (Figuras 24 y 25, respectivamente). Posiblemente, la parada en el ciclo celular observada por nosotros se deba, al menos en parte, al incremento en la expresión de p21 que es capaz de actuar inhibiendo a las quinasas implicadas en el ciclo celular. Resultados similares, con incrementos en la expresión de p53 y p21, parada del ciclo celular e inducción de la apoptosis, han sido descritos por otros investigadores cuando se administra melatonina a células de la línea MCF-7 derivadas de tumores mamarios [371].

Por todo ello, podríamos señalar que la administración de melatonina en nuestros experimentos parece ser capaz de inducir

la parada del ciclo celular a través de un mecanismo que implica al sistema p53/p21, contribuyendo a su efecto antitumoral en las células HepG2 derivadas de HCC humano.

5.4 Efecto de la melatonina sobre la vía MAPK en las células HepG2.

La potencial contribución de la vía MAPK tanto a la fisiopatología como al tratamiento del cáncer es significativa, pero depende del tipo de células y del tipo de señales que éstas reciban [372]. No obstante, se ha descrito con frecuencia la desregulación de MAPK en el desarrollo de diversos tipos de tumor, entre ellos el HCC [269]. Incluso, algunos estudios han indicado que el efecto antitumoral de la melatonina podría estar relacionado con la modulación de MAPK en diversos tipos de cáncer como por ejemplo en células derivadas de tumores prostáticos (línea LNCaP), mama (línea MCF-7) o de melanoma (línea SK-MEL-1) [373-375]. Por ello, nos propusimos intentar determinar el potencial rol de la vía MAPK en nuestros experimentos, procediendo a analizar la activación de varios de sus miembros mediante la cuantificación de sus niveles de fosforilación. Así, pudimos observar un claro incremento en la activación de ERK, JNK y p38, con incrementos significativos en sus respectivas fosforilaciones cuando se

administró melatonina a las células HepG2 (Figuras 26, 27 y 28 respectivamente).

Aunque ERK ha sido frecuentemente asociada con proliferación y supervivencia celular, existen evidencias de que su activación es necesaria para la parada del ciclo celular e inducción de la apoptosis inducida por cisplatino en células H22 derivadas de HCC [376]. Además, se ha descrito que el paclitaxel provoca la parada del ciclo celular en G₂/M y muerte celular en células MCF-7 derivadas de tumores mamarios, tal como parece ocurrir en nuestro trabajo con melatonina en células HepG2 derivadas de HCC [377].

Por otro lado, en cuanto a la activación de JNK en nuestros experimentos, estos resultados están en concordancia con aquellos que indican que su activación se relaciona con la muerte celular de células hepáticas y la inducción de la apoptosis a través de la sobre-expresión de la proteína proapoptótica Bax tras la administración de diversas sustancias como luteolina o antocianidinas [378, 379], algo que, como ya hemos visto, también ocurre en nuestro trabajo (Figura 20). Incluso, la activación de JNK parece ser capaz de inducir la vía de p53/p21 siendo responsable no solo de la apoptosis sino también de la parada del ciclo celular en G₂/M en células HepG2 tras la administración de ácido gálico, resultado similar al obtenido por nosotros cuando administramos melatonina [380].

En lo concerniente a la activación de p38 que hemos observado en nuestros resultados, parece que podría participar también en la inducción de la vía intrínseca de la apoptosis en hepatocitos tumorales; así, algunos autores han descrito que dicha activación es capaz de promover la sobre-expresión de Bax favoreciendo su traslocación hacia la mitocondria en estos hepatocitos e instaurando un proceso apoptótico [378].

En relación a la activación de MAPK, podríamos señalar que en nuestro trabajo experimental *in vitro* la parada del ciclo celular y la activación de la apoptosis tras la administración de melatonina podría ser debida, al menos en parte, a la inducción de la vía MAPK que produciría la sobre-expresión de Bax y la salida de citocromo C al citosol con la posterior activación de las caspasa 9 y 8. Además, podría estar también relacionada con la parada del ciclo celular en la fase G₂/M, inducida por p21 tras la sobre-expresión observada de p53.

5.5 Contribución de los receptores de la melatonina a su efecto antitumoral en células HepG2.

Los receptores de membrana de la melatonina, MT1 y MT2, se pueden expresar conjuntamente en un mismo tipo celular o

aparecer de forma aislada específicamente en un tejido [317, 318, 381]. Además, dichos receptores tienen características de unión similares, así ambos tienen una alta afinidad por su ligando la melatonina y son sensibles a la unión de guanosina trifosfato. Sin embargo, en humanos la afinidad de MT1 por la unión con melatonina marcada con ^{125}I ($K_d=20\text{-}40\text{ pmol/L}$) es mayor que la de MT2 ($K_d=160\text{ pmol/L}$) [381].

El receptor de membrana MT1 ha sido descrito en hígado y en diferentes tejidos incluyendo al sistema inmune, sistema nervioso central (hipocampo, sustancia negra, cerebelo, etc), vesícula biliar, mama, ovario, piel, testículo, coronarias o aorta[310, 317, 382-388]. En esta Tesis Doctoral hemos encontrado un importante incremento en la expresión tanto proteica como del mRNA de MT1 tras el tratamiento con melatonina, resultados que parecen guardar relación con el efecto antitumoral de esta hormona en las células HepG2 (Figuras 29 y 30). Otros autores han encontrado también incrementos en la expresión de MT1 y MT2 (en aquellos tejidos de co-expresan ambos receptores) tras la administración de melatonina [389]. Efectos similares de otros ligados o agonistas en la sobre-expresión de receptores de membrana unidos a proteína G, parecidos a MT1, se han atribuido a un incremento en la transcripción y traducción génica y/o en la estabilidad proteica de dichos receptores [390-393]. Por otro lado, se ha descrito que, en tumores de mama y de algunos otros tejidos, el efecto antitumoral de la melatonina se relaciona con la

sobre-expresión de MT1 [381, 394]. Incluso en pacientes con tumores óseos, que suelen presentar niveles de melatonina especialmente bajos, la sobre-expresión de MT1 puede reducir la progresión tumoral cuando se administra melatonina exógena [395]. La relación entre la activación de MT1 y el efecto antitumoral de la melatonina podría estar relacionada con la activación de la vía MAPK, tal como pondremos de manifiesto en el apartado siguiente de la discusión de esta Tesis Doctoral centrada en MT1.

Además, parte del efecto antiproliferativo de la melatonina en tumores de endometrio podría estar mediado por MT2 [396]. Sin embargo, MT2 parece expresarse de forma más restrictiva que MT1, apareciendo sobretodo en cerebro, sistema inmune, corazón, aorta, pulmón, duodeno, adipocitos, miometrio o en células granulosas, pero sin presencia en el tejido hepático humano [381]. En nuestro trabajo analizamos la expresión de MT2 en las células HepG2, tanto tratadas con melatonina como sin melatonina, y no hallamos en ningún momento expresión proteica ni del mRNA (datos no mostrados), lo que confirma la ausencia de dicho receptor en este tipo celular. Está claro que el efecto antitumoral de la melatonina, al menos en las células HepG2, no está relacionado con mecanismos dependientes de MT2.

En cuanto a MT3, como ya hemos indicado anteriormente en el capítulo de Revisión Bibliográfica, existen datos sólidos que

indican que se trata de un receptor citosólico que se ha identificado con la proteína NQO2, expresado en hígado, cerebro, corazón, pulmón, músculo, tejido adiposo, etc [305, 397]. En nuestros experimentos, hemos observado un incremento en la expresión proteica de MT3 (Figura 31), pero sin modificaciones significativas en la expresión de su mRNA (Figura 32) tras la administración de la melatonina, lo que potencialmente parece indicar una menor contribución de dicho receptor al efecto antitumoral de este indol que la del receptor MT1. Posiblemente, la administración de la hormona contribuya a una estabilización de la proteína NQO2 en las células HepG2. Otros investigadores han descrito incrementos en la expresión proteica de NQO2 durante la inhibición de la proliferación tumoral en células derivadas de melanoma tras la administración de antioxidantes como el resveratrol, pero los mecanismos aún no han sido elucidados [398].

El receptor ROR α forma parte de la subfamilia de receptores nucleares RZR/ROR capaces de unirse a la melatonina. Dicho receptor se expresa en hígado, cerebro, piel, testículo y corazón [399]. Además, diversos autores han indicado que podría estar implicado en la fisiología y patología hepática controlando la transcripción génica de diversos genes como por ejemplo p21 [400-402]. De forma similar a lo que ocurría con MT3, en nuestro trabajo la administración de melatonina solo fue capaz de inducir incrementos estadísticamente significativos en la expresión proteica de ROR α pero no a nivel de su mRNA (Figura 33 y 34

respectivamente), lo que podría indicar un efecto de estabilización por parte de la melatonina sobre la proteína ROR α . Incrementos en la expresión de ROR α , tras la administración de melatonina, han sido también descritos en estudios *in vitro* usando células derivadas de melanoma humano o de tumores de pituitaria secretores de prolactina [398, 403]. Curiosamente, p21, regulador negativo del ciclo celular, es uno de los genes cuya expresión parece ser controlada también por ROR α [404]. En nuestro estudio, como ya hemos indicado anteriormente, la parada del ciclo celular tras la administración de melatonina parece relacionada con la sobre-expresión de p53, lo que va a inducir la expresión de p21 y la parada del ciclo; pero, cabe indicar aquí, que la sobre-expresión de p21 también podría estar relacionada, al menos en parte, con la estabilización de la proteína de ROR α observada tras la incubación de las células HepG2 con melatonina.

5.6 Efecto de la inhibición del receptor MT1 a los mecanismos antitumorales de la melatonina en células HepG2.

Tras la comprobación de que la melatonina era capaz de incrementar, de forma significativa, la expresión tanto proteica como del mRNA de MT1 en las células HepG2 decidimos

comprobar si la inhibición de dicho receptor podría bloquear el efecto antitumoral de esta hormona.

Para producir la inhibición de MT1 en nuestro trabajo usamos luzindol, un antagonista competitivo contra la unión de la melatonina en MT1 y MT2. Es necesario recordar que MT2 no es expresado en tejido hepático ni fue detectado en las células HepG2 utilizadas en nuestros experimentos.

Se ha descrito que cuando MT1 y MT2 se activan inducen la inhibición en la producción de cAMP por parte de proteínas G [405, 406]. En nuestro experimento pudimos comprobar cómo la administración de melatonina, a la dosis de 2500 μ M en tiempos cortos, era capaz de provocar la reducción en la producción de cAMP, lo que indicaba la activación de la proteína MT1 en esas condiciones. Además, la administración previa de luzindol era capaz de bloquear dicha reducción de la síntesis de cAMP, lo que confirmaba su capacidad para inhibir a MT1 en nuestro modelo experimental (Figura 36).

Tras la inhibición de MT1, con la preincubación de luzindol, pudimos observar cómo se producía un bloqueo del efecto de la melatonina sobre la reducción en la viabilidad celular, de forma que detectamos un incremento estadísticamente significativo en la proliferación de los hepatocitos tumorales (Figura 35).

Aunque los mecanismos precisos a través de los cuales la melatonina reduce la proliferación de las células tumorales no son bien conocidos, se ha sugerido su capacidad para modular a diversos miembros de la vía MAPK [373, 407, 408]. En la presente Tesis Doctoral hemos encontrado un incremento significativo en la activación por fosforilación de ERK, JNK y p38 tras la administración de melatonina. La pre-incubación con el inhibidor de MT1 luzindol sólo bloqueó de forma efectiva la fosforilación de ERK, pero no fue capaz de reducir significativamente la activación de JNK y p38. Estos resultados parecen indicar sugerir una posible conexión entre la activación de MT1 y de ERK tras la administración de melatonina en las células HepG2. El análisis de la literatura científica disponible indica que en células modificadas genéticamente para expresar sólo MT1, tal como ocurre en nuestros hepatocitos, la melatonina parece estimular más específicamente a ERK; sin embargo, en las mismas células no modificadas, expresando tanto MT1 y MT2, el indol tenía el efecto contrario reduciendo la fosforilación de ERK [409]. Nuestros resultados están de acuerdo con otros trabajos que describen la activación de ERK, mediante un mecanismo dependiente de MT1, tras la administración de melatonina en células derivadas de tumores ováricos de hámster de la línea CHO [410]. También se ha descrito la activación de ERK tras la administración de otras sustancias antitumorales como el cisplatino en células H22 derivadas de HCC [376]. Incluso, se ha indicado que la parada del ciclo celular en G₂/M, por parte de paclitaxel, depende de la

activación de ERK en células de tumores mamarios de la línea MCF7 [377].

Por todo lo anterior, en nuestros experimentos parece que el receptor MT1 parece jugar un importante papel, a través de ERK, en el efecto antitumoral de la melatonina observado en las células HepG2 derivadas de HCC. No obstante, son necesarios más experimentos para comprobar los mecanismos concretos involucrados y la conexión con el resto de receptores de melatonina existentes en dichos hepatocitos.

6.- CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRIMERA:

El tratamiento con melatonina induce en hepatocitos HepG2 derivados de HCC humano una reducción en la viabilidad celular de forma dosis y tiempo dependiente.

CONCLUSIÓN SEGUNDA:

El análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo muestra un efecto citostático de la melatonina en las células HepG2, con parada del ciclo celular en G₂/M. La expresión de p21 podría jugar un papel importante en dicho efecto por mecanismos dependientes de p53 y posiblemente de ERK.

CONCLUSIÓN TERCERA:

La reducción en la viabilidad inducida por la melatonina se relaciona también con un incremento en la muerte celular por apoptosis, principalmente mediante mecanismos dependientes de la vía intrínseca, con incrementos en la expresión de la proteína proapoptótica Bax y liberación de citocromo C desde la mitocondria.

CONCLUSIÓN CUARTA:

La administración de melatonina induce un incremento significativo en la activación de diversos miembros de la familia MAPK como ERK, JNK y p38. Dichos incrementos parecen ser responsables, al menos en parte, del efecto citostático y proapoptótico del indol sobre los hepatocitos tumorales.

CONCLUSIÓN QUINTA:

El efecto de la melatonina sobre los hepatocitos tumorales parece relacionado con la inducción en la expresión de su receptor de membrana MT1, que se acompaña con la estabilización proteica del receptor citosólico MT3 y nuclear ROR α . La inhibición de MT1, mediante la pre-incubación con luzindol, bloquea de forma significativa la capacidad antitumoral de la melatonina, demostrando la importancia de dicho receptor.

CONCLUSIÓN FINAL:

La administración de melatonina a dosis farmacológicas podría tener un potencial interés, al menos como sustancia coadyuvante, en el tratamiento del HCC. No obstante, es necesario llevar a cabo más experimentos, tanto en *in vitro* como en modelos

animales para mejorar el conocimiento de los mecanismos implicados en el efecto antitumoral de este indol.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- [1] El-Serag H B, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132:2557-2576.
- [2] El-Serag H B. Epidemiology and Surveillance of Hepatocellular Carcinoma. *Oncology News* 2011; 6:171-173.
- [3] El-Serag H B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2012; 142:1264-1273.e1.
- [4] Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. 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* 2006; 24:2137-2150.
- [5] Aravalli R N, Steer CJ, Cressman EN. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48:2047-2063.
- [6] Cabibbo G, Maida M, Genco C, Antonucci M, Camma C. Causes of and prevention strategies for hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol* 2012; 39:374-383.
- [7] Kew M C. Prevention of hepatocellular carcinoma. *Ann Hepatol* 2010; 9:120-132.
- [8] Leonardi G C, Candido S, Cervello M, Nicolosi D, Raiti F, Travali S et al. The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma (review). *Int J Oncol* 2012; 40:1733-1747.
- [9] But D Y, Lai CL, Yuen MF. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14:1652-1656.
- [10] Donato F, Boffetta P, Puoti M. A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1998; 75:347-354.
- [11] Brechot C, Jaffredo F, Lagorce D, Gerken G, Meyer zum Buschenfelde K, Papakonstantinou A et al. Impact of HBV, HCV and GBV-C/HGV on hepatocellular carcinomas in Europe: results of a European concerted action. *J Hepatol* 1998; 29:173-183.
- [12] Di Bisceglie A M. Hepatitis C. *Lancet* 1998; 351:351-355.
- [13] Zhang J Y, Dai M, Wang X, Lu WQ, Li DS, Zhang MX et al. A case-control study of hepatitis B and C virus infection as risk factors for hepatocellular carcinoma in Henan, China. *Int J Epidemiol* 1998; 27:574-578.
- [14] Sun C A, Farzadegan H, You SL, Lu SN, Wu MH, Wolfe L et al. Mutual confounding and interactive effects between hepatitis C and hepatitis B viral infections in hepatocellular carcinogenesis: a population-based case-control study in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5:173-178.

- [15] Tsai J F, Jeng JE, Ho MS, Chang WY, Hsieh MY, Lin ZY et al. Effect of hepatitis C and B virus infection on risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Br J Cancer* 1997; 76:968-974.
- [16] Brechot C, Kremsdorf D, Soussan P, Pineau P, Dejean A, Paterlini-Brechot P et al. Hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC): molecular mechanisms and novel paradigms. *Pathol Biol (Paris)* 2010; 58:278-287.
- [17] Grivennikov S I, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140:883-899.
- [18] Nakagawa H, Maeda S. Molecular mechanisms of liver injury and hepatocarcinogenesis: focusing on the role of stress-activated MAPK. *Patholog Res Int* 2012; 2012:172894.
- [19] Morgan T R, Mandayam S, Jamal MM. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127:S87-96.
- [20] Kowdley K V. Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127:S79-86.
- [21] Cuadrado A, Orive A, Garcia-Suarez C, Dominguez A, Fernandez-Escalante JC, Crespo J et al. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatocellular carcinoma. *Obes Surg* 2005; 15:442-446.
- [22] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 97. 1,3-butadiene, ethylene oxide and vinyl halides (vinyl fluoride, vinyl chloride and vinyl bromide). *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2008; 97:3-471.
- [23] Dubois G, Braillon A. Hepatocellular carcinoma: again, tobacco is the first enemy. *Int J Epidemiol* 2010; 39:1399.
- [24] Liu Y, Chang CC, Marsh GM, Wu F. Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: Systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2012.
- [25] Wang P, Kang D, Cao W, Wang Y, Liu Z. Diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab Res Rev* 2012; 28:109-122.
- [26] Sun B, Karin M. Obesity, inflammation, and liver cancer. *J Hepatol* 2012; 56:704-713.
- [27] Maheshwari S, Sarraj A, Kramer J, El-Serag HB. Oral contraception and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2007; 47:506-513.
- [28] Wai P Y, Kuo PC. Intersecting pathways in inflammation and cancer: Hepatocellular carcinoma as a paradigm. *World J Clin Oncol* 2012; 3:15-23.

- [29] Budhu A, Wang XW. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *J Leukoc Biol* 2006; 80:1197-1213.
- [30] Levrero M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* 2006; 25:3834-3847.
- [31] Elsharkawy A M, Mann DA. Nuclear factor-kappaB and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis. *Hepatology* 2007; 46:590-597.
- [32] Villa E, Fattovich G. No inflammation? No cancer! Clear HBV early and live happily. *J Hepatol* 2010; 52:768-770.
- [33] Moradpour D, Blum HE. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17:477-483.
- [34] Thorgeirsson S S, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31:339-346.
- [35] Feitelson M A, Sun B, Satiroglu Tufan NL, Liu J, Pan J, Lian Z. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21:2593-2604.
- [36] French S W. Molecular events in hepatic preneoplasia: a review. *Exp Mol Pathol* 2010; 88:219-224.
- [37] Raidl M, Pirker C, Schulte-Hermann R, Aubele M, Kandioler-Eckersberger D, Wrba F et al. Multiple chromosomal abnormalities in human liver (pre)neoplasia. *J Hepatol* 2004; 40:660-668.
- [38] Roncalli M. Hepatocellular nodules in cirrhosis: focus on diagnostic criteria on liver biopsy. A Western experience. *Liver Transpl* 2004; 10:S9-15.
- [39] International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. The International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology* 2009; 49:658-664.
- [40] Desmet V J. East-West pathology agreement on precancerous liver lesions and early hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49:355-357.
- [41] Chen X, Cheung ST, So S, Fan ST, Barry C, Higgins J et al. Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol Biol Cell* 2002; 13:1929-1939.
- [42] Delpuech O, Trabut JB, Carnot F, Feuillard J, Brechot C, Kremsdorf D. Identification, using cDNA macroarray analysis, of distinct gene expression profiles associated with pathological and virological features of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2002; 21:2926-2937.
- [43] Goldenberg D, Ayesh S, Schneider T, Pappo O, Jurim O, Eid A et al. Analysis of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma using cDNA arrays. *Mol Carcinog* 2002; 33:113-124.
- [44] Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y et al. 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* 2001; 61:2129-2137.
- [45] Shirota Y, Kaneko S, Honda M, Kawai HF, Kobayashi K. Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. *Hepatology* 2001; 33:832-840.
- [46] Xu L, Hui L, Wang S, Gong J, Jin Y, Wang Y et al. Expression profiling suggested a regulatory role of liver-enriched transcription factors in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61:3176-3181.
- [47] Xu X R, Huang J, Xu ZG, Qian BZ, Zhu ZD, Yan Q et al. 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* 2001; 98:15089-15094.
- [48] Farazi P A, Glickman J, Jiang S, Yu A, Rudolph KL, DePinho RA. Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63:5021-5027.
- [49] Thorgeirsson S S, Grisham JW. Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. *Hepatology* 2006; 43:2-8.
- [50] Braconi C, Patel T. MicroRNA expression profiling: a molecular tool for defining the phenotype of hepatocellular tumors. *Hepatology* 2008; 47:1807-1809.
- [51] Jones P A, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3:415-428.
- [52] Jones P A, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128:683-692.
- [53] Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007; 447:396-398.
- [54] Pang A, Ng IO, Fan ST, Kwong YL. Clinicopathologic significance of genetic alterations in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 146:8-15.
- [55] Liew C T, Li HM, Lo KW, Leow CK, Chan JY, Hin LY et al. High frequency of p16INK4A gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1999; 18:789-795.
- [56] Kanai Y, Ushijima S, Hui AM, Ochiai A, Tsuda H, Sakamoto M et al. The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer* 1997; 71:355-359.
- [57] Schagdarsurengin U, Wilkens L, Steinemann D, Flemming P, Kreipe HH, Pfeifer GP et al. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2003; 22:1866-1871.
- [58] Zhong S, Tang MW, Yeo W, Liu C, Lo YM, Johnson PJ. Silencing of GSTP1 gene by CpG island DNA hypermethylation in HBV-associated hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res* 2002; 8:1087-1092.

- [59] Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS, Jackson P, Grooman JD, Manning JE et al. 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* 2001; 28:29-35.
- [60] Shih Y L, Shyu RY, Hsieh CB, Lai HC, Liu KY, Chu TY et al. Promoter methylation of the secreted frizzled-related protein 1 gene SFRP1 is frequent in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2006; 107:579-590.
- [61] Wang L, Wang WL, Zhang Y, Guo SP, Zhang J, Li QL. Epigenetic and genetic alterations of PTEN in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2007; 37:389-396.
- [62] Choi M S, Shim YH, Hwa JY, Lee SK, Ro JY, Kim JS et al. Expression of DNA methyltransferases in multistep hepatocarcinogenesis. *Hum Pathol* 2003; 34:11-17.
- [63] Di Gioia S, Bianchi P, Destro A, Grizzi F, Malesci A, Laghi L et al. Quantitative evaluation of RASSF1A methylation in the non-lesional, regenerative and neoplastic liver. *BMC Cancer* 2006; 6:89.
- [64] Kondo Y, Shen L, Suzuki S, Kurokawa T, Masuko K, Tanaka Y et al. Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res* 2007; 37:974-983.
- [65] Oh B K, Kim H, Park HJ, Shim YH, Choi J, Park C et al. DNA methyltransferase expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological correlation. *Int J Mol Med* 2007; 20:65-73.
- [66] Lee S, Lee HJ, Kim JH, Lee HS, Jang JJ, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation along multistep hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol* 2003; 163:1371-1378.
- [67] Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 1998; 19:219-220.
- [68] Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99:247-257.
- [69] Lin C H, Hsieh SY, Sheen IS, Lee WC, Chen TC, Shyu WC et al. Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* 2001; 61:4238-4243.
- [70] Saito Y, Kanai Y, Nakagawa T, Sakamoto M, Saito H, Ishii H et al. 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* 2003; 105:527-532.
- [71] Xiao J C, Ruck P, Adam A, Wang TX, Kaiserling E. Small epithelial cells in human liver cirrhosis exhibit features of hepatic stem-like cells:

- immunohistochemical, electron microscopic and immunoelectron microscopic findings. *Histopathology* 2003; 42:141-149.
- [72] Libbrecht L. Hepatic progenitor cells in human liver tumor development. *World J Gastroenterol* 2006; 12:6261-6265.
- [73] Mishra L, Banker T, Murray J, Byers S, Thenappan A, He AR et al. Liver stem cells and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49:318-329.
- [74] Sun Z, Zhang X, Locke JE, Zheng Q, Tachibana S, Diehl AM et al. Recruitment of host progenitor cells in rat liver transplants. *Hepatology* 2009; 49:587-597.
- [75] Linares A, Rodríguez M, Rodrigo L. Algoritmo diagnóstico y terapéutico del carcinoma hepatocelular. *Oncología* 2004; 27:223-229.
- [76] Collier J, Sherman M. Screening for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998; 27:273-278.
- [77] Liaw Y F, Sung JJ, Chow WC, Farrell G, Lee CZ, Yuen H et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004; 351:1521-1531.
- [78] Chang M H, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS et al. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med* 1997; 336:1855-1859.
- [79] Bruix J, Sherman M, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011; 53:1020-1022.
- [80] Llovet J M, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362:1907-1917.
- [81] Davila J A, Morgan RO, Richardson PA, Du XL, McGlynn KA, El-Serag HB. Use of surveillance for hepatocellular carcinoma among patients with cirrhosis in the United States. *Hepatology* 2010; 52:132-141.
- [82] Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. En: Child CG, editor. *The liver and portal hypertension*. Philadelphia, USA: Saunders; 1964. p. 50-64.
- [83] Pugh R N, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973; 60:646-649.
- [84] Llovet J M, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999; 19:329-338.
- [85] Forner A, Reig ME, de Lope CR, Bruix J. Current strategy for staging and treatment: the BCLC update and future prospects. *Semin Liver Dis* 2010; 30:61-74.

- [86] Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H et al. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 1985; 56:918-928.
- [87] The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients. *Hepatology* 1998; 28:751-755.
- [88] The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) Investigators. Prospective validation of the CLIP score: a new prognostic system for patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; 31:840-845.
- [89] Yao F Y, Ferrell L, Bass NM, Watson JJ, Bacchetti P, Venook A et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology* 2001; 33:1394-1403.
- [90] Izumi R, Shimizu K, Ii T, Yagi M, Matsui O, Nonomura A et al. Prognostic factors of hepatocellular carcinoma in patients undergoing hepatic resection. *Gastroenterology* 1994; 106:720-727.
- [91] Villanueva A, Llovet JM. Targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2011; 140:1410-1426.
- [92] Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996; 334:693-699.
- [93] Llovet J M, Schwartz M, Mazzaferro V. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005; 25:181-200.
- [94] Lencioni R. Loco-regional treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010; 52:762-773.
- [95] Llovet J M, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology* 2003; 37:429-442.
- [96] Llovet J M, Real MI, Montana X, Planas R, Coll S, Aponte J et al. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 359:1734-1739.
- [97] Lammer J, Malagari K, Vogl T, Pilleul F, Denys A, Watkinson A et al. Prospective randomized study of doxorubicin-eluting-bead embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: results of the PRECISION V study. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2010; 33:41-52.
- [98] Varela M, Real MI, Burrel M, Forner A, Sala M, Brunet M et al. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *J Hepatol* 2007; 46:474-481.

- [99] Salem R, Lewandowski RJ, Kulik L, Wang E, Riaz A, Ryu RK et al. Radioembolization results in longer time-to-progression and reduced toxicity compared with chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2011; 140:497-507.e2.
- [100] Llovet J M, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359:378-390.
- [101] Galle P R. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma - We have won a battle not the war. *J Hepatol* 2008; 49:871-873.
- [102] Mauriz J L, Gonzalez-Gallego J. Antiangiogenic drugs: current knowledge and new approaches to cancer therapy. *J Pharm Sci* 2008; 97:4129-4154.
- [103] Raoul J L, Bruix J, Greten TF, Sherman M, Mazzaferro V, Hilgard P et al. Relationship between baseline hepatic status and outcome, and effect of sorafenib on liver function: SHARP trial subanalyses. *J Hepatol* 2012; 56:1080-1088.
- [104] Abou-Alfa G K, Schwartz L, Ricci S, Amadori D, Santoro A, Figer A et al. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24:4293-4300.
- [105] Frenette C, Gish R. Targeted systemic therapies for hepatocellular carcinoma: clinical perspectives, challenges and implications. *World J Gastroenterol* 2012; 18:498-506.
- [106] Kudo M. Future treatment option for hepatocellular carcinoma: a focus on brivanib. *Dig Dis* 2011; 29:316-320.
- [107] Malumbres M, Hunt SL, Sotillo R, Martin J, Odajima J, Martin A et al. Driving the cell cycle to cancer. *Adv Exp Med Biol* 2003; 532:1-11.
- [108] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:153-166.
- [109] Morga D. *The cell cycle: principles of control*. London: New Science Press; 2007.
- [110] Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* 2009; 28:2925-2939.
- [111] van den Heuvel S. Cell-cycle regulation. *WormBook* 2005:1-16.
- [112] Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 2005; 30:630-641.
- [113] Chen H H, Wang YC, Fann MJ. Identification and characterization of the CDK12/cyclin L1 complex involved in alternative splicing regulation. *Mol Cell Biol* 2006; 26:2736-2745.
- [114] Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1:222-231.

- [115] Harbour J W, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 1999; 98:859-869.
- [116] Lundberg A S, Weinberg RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* 1998; 18:753-761.
- [117] Hochegger H, Takeda S, Hunt T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:910-916.
- [118] Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 2008; 14:159-169.
- [119] Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1602:73-87.
- [120] Sherr C J, Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 2004; 18:2699-2711.
- [121] Borriello A, Bencivenga D, Criscuolo M, Caldarelli I, Cucciolla V, Tramontano A et al. Targeting p27Kip1 protein: its relevance in the therapy of human cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2011; 15:677-693.
- [122] Child E S, Mann DJ. The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle* 2006; 5:1313-1319.
- [123] Rodríguez-Vilarrupla A, Jaumot M, Abella N, Canela N, Brun S, Diaz C et al. 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* 2005; 25:7364-7374.
- [124] Zhou B P, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 2001; 3:245-252.
- [125] Luo Y, Hurwitz J, Massague J. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* 1995; 375:159-161.
- [126] Watanabe H, Pan ZQ, Schreiber-Agus N, DePinho RA, Hurwitz J, Xiong Y. 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* 1998; 95:1392-1397.
- [127] Nallamshetty S, Crook M, Boehm M, Yoshimoto T, Olive M, Nabel EG. The cell cycle regulator p27Kip1 interacts with MCM7, a DNA replication licensing factor, to inhibit initiation of DNA replication. *FEBS Lett* 2005; 579:6529-6536.
- [128] Sherr C J, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002; 2:103-112.

- [129] Hatakeyama M, Weinberg RA. The role of RB in cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 1995; 1:9-19.
- [130] Roussel M F. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 1999; 18:5311-5317.
- [131] Pavletich N P. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 1999; 287:821-828.
- [132] Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:667-677.
- [133] Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:8292-8297.
- [134] Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 1998; 92:713-723.
- [135] Weber J D, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1999; 1:20-26.
- [136] Zhang Y, Xiong Y. Control of p53 ubiquitination and nuclear export by MDM2 and ARF. *Cell Growth Differ* 2001; 12:175-186.
- [137] Tao W, Levine AJ. P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:6937-6941.
- [138] Polager S, Ginsberg D. p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:738-748.
- [139] Yao G, Lee TJ, Mori S, Nevins JR, You L. A bistable Rb-E2F switch underlies the restriction point. *Nat Cell Biol* 2008; 10:476-482.
- [140] Trimarchi J M, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:11-20.
- [141] Scambia G, Lovergine S, Masciullo V. RB family members as predictive and prognostic factors in human cancer. *Oncogene* 2006; 25:5302-5308.
- [142] Sanseverino F, Torricelli M, Petraglia F, Giordano A. Role of the retinoblastoma family in gynecological cancer. *Cancer Biol Ther* 2003; 2:636-641.
- [143] Smith E J, Leone G, Nevins JR. Distinct mechanisms control the accumulation of the Rb-related p107 and p130 proteins during cell growth. *Cell Growth Differ* 1998; 9:297-303.
- [144] Tedesco D, Lukas J, Reed SI. The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF(Skp2). *Genes Dev* 2002; 16:2946-2957.

- [145] Cobrinik D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 2005; 24:2796-2809.
- [146] Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene* 2006; 25:5220-5227.
- [147] Sherr C J, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13:1501-1512.
- [148] Kaldis P, Solomon MJ. Analysis of CAK activities from human cells. *Eur J Biochem* 2000; 267:4213-4221.
- [149] Blomberg I, Hoffmann I. 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* 1999; 19:6183-6194.
- [150] Boutros R, Dozier C, Ducommun B. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18:185-191.
- [151] Kellogg D R. Wee1-dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division. *J Cell Sci* 2003; 116:4883-4890.
- [152] Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 1983; 33:389-396.
- [153] Murray A. Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell* 1995; 81:149-152.
- [154] Hershko A. Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9:788-799.
- [155] Nakayama K I, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:369-381.
- [156] Harper J W, Burton JL, Solomon MJ. The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev* 2002; 16:2179-2206.
- [157] Castro A, Bernis C, Vigneron S, Labbe JC, Lorca T. The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene* 2005; 24:314-325.
- [158] Kerr J F, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-257.
- [159] Kaufmann S H, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 2001; 11:526-534.
- [160] Taylor R C, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:231-241.
- [161] Kerr J F. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002; 181-182:471-474.

- [162] Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008; 151:10-27.
- [163] Creagh E M, Conroy H, Martin SJ. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev* 2003; 193:10-21.
- [164] Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene* 2003; 22:8543-8567.
- [165] Olsson M, Zhivotovsky B. Caspases and cancer. *Cell Death Differ* 2011; 18:1441-1449.
- [166] Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006; 25:4798-4811.
- [167] Falschlehner C, Ganten TM, Koschny R, Schaefer U, Walczak H. TRAIL and other TRAIL receptor agonists as novel cancer therapeutics. *Adv Exp Med Biol* 2009; 647:195-206.
- [168] Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:420-430.
- [169] Gonzalez F, Ashkenazi A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* 2010; 29:4752-4765.
- [170] Kischkel F C, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995; 14:5579-5588.
- [171] Green D R, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004; 305:626-629.
- [172] Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21:871-877.
- [173] Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gorp M, van Loo G, Vandenamee P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004; 23:2861-2874.
- [174] Kulikov A V, Shilov ES, Mufazalov IA, Gogvadze V, Nedospasov SA, Zhivotovsky B. Cytochrome c: the Achilles' heel in apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69:1787-1797.
- [175] Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 2000; 406:855-862.
- [176] Bratton S B, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES et al. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J* 2001; 20:998-1009.
- [177] Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102:33-42.

- [178] Verhagen A M, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; 102:43-53.
- [179] Verhagen A M, Kratina TK, Hawkins CJ, Silke J, Ekert PG, Vaux DL. Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs. *Cell Death Differ* 2007; 14:348-357.
- [180] Jendrossek V. The intrinsic apoptosis pathways as a target in anticancer therapy. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13:1426-1438.
- [181] Youle R J, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:47-59.
- [182] McDonnell T J, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP et al. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989; 57:79-88.
- [183] Strasser A, Harris AW, Cory S. bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* 1991; 67:889-899.
- [184] Sentman C L, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. Bcl-2 Inhibits Multiple Forms of Apoptosis but Not Negative Selection in Thymocytes. *Cell* 1991; 67:879-888.
- [185] Ogilvy S, Metcalf D, Print CG, Bath ML, Harris AW, Adams JM. Constitutive Bcl-2 expression throughout the hematopoietic compartment affects multiple lineages and enhances progenitor cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:14943-14948.
- [186] Cheng E H, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T et al. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 2001; 8:705-711.
- [187] Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 2000; 6:1389-1399.
- [188] Wei M C, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; 292:727-730.
- [189] Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH, Youle RJ. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol* 2001; 153:1265-1276.
- [190] Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 2001; 276:11615-11623.

- [191] Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, Dong Z, Venkatachalam MA, Saikumar P. Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 2001; 276:18361-18374.
- [192] Wei M C, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M et al. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 2000; 14:2060-2071.
- [193] Griffiths G J, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM et al. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 1999; 144:903-914.
- [194] Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13:1899-1911.
- [195] Hartman M L, Czyz M. Pro-apoptotic Activity of BH3-only Proteins and BH3 Mimetics: from Theory to Potential Cancer Therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2012; 12:966-981.
- [196] Zong W X, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 2001; 15:1481-1486.
- [197] Strasser A, Puthalakath H, Bouillet P, Huang DC, O'Connor L, O'Reilly LA et al. The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:541-548.
- [198] Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE et al. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 2001; 293:1829-1832.
- [199] Guicciardi M E, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* 2005; 54:1024-1033.
- [200] Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D et al. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion?. *Nat Med* 1996; 2:1361-1366.
- [201] Fukuzawa K, Takahashi K, Furuta K, Tagaya T, Ishikawa T, Wada K et al. Expression of fas/fas ligand (fasL) and its involvement in infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma (HCC). *J Gastroenterol* 2001; 36:681-688.
- [202] Muller M, Strand S, Hug H, Heinemann EM, Walczak H, Hofmann WJ et al. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest* 1997; 99:403-413.

- [203] Takehara T, Liu X, Fujimoto J, Friedman SL, Takahashi H. Expression and role of Bcl-xL in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2001; 34:55-61.
- [204] Anderson S C, Johnson DE, Harris MP, Engler H, Hancock W, Huang WM et al. P53 Gene Therapy in a Rat Model of Hepatocellular Carcinoma: Intra-Arterial Delivery of a Recombinant Adenovirus. *Clin Cancer Res* 1998; 4:1649-1659.
- [205] Bao J J, Zhang WW, Kuo MT. Adenoviral delivery of recombinant DNA into transgenic mice bearing hepatocellular carcinomas. *Hum Gene Ther* 1996; 7:355-365.
- [206] Ye C P, Qiu CZ, Huang ZX, Su QC, Zhuang W, Wu RL et al. Relationship between survivin expression and recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13:6264-6268.
- [207] Sun Y, Lin R, Dai J, Jin D, Wang SQ. Suppression of tumor growth using antisense oligonucleotide against survivin in an orthotopic transplant model of human hepatocellular carcinoma in nude mice. *Oligonucleotides* 2006; 16:365-374.
- [208] Feng G, Kaplowitz N. Colchicine protects mice from the lethal effect of an agonistic anti-Fas antibody. *J Clin Invest* 2000; 105:329-339.
- [209] Shin E C, Seong YR, Kim CH, Kim H, Ahn YS, Kim K et al. Human hepatocellular carcinoma cells resist to TRAIL-induced apoptosis, and the resistance is abolished by cisplatin. *Exp Mol Med* 2002; 34:114-122.
- [210] Bai J, Odin JA. Apoptosis and the liver: relation to autoimmunity and related conditions. *Autoimmun Rev* 2003; 2:36-42.
- [211] Schulze-Bergkamen H, Fleischer B, Schuchmann M, Weber A, Weinmann A, Krammer PH et al. Suppression of Mcl-1 via RNA interference sensitizes human hepatocellular carcinoma cells towards apoptosis induction. *BMC Cancer* 2006; 6:232.
- [212] Chen X L, Cao LQ, She MR, Wang Q, Huang XH, Fu XH. Gli-1 siRNA induced apoptosis in Huh7 cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14:582-589.
- [213] Jacob D, Schumacher G, Bahra M, Davis J, Zhu HB, Zhang LD et al. Fiber-modified adenoviral vector expressing the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene from the human telomerase reverse transcriptase promoter induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11:2552-2556.
- [214] Yamaguchi Y, Shiraki K, Fuke H, Inoue T, Miyashita K, Yamanaka Y et al. Adenovirus-mediated transfection of caspase-8 sensitizes hepatocellular carcinoma to TRAIL- and chemotherapeutic agent-induced cell death. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763:844-853.

- [215] Shiba H, Misawa T, Iida T, Okamoto T, Futagawa Y, Sakurai M et al. Adenovirus vector-mediated gene therapy using iodized oil esters for hepatocellular carcinoma in rats. *Anticancer Res* 2008; 28:51-53.
- [216] Wortzel I, Seger R. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer* 2011; 2:195-209.
- [217] Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011; 75:50-83.
- [218] Keshet Y, Seger R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* 2010; 661:3-38.
- [219] Gaestel M. Specificity of signaling from MAPKs to MAPKAPKs: kinases' tango nuevo. *Front Biosci* 2008; 13:6050-6059.
- [220] Roux P P, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68:320-344.
- [221] Persico A, Cervigni RI, Barretta ML, Corda D, Colanzi A. Golgi partitioning controls mitotic entry through Aurora-A kinase. *Mol Biol Cell* 2010; 21:3708-3721.
- [222] Cooper J A, Bowen-Pope DF, Raines E, Ross R, Hunter T. Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins. *Cell* 1982; 31:263-273.
- [223] Kazlauskas A, Cooper JA. Protein kinase C mediates platelet-derived growth factor-induced tyrosine phosphorylation of p42. *J Cell Biol* 1988; 106:1395-1402.
- [224] Ray L B, Sturgill TW. Characterization of insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase. Rapid isolation and stabilization of a novel serine/threonine kinase from 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 1988; 263:12721-12727.
- [225] Boulton T G, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J et al. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 1990; 249:64-67.
- [226] Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 2007; 26:3100-3112.
- [227] Shaul Y D, Seger R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773:1213-1226.
- [228] Chen R H, Sarnecki C, Blenis J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 1992; 12:915-927.
- [229] Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A, Pouyssegur J. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk

- and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 122:1079-1088.
- [230] Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 2007; 26:3227-3239.
- [231] Gille H, Kortenjann M, Thomae O, Moomaw C, Slaughter C, Cobb MH et al. ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J* 1995; 14:951-962.
- [232] Murphy L O, Smith S, Chen RH, Fingar DC, Blenis J. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol* 2002; 4:556-564.
- [233] Whitmarsh A J, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med (Berl)* 1996; 74:589-607.
- [234] Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001; 20:2390-2400.
- [235] Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 1993; 7:2135-2148.
- [236] Kyriakis J M, Avruch J. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem* 1990; 265:17355-17363.
- [237] Bode A M, Dong Z. The functional contrariety of JNK. *Mol Carcinog* 2007; 46:591-598.
- [238] Bogoyevitch M A, Ngoei KR, Zhao TT, Yeap YY, Ng DC. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804:463-475.
- [239] Lee C W, Nam JS, Park YK, Choi HK, Lee JH, Kim NH et al. Lysophosphatidic acid stimulates CREB through mitogen- and stress-activated protein kinase-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305:455-461.
- [240] Kyriakis J M, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81:807-869.
- [241] Wagner E F, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:537-549.
- [242] Mizukami Y, Yoshioka K, Morimoto S, Yoshida K. A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *J Biol Chem* 1997; 272:16657-16662.
- [243] Weston C R, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12:14-21.

- [244] Jaeschke A, Karasarides M, Ventura JJ, Ehrhardt A, Zhang C, Flavell RA et al. JNK2 is a positive regulator of the cJun transcription factor. *Mol Cell* 2006; 23:899-911.
- [245] Sabapathy K, Hochedlinger K, Nam SY, Bauer A, Karin M, Wagner EF. Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol Cell* 2004; 15:713-725.
- [246] Dhanasekaran D N, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 2008; 27:6245-6251.
- [247] Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 2000; 288:870-874.
- [248] Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 1994; 265:808-811.
- [249] Lee J C, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994; 372:739-746.
- [250] Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 1994; 78:1027-1037.
- [251] Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 2010; 429:403-417.
- [252] Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S et al. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 1996; 271:17920-17926.
- [253] Goldsmith Z G, Dhanasekaran DN. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 2007; 26:3122-3142.
- [254] Bagrodia S, Derijard B, Davis RJ, Cerione RA. Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 1995; 270:27995-27998.
- [255] Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 1995; 270:7420-7426.
- [256] Ronkina N, Kotlyarov A, Gaestel M. MK2 and MK3--a pair of isoenzymes?. *Front Biosci* 2008; 13:5511-5521.
- [257] Thornton T M, Rincon M. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci* 2009; 5:44-51.
- [258] Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773:1358-1375.

- [259] English J M, Vanderbilt CA, Xu S, Marcus S, Cobb MH. Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms. *J Biol Chem* 1995; 270:28897-28902.
- [260] Lee J D, Ulevitch RJ, Han J. Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213:715-724.
- [261] Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1995; 270:12665-12669.
- [262] Yan C, Luo H, Lee JD, Abe J, Berk BC. Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains. *J Biol Chem* 2001; 276:10870-10878.
- [263] Yan L, Carr J, Ashby PR, Murry-Tait V, Thompson C, Arthur JS. Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. *BMC Dev Biol* 2003; 3:11.
- [264] Wang X, Finegan KG, Robinson AC, Knowles L, Khosravi-Far R, Hinchliffe KA et al. Activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 downregulates FasL upon osmotic stress. *Cell Death Differ* 2006; 13:2099-2108.
- [265] Xu B E, Stippec S, Lenertz L, Lee BH, Zhang W, Lee YK et al. WNK1 activates ERK5 by an MEKK2/3-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2004; 279:7826-7831.
- [266] Hayashi M, Lee JD. Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *J Mol Med (Berl)* 2004; 82:800-808.
- [267] Han Q, Leng J, Bian D, Mahanivong C, Carpenter KA, Pan ZK et al. Rac1-MKK3-p38-MAPKAPK2 pathway promotes urokinase plasminogen activator mRNA stability in invasive breast cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 277:48379-48385.
- [268] Roberts L R, Gores GJ. Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. *Semin Liver Dis* 2005; 25:212-225.
- [269] Min L, He B, Hui L. Mitogen-activated protein kinases in hepatocellular carcinoma development. *Semin Cancer Biol* 2011; 21:10-20.
- [270] Ito T, Sasaki Y, Wands JR. Overexpression of human insulin receptor substrate 1 induces cellular transformation with activation of mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* 1996; 16:943-951.
- [271] Tanaka S, Mohr L, Schmidt EV, Sugimachi K, Wands JR. Biological effects of human insulin receptor substrate-1 overexpression in hepatocytes. *Hepatology* 1997; 26:598-604.
- [272] Huynh H, Nguyen TT, Chow KH, Tan PH, Soo KC, Tran E. Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterol* 2003; 3:19.

- [273] Ito Y, Sasaki Y, Horimoto M, Wada S, Tanaka Y, Kasahara A et al. Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998; 27:951-958.
- [274] Iyoda K, Sasaki Y, Horimoto M, Toyama T, Yakushijin T, Sakakibara M et al. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003; 97:3017-3026.
- [275] Park M T, Choi JA, Kim MJ, Um HD, Bae S, Kang CM et al. Suppression of extracellular signal-related kinase and activation of p38 MAPK are two critical events leading to caspase-8- and mitochondria-mediated cell death in phytosphingosine-treated human cancer cells. *J Biol Chem* 2003; 278:50624-50634.
- [276] Hui L, Zatloukal K, Scheuch H, Stepniak E, Wagner EF. Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation. *J Clin Invest* 2008; 118:3943-3953.
- [277] Erhardt A, Hassan M, Heintges T, Haussinger D. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. *Virology* 2002; 292:272-284.
- [278] Chang Q, Zhang Y, Beezhold KJ, Bhatia D, Zhao H, Chen J et al. Sustained JNK1 activation is associated with altered histone H3 methylations in human liver cancer. *J Hepatol* 2009; 50:323-333.
- [279] Tanaka Y, Kanai F, Ichimura T, Tateishi K, Asaoka Y, Guleng B et al. The hepatitis B virus X protein enhances AP-1 activation through interaction with Jab1. *Oncogene* 2006; 25:633-642.
- [280] Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H et al. Alteration of intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in transgenic mice expressing hepatitis C virus core protein. *Virology* 2002; 304:415-424.
- [281] Murata M, Matsuzaki K, Yoshida K, Sekimoto G, Tahashi Y, Mori S et al. Hepatitis B virus X protein shifts human hepatic transforming growth factor (TGF)-beta signaling from tumor suppression to oncogenesis in early chronic hepatitis B. *Hepatology* 2009; 49:1203-1217.
- [282] Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M. IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* 2005; 121:977-990.
- [283] Das M, Garlick DS, Greiner DL, Davis RJ. The role of JNK in the development of hepatocellular carcinoma. *Genes Dev* 2011; 25:634-645.
- [284] Sakurai T, He G, Matsuzawa A, Yu GY, Maeda S, Hardiman G et al. Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release

- mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis. *Cancer Cell* 2008; 14:156-165.
- [285] Hui L, Bakiri L, Stepniak E, Wagner EF. P38alpha: a Suppressor of Cell Proliferation and Tumorigenesis. *Cell Cycle* 2007; 6:2429-2433.
- [286] Inokuchi S, Aoyama T, Miura K, Osterreicher CH, Kodama Y, Miyai K et al. Disruption of TAK1 in hepatocytes causes hepatic injury, inflammation, fibrosis, and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:844-849.
- [287] Bettermann K, Vucur M, Haybaeck J, Koppe C, Janssen J, Heymann F et al. TAK1 suppresses a NEMO-dependent but NF-kappaB-independent pathway to liver cancer. *Cancer Cell* 2010; 17:481-496.
- [288] Huynh H, Choo SP, Toh HC, Tai WM, Chung AY, Chow PK et al. Comparing the efficacy of sunitinib with sorafenib in xenograft models of human hepatocellular carcinoma: mechanistic explanation. *Curr Cancer Drug Targets* 2011; 11:944-953.
- [289] Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38:313-316.
- [290] Shida C S, Castrucci AM, Lamy-Freund MT. High melatonin solubility in aqueous medium. *J Pineal Res* 1994; 16:198-201.
- [291] Costa E J, Lopes RH, Lamy-Freund MT. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res* 1995; 19:123-126.
- [292] Okatani Y, Okamoto K, Hayashi K, Wakatsuki A, Tamura S, Sagara Y. Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. *J Pineal Res* 1998; 25:129-134.
- [293] Menendez-Pelaez A, Poeggeler B, Reiter RJ, Barlow-Walden L, Pablos MI, Tan DX. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem* 1993; 53:373-382.
- [294] Zawilska J B, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep* 2009; 61:383-410.
- [295] Hardeland R. Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors* 2009; 35:183-192.
- [296] Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M et al. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J* 2010; 24:3603-3624.
- [297] Chattoraj A, Liu T, Zhang LS, Huang Z, Borjigin J. Melatonin formation in mammals: in vivo perspectives. *Rev Endocr Metab Disord* 2009; 10:237-243.

- [298] Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:2001-2018.
- [299] Maronde E, Pfeffer M, Glass Y, Stehle JH. Transcription factor dynamics in pineal gland and liver of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) adapts to prevailing photoperiod. *J Pineal Res* 2007; 43:16-24.
- [300] Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* 2005; 9:11-24.
- [301] Ambriz-Tututi M, Rocha-Gonzalez HI, Cruz SL, Granados-Soto V. Melatonin: a hormone that modulates pain. *Life Sci* 2009; 84:489-498.
- [302] Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 2005; 27:189-200.
- [303] Lardone P J, Carrillo-Vico A, Molinero P, Rubio A, Guerrero JM. A novel interplay between membrane and nuclear melatonin receptors in human lymphocytes: significance in IL-2 production. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66:516-525.
- [304] Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed Pharmacother* 2006; 60:97-108.
- [305] Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F et al. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 2000; 275:31311-31317.
- [306] Mailliet F, Ferry G, Vella F, Thiam K, Delagrangé P, Boutin JA. Organs from mice deleted for NRH:quinone oxidoreductase 2 are deprived of the melatonin binding site MT3. *FEBS Lett* 2004; 578:116-120.
- [307] Boutin J A, Marcheteau E, Hennig P, Moulharat N, Berger S, Delagrangé P et al. MT3/QR2 melatonin binding site does not use melatonin as a substrate or a co-substrate. *J Pineal Res* 2008; 45:524-531.
- [308] Boutin J A, Saunier C, Guenin SP, Berger S, Moulharat N, Gohier A et al. Studies of the melatonin binding site location onto quinone reductase 2 by directed mutagenesis. *Arch Biochem Biophys* 2008; 477:12-19.
- [309] Sanchez-Barcelo E J, Cos S, Mediavilla D, Martinez-Campa C, Gonzalez A, Alonso-Gonzalez C. Melatonin-estrogen interactions in breast cancer. *J Pineal Res* 2005; 38:217-222.
- [310] Pozo D, Garcia-Maurino S, Guerrero JM, Calvo JR. mRNA expression of nuclear receptor RZR/RORalpha, melatonin membrane receptor MT, and hydroxindole-O-methyltransferase in different populations of human immune cells. *J Pineal Res* 2004; 37:48-54.
- [311] Jetten A M, Ueda E. Retinoid-related orphan receptors (RORs): roles in cell survival, differentiation and disease. *Cell Death Differ* 2002; 9:1167-1171.

- [312] Mauriz J L, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, Gonzalez-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res* 2012 doi: 10.1111/j.1600-079X.2012.01014.x.
- [313] Francis P L, Leone AM, Young IM, Stovell P, Silman RE. Gas chromatographic-mass spectrometric assay for 6-hydroxymelatonin sulfate and 6-hydroxymelatonin glucuronide in urine. *Clin Chem* 1987; 33:453-457.
- [314] Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36:1-9.
- [315] Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005; 27:119-130.
- [316] Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res* 2003; 34:1-10.
- [317] Papazisis K T, Kouretas D, Geromichalos GD, Sivridis E, Tsekrelis OK, Dimitriadis KA et al. Effects of melatonin on proliferation of cancer cell lines. *J Pineal Res* 1998; 25:211-218.
- [318] Petranka J, Baldwin W, Biermann J, Jayadev S, Barrett JC, Murphy E. The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line. *J Pineal Res* 1999; 26:129-136.
- [319] Farriol M, Venereo Y, Orta X, Castellanos JM, Segovia-Silvestre T. In vitro effects of melatonin on cell proliferation in a colon adenocarcinoma line. *J Appl Toxicol* 2000; 20:21-24.
- [320] Blask D E, Sauer LA, Dauchy RT. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2002; 2:113-132.
- [321] Anisimov V N, Popovich IG, Zabezhinski MA, Anisimov SV, Vesnushkin GM, Vinogradova IA. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1757:573-589.
- [322] Blask D E, Dauchy RT, Sauer LA. Putting cancer to sleep at night: the neuroendocrine/circadian melatonin signal. *Endocrine* 2005; 27:179-188.
- [323] Lissoni P, Barni S, Tancini G, Rovelli F, Ardizzoia A, Conti A et al. A study of the mechanisms involved in the immunostimulatory action of the pineal hormone in cancer patients. *Oncology* 1993; 50:399-402.
- [324] Miller S C, Pandi-Perumal SR, Esquifino AI, Cardinali DP, Maestroni GJ. The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. *Int J Exp Pathol* 2006; 87:81-87.

- [325] Cos S, Fernandez F, Sanchez-Barcelo EJ. Melatonin inhibits DNA synthesis in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Life Sci* 1996; 58:2447-2453.
- [326] Cos S, Recio J, Sanchez-Barcelo EJ. Modulation of the length of the cell cycle time of MCF-7 human breast cancer cells by melatonin. *Life Sci* 1996; 58:811-816.
- [327] Gonzalez-Puga C, Garcia-Navarro A, Escames G, Leon J, Lopez-Cantarero M, Ros E et al. Selective CCK-A but not CCK-B receptor antagonists inhibit HT-29 cell proliferation: synergism with pharmacological levels of melatonin. *J Pineal Res* 2005; 39:243-250.
- [328] Shiu S Y, Li L, Xu JN, Pang CS, Wong JT, Pang SF. Melatonin-induced inhibition of proliferation and G1/S cell cycle transition delay of human choriocarcinoma JAr cells: possible involvement of MT2 (MEL1B) receptor. *J Pineal Res* 1999; 27:183-192.
- [329] World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *J Postgrad Med* 2002; 48:206-208.
- [330] Council of Europe. Draft Convention for the Protection of Human Rights and Dignity of the Human Being with Regard to the Application of Biology and Medicine: Bioethics Convention. *Bull Med Ethics* 1994; 99:19-24.
- [331] Council of Europe. Additional protocol to the convention for the protection of human rights and dignity of the human being with regard to the application of biology and medicine, on biomedical research. *Rev Derecho Genoma Hum* 2004; 21:201-214.
- [332] Mayor F. The Universal Declaration on the Human Genome and Human Rights. *C R Biol* 2003; 326:1121-1125.
- [333] Jefatura del Estado. Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica. *Boletín Oficial del Estado* 2007; 159:28826-28848.
- [334] Organización Mundial de la Salud (OMS) - World Health Organization (WHO). Good laboratory practice (GLP). Quality practices for regulated non-clinical research and development, 2ª ed. Lausanne (Suiza): OMS/WHO; 2009.
- [335] Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; 89:271-277.
- [336] Haslam G, Wyatt D, Kitos PA. Estimating the number of viable animal cells in multi-well cultures based on their lactate dehydrogenase activities. *Cytotechnology* 2000; 32:63-75.
- [337] Nunez R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr Issues Mol Biol* 2001; 3:67-70.

- [338] Silins I, Finnberg N, Stahl A, Hogberg J, Stenius U. Reduced ATM kinase activity and an attenuated p53 response to DNA damage in carcinogen-induced preneoplastic hepatic lesions in the rat. *Carcinogenesis* 2001; 22:2023-2031.
- [339] Fu N Y, Sukumaran SK, Yu VC. Inhibition of ubiquitin-mediated degradation of MOAP-1 by apoptotic stimuli promotes Bax function in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:10051-10056.
- [340] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
- [341] Hasegawa J, Kamada S, Kamiike W, Shimizu S, Imazu T, Matsuda H et al. Involvement of CPP32/Yama(-like) proteases in Fas-mediated apoptosis. *Cancer Res* 1996; 56:1713-1718.
- [342] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
- [343] Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006; 1:581-585.
- [344] Livak K J, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001; 25:402-408.
- [345] Downs C A, Kriener LH, Yu L, Eaton DC, Jain L, Helms MN. beta-Adrenergic agonists differentially regulate highly selective and nonselective epithelial sodium channels to promote alveolar fluid clearance in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 302:L1167-1178.
- [346] Hernandez C, Abreu J, Abreu P, Castro A, Jimenez A. Nocturnal melatonin plasma levels in patients with OSAS: the effect of CPAP. *Eur Respir J* 2007; 30:496-500.
- [347] Duriez P J, Shah GM. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem Cell Biol* 1997; 75:337-349.
- [348] Pandi-Perumal S R, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal?. *FEBS J* 2006; 273:2813-2838.
- [349] Shiu S Y, Leung WY, Tam CW, Liu VW, Yao KM. Melatonin MT(1) receptor-induced transcriptional up-regulation of p27(Kip1) in prostate cancer antiproliferation is mediated via inhibition of constitutively active nuclear factor kappa B (NF-kappaB): potential implications on prostate cancer chemoprevention and therapy. *J Pineal Res* 2012 doi: 10.1111/j.1600-079X.2012.01026.x.
- [350] Chen L D, Leal BZ, Reiter RJ, Abe M, Sewerynek E, Melchiorri D et al. Melatonin's inhibitory effect on growth of ME-180 human cervical cancer

- cells is not related to intracellular glutathione concentrations. *Cancer Lett* 1995; 91:153-159.
- [351] Hill S M, Blask DE. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res* 1988; 48:6121-6126.
- [352] Garcia-Navarro A, Gonzalez-Puga C, Escames G, Lopez LC, Lopez A, Lopez-Cantarero M et al. Cellular mechanisms involved in the melatonin inhibition of HT-29 human colon cancer cell proliferation in culture. *J Pineal Res* 2007; 43:195-205.
- [353] Hermann R, Podhajsky S, Jungnickel S, Lerchl A. Potentiation of antiproliferative effects of tamoxifen and ethanol on mouse hepatoma cells by melatonin: possible involvement of mitogen-activated protein kinase and induction of apoptosis. *J Pineal Res* 2002; 33:8-13.
- [354] Garcia-Santos G, Antolin I, Herrera F, Martin V, Rodriguez-Blanco J, del Pilar Carrera M et al. Melatonin induces apoptosis in human neuroblastoma cancer cells. *J Pineal Res* 2006; 41:130-135.
- [355] Marelli M M, Limonta P, Maggi R, Motta M, Moretti RM. Growth-inhibitory activity of melatonin on human androgen-independent DU 145 prostate cancer cells. *Prostate* 2000; 45:238-244.
- [356] Shiu S Y. Towards rational and evidence-based use of melatonin in prostate cancer prevention and treatment. *J Pineal Res* 2007; 43:1-9.
- [357] Molpeceres V, Mauriz JL, Garcia-Mediavilla MV, Gonzalez P, Barrio JP, Gonzalez-Gallego J. Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007; 62:687-695.
- [358] Guha M, Maity P, Choubey V, Mitra K, Reiter RJ, Bandyopadhyay U. Melatonin inhibits free radical-mediated mitochondrial-dependent hepatocyte apoptosis and liver damage induced during malarial infection. *J Pineal Res* 2007; 43:372-381.
- [359] Kim S H, Lee SM. Cytoprotective effects of melatonin against necrosis and apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury in rat liver. *J Pineal Res* 2008; 44:165-171.
- [360] Qin L, Wang X, Duan Q, Chen B, He S. Inhibitory effect of melatonin on the growth of H22 hepatocarcinoma cells by inducing apoptosis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2004; 24:19-21, 31.
- [361] Lakhani S A, Masud A, Kuida K, Porter GA, Jr, Booth CJ, Mehal WZ et al. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 2006; 311:847-851.
- [362] Yang Q H, Xu JN, Xu RK, Pang SF. Antiproliferative effects of melatonin on the growth of rat pituitary prolactin-secreting tumor cells in vitro. *J Pineal Res* 2007; 42:172-179.

- [363] Trubiani O, Recchioni R, Moroni F, Pizzicannella J, Caputi S, Di Primio R. Melatonin provokes cell death in human B-lymphoma cells by mitochondrial-dependent apoptotic pathway activation. *J Pineal Res* 2005; 39:425-431.
- [364] Rubio S, Estevez F, Cabrera J, Reiter RJ, Loro J, Quintana J. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by melatonin in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal Res* 2007; 42:131-138.
- [365] Slee E A, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999; 144:281-292.
- [366] Sampath D, Rao VA, Plunkett W. Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. *Oncogene* 2003; 22:9063-9074.
- [367] Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 2004; 337:1-13.
- [368] Atten M J, Godoy-Romero E, Attar BM, Milson T, Zopel M, Holian O. Resveratrol regulates cellular PKC alpha and delta to inhibit growth and induce apoptosis in gastric cancer cells. *Invest New Drugs* 2005; 23:111-119.
- [369] Filomeni G, Aquilano K, Rotilio G, Ciriolo MR. Reactive oxygen species-dependent c-Jun NH2-terminal kinase/c-Jun signaling cascade mediates neuroblastoma cell death induced by diallyl disulfide. *Cancer Res* 2003; 63:5940-5949.
- [370] Vousden K H. P53: Death Star. *Cell* 2000; 103:691-694.
- [371] Cos S, Mediavilla MD, Fernandez R, Gonzalez-Lamuno D, Sanchez-Barcelo EJ. Does melatonin induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells in vitro?. *J Pineal Res* 2002; 32:90-96.
- [372] Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001; 98:2603-2614.
- [373] Joo S S, Yoo YM. Melatonin induces apoptotic death in LNCaP cells via p38 and JNK pathways: therapeutic implications for prostate cancer. *J Pineal Res* 2009; 47:8-14.
- [374] Mao L, Yuan L, Slakey LM, Jones FE, Burow ME, Hill SM. Inhibition of breast cancer cell invasion by melatonin is mediated through regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Breast Cancer Res* 2010; 12:R107.
- [375] Cabrera J, Negrin G, Estevez F, Loro J, Reiter RJ, Quintana J. Melatonin decreases cell proliferation and induces melanogenesis in human melanoma SK-MEL-1 cells. *J Pineal Res* 2010; 49:45-54.

- [376] Qin X, Liu C, Zhou Y, Wang G. Cisplatin induces programmed death-1-ligand 1(PD-L1) over-expression in hepatoma H22 cells via Erk /MAPK signaling pathway. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2010; 56 Suppl:OL1366-1372.
- [377] Bacus S S, Gudkov AV, Lowe M, Lyass L, Yung Y, Komarov AP et al. Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53. *Oncogene* 2001; 20:147-155.
- [378] Lee H J, Wang CJ, Kuo HC, Chou FP, Jean LF, Tseng TH. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 203:124-131.
- [379] Czaja M J. The future of GI and liver research: editorial perspectives. III. JNK/AP-1 regulation of hepatocyte death. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284:G875-879.
- [380] De Martino A, Filomeni G, Aquilano K, Ciriolo MR, Rotilio G. Effects of water garlic extracts on cell cycle and viability of HepG2 hepatoma cells. *J Nutr Biochem* 2006; 17:742-749.
- [381] Dubocovich M L, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005; 27:101-110.
- [382] Najji L, Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Calvo JR. Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life Sci* 2004; 74:2227-2236.
- [383] Aust S, Thalhammer T, Humpeler S, Jager W, Klimpfinger M, Tucek G et al. The melatonin receptor subtype MT1 is expressed in human gallbladder epithelia. *J Pineal Res* 2004; 36:43-48.
- [384] Ram P T, Dai J, Yuan L, Dong C, Kiefer TL, Lai L et al. Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer. *Cancer Lett* 2002; 179:141-150.
- [385] Slominski A, Fischer TW, Zmijewski MA, Wortsman J, Semak I, Zbytek B et al. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine* 2005; 27:137-148.
- [386] Ekmekcioglu C, Haslmayer P, Philipp C, Mehrabi MR, Glogar HD, Grimm M et al. Expression of the MT1 melatonin receptor subtype in human coronary arteries. *J Recept Signal Transduct Res* 2001; 21:85-91.
- [387] Frungieri M B, Mayerhofer A, Zitta K, Pignataro OP, Calandra RS, Gonzalez-Calvar SI. Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology* 2005; 146:1541-1552.

- [388] Clemens J W, Jarzynka MJ, Witt-Enderby PA. Down-regulation of mt1 melatonin receptors in rat ovary following estrogen exposure. *Life Sci* 2001; 69:27-35.
- [389] Masana M I, Witt-Enderby PA, Dubocovich ML. Melatonin differentially modulates the expression and function of the hMT1 and hMT2 melatonin receptors upon prolonged withdrawal. *Biochem Pharmacol* 2003; 65:731-739.
- [390] Akiyoshi J, Hough C, Chuang DM. Paradoxical increase of 5-hydroxytryptamine2 receptors and 5-hydroxytryptamine2 receptor mRNA in cerebellar granule cells after persistent 5-hydroxytryptamine2 receptor stimulation. *Mol Pharmacol* 1993; 43:349-355.
- [391] Thomas R F, Holt BD, Schwinn DA, Liggett SB. Long-term agonist exposure induces upregulation of beta 3-adrenergic receptor expression via multiple cAMP response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:4490-4494.
- [392] Starr S, Kozell LB, Neve KA. Drug-induced up-regulation of dopamine D2 receptors on cultured cells. *J Neurochem* 1995; 65:569-577.
- [393] Filtz T M, Artymyshyn RP, Guan W, Molinoff PB. Paradoxical regulation of dopamine receptors in transfected 293 cells. *Mol Pharmacol* 1993; 44:371-379.
- [394] Yuan L, Collins AR, Dai J, Dubocovich ML, Hill SM. MT(1) melatonin receptor overexpression enhances the growth suppressive effect of melatonin in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 192:147-156.
- [395] Toma C D, Svoboda M, Arrich F, Ekmekcioglu C, Assadian O, Thalhammer T. Expression of the melatonin receptor (MT) 1 in benign and malignant human bone tumors. *J Pineal Res* 2007; 43:206-213.
- [396] Kobayashi Y, Itoh MT, Kondo H, Okuma Y, Sato S, Kanishi Y et al. Melatonin binding sites in estrogen receptor-positive cells derived from human endometrial cancer. *J Pineal Res* 2003; 35:71-74.
- [397] Pintor J, Pelaez T, Hoyle CH, Peral A. Ocular hypotensive effects of melatonin receptor agonists in the rabbit: further evidence for an MT3 receptor. *Br J Pharmacol* 2003; 138:831-836.
- [398] Fischer T W, Zmijewski MA, Zbytek B, Sweatman TW, Slominski RM, Wortsman J et al. Oncostatic effects of the indole melatonin and expression of its cytosolic and nuclear receptors in cultured human melanoma cell lines. *Int J Oncol* 2006; 29:665-672.
- [399] Carlberg C, Hooft van Huijsdijnen R, Staple JK, DeLamararter JF, Becker-Andre M. RZR_s, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol* 1994; 8:757-770.

- [400] Kang H S, Angers M, Beak JY, Wu X, Gimble JM, Wada T et al. Gene expression profiling reveals a regulatory role for ROR alpha and ROR gamma in phase I and phase II metabolism. *Physiol Genomics* 2007; 31:281-294.
- [401] Chauvet C, Bois-Joyeux B, Berra E, Pouyssegur J, Danan JL. The gene encoding human retinoic acid-receptor-related orphan receptor alpha is a target for hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J* 2004; 384:79-85.
- [402] Chen Y, Coulter S, Jetten AM, Goldstein JA. Identification of human CYP2C8 as a retinoid-related orphan nuclear receptor target gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 329:192-201.
- [403] Karasek M, Gruszka A, Lawnicka H, Kunert-Radek J, Pawlikowski M. Melatonin inhibits growth of diethylstilbestrol-induced prolactin-secreting pituitary tumor in vitro: possible involvement of nuclear RZR/ROR receptors. *J Pineal Res* 2003; 34:294-296.
- [404] Schrader M, Danielsson C, Wiesenberg I, Carlberg C. Identification of natural monomeric response elements of the nuclear receptor RZR/ROR. They also bind COUP-TF homodimers. *J Biol Chem* 1996; 271:19732-19736.
- [405] Ishii H, Tanaka N, Kobayashi M, Kato M, Sakuma Y. Gene structures, biochemical characterization and distribution of rat melatonin receptors. *J Physiol Sci* 2009; 59:37-47.
- [406] Maurice P, Daulat AM, Turecek R, Ivankova-Susankova K, Zamponi F, Kamal M et al. Molecular organization and dynamics of the melatonin MT(1) receptor/RGS20/G(i) protein complex reveal asymmetry of receptor dimers for RGS and G(i) coupling. *EMBO J* 2010; 29:3646-3659.
- [407] Nah S S, Won HJ, Park HJ, Ha E, Chung JH, Cho HY et al. Melatonin inhibits human fibroblast-like synoviocyte proliferation via extracellular signal-regulated protein kinase/P21(CIP1)/P27(KIP1) pathways. *J Pineal Res* 2009; 47:70-74.
- [408] Esposito E, Genovese T, Caminiti R, Bramanti P, Meli R, Cuzzocrea S. Melatonin reduces stress-activated/mitogen-activated protein kinases in spinal cord injury. *J Pineal Res* 2009; 46:79-86.
- [409] Chan A S, Lai FP, Lo RK, Voyno-Yasenetskaya TA, Stanbridge EJ, Wong YH. Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal* 2002; 14:249-257.
- [410] Bondi C D, McKeon RM, Bennett JM, Ignatius PF, Brydon L, Jockers R et al. MT1 melatonin receptor internalization underlies melatonin-induced morphologic changes in Chinese hamster ovary cells and these processes are dependent on Gi proteins, MEK 1/2 and microtubule modulation. *J Pineal Res* 2008; 44:288-298.