

# LA PARADOJA DEL USO DE ANTIOXIDANTES DURANTE EL TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER: ¿PROTEGER AL ORGANISMO DE LOS EFECTOS TÓXICOS DE LOS ANTINEOPLÁSICOS DISMINUIRÍA LA EFICACIA FARMACOLÓGICA PARA EVITAR EL DESARROLLO DEL CÁNCER?\*

Laura Guerrero Medrano<sup>1</sup>, María Maldonado Vega<sup>2</sup> y José Víctor Calderón Salinas<sup>1</sup> <sup>¶</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Unidad Zacatenco. Av. IPN 2508 Col. Zacatenco, Ciudad de México 07360 México. <sup>2</sup>Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío, Dirección de Planeación, Enseñanza e Investigación. León, Gto. <sup>¶</sup>Autor de correspondencia correo E: jcalder@cinvestav.mx.

## RESUMEN

El cáncer es una enfermedad que consiste en la transformación de células normales a células neoplásicas las cuales se caracterizan por el incremento y pérdida de control de la división celular. Los antineoplásicos son fármacos utilizados en el tratamiento de cáncer, su efecto farmacológico consiste en inducir la apoptosis en las células neoplásicas; sin embargo no son específicos para células neoplásicas y causan efectos tóxicos en células no neoplásicas. Se ha sugerido que el daño oxidativo que causan los antineoplásicos es parte de su toxicidad y que el uso de antioxidantes puede reducir ese daño. El uso de antioxidante podría disminuir el efecto del antineoplásico en el tratamiento del cáncer debido a que el estrés oxidativo puede participar en los mecanismos de acción de estos fármacos. En esta revisión se discuten a) Los mecanismos de acción de los antineoplásicos, b) La participación del estrés oxidativo en la apoptosis inducida por estos fármacos, c) El daño oxidativo generado por el tratamiento con antineoplásicos y d) El co-tratamiento con antioxidantes para reducir el daño oxidativo sin disminuir la eficacia del tratamiento antineoplásico.

## ABSTRACT

Cancer is a disease that involves the transformation of normal cells to neoplastic cells. The hallmarks of neoplastic cells are rapid cell proliferation and uncontrolled cell growth. Antineoplastic drugs used in cancer treatment induce apoptosis in neoplastic cells; however they are not specific for neoplastic cells and cause toxic effects in non-neoplastic cells. Oxidative damage maybe induced by antineoplastic treatment, this damage could be involved in the toxicity of treatment, so antioxidants use have been proposed to reduce this toxicity. However antioxidant could decrease pharmacological effect of the antineoplastic because oxidative stress might participate in the mechanisms of action of antineoplastic. In this review we discute about a) antineoplastic action mechanisms, b) involvement of oxidative stress in apoptosis induced by treatment, c) oxidative damage generated by antineoplastic treatment, and d) antioxidants co-treatment to reduce oxidative damage without inhibit antineoplastic-induced apoptosis.

## PALABRAS

### CLAVE:

Cáncer, quimioterapia, daño oxidativo, efectos tóxicos, respuesta antioxidante.

## KEY WORDS:

Cancer, chemotherapy, oxidative stress, toxicological effects, antioxidant response.

El cáncer y la neoplasia son dos términos que cotidianamente suele utilizarse como sinónimos; no obstante no significan lo mismo. El cáncer es la enfermedad, la neoplasia son células resultantes de las mutaciones de una célula normal a una célula transformada, ésta última caracterizada por el incremento y pérdida del control de la división celular, la pérdida de la comunicación con otras células y de la estructura tisular (1, 2).

El cáncer como enfermedad se manifiesta cuando el crecimiento acelerado y sin control de un grupo de células neoplásicas de un tejido afecta las funciones metabólicas y fisiológicas del tejido y del organismo. La transformación de células normales a células neoplásicas es un proceso gradual de mutaciones acumuladas, iniciando por mutaciones activadoras de los protooncogenes e inhibidoras de los genes supresores de tumor (3).

Las células neoplásicas en cuanto forman una masa crítica dan origen al tumor canceroso y con ello a la enfermedad del cáncer. A pesar de que se han identificado más de 100 tipos distintos de cáncer y sus diversos subtipos, todos los tumores cancerosos comparten ocho características distintivas: a) Señales de proliferación celular en funcionamiento permanente; b) Reducción de las señales de inhibición de crecimiento celular; c) Activación de procesos de invasión y metástasis; d) Desarrollo de inmortalidad celular; e) Inducción de angiogénesis; f) Resistencia a la muerte celular; g) Reprogramación del metabolismo energético y; h) Evasión del ataque por el sistema inmune (4).

El conocimiento de las características de las células neoplásicas y del desarrollo del cáncer se ha usado en el diseño de una amplia gama de opciones terapéuticas. Una forma de tratamiento es la remoción del tumor, sin embargo no en todos los casos es efectiva porque las células neoplásicas tienen la capacidad de migrar y generar nuevos centros tumorales. Otra alternativa es el uso de radiación para disminuir el tamaño de los tumores cancerosos y mantener en remisión a los pacientes con cáncer, una tercera forma es el uso de fármacos con propiedades antineoplásicas. De esta manera la cirugía, la radioterapia y el uso de fármacos antineoplásicos, también conocidos como quimioterapia, se convirtieron en los tratamientos estándar para combatir al cáncer. El aumento en el conocimiento de las características de las células neoplásicas permitió el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas tales como: inmunoterapia, hormonoterapia, inhibidores de vías de señalización, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de los receptores de factores de crecimiento y la terapia génica (2)

Los tratamientos que combinan varias opciones

terapéuticas han contribuido a mejorar el pronóstico en el desarrollo de la enfermedad y las posibilidades de sobrevivencia. Los antineoplásicos se utilizan con mucha frecuencia por su efectividad y amplio espectro terapéutico; su efecto se incrementa al combinarlos con otras opciones como la radioterapia, la hormonoterapia, etc. Es por estas razones que, no obstante, los numerosos y graves efectos tóxicos sobre las células no neoplásicas y en el organismo, se siguen utilizando (2, 5).

### **Efectos farmacológicos y toxicológicos del tratamiento con antineoplásicos**

Los antineoplásicos son un grupo de moléculas con una gran diversidad en su estructura química y mecanismo de acción, cuya característica en común es inducir la muerte celular por apoptosis de las células neoplásicas.

El efecto farmacológico se define como la manifestación benéfica para el organismo producida por el fármaco, en el caso de los antineoplásicos es la eliminación o el control de la proliferación de las células neoplásicas en el organismo (6). Para lograr el efecto farmacológico, los antineoplásicos pueden utilizarse en diversas modalidades durante el tratamiento contra el cáncer: a) Tratamiento de inducción, cuando se utilizan como la primera o la única terapia, también conocida como terapia de primera línea o tratamiento primario; b) Tratamiento adyuvante, cuando se emplean como terapia de refuerzo después del tratamiento primario con cirugía o radioterapia; c) Terapia neoadyuvante, cuando se administra antes de otro tipo de tratamiento: cirugía, radioterapia, inmunoterapia; para disminuir el tamaño del tumor (3, 6).

El efecto toxicológico de un fármaco es la generación de daño a células y tejidos que provoca alteraciones patológicas. En el caso de los antineoplásicos, se refiere al daño local o sistémico por dañar a células no afectadas por el cáncer, se conoce como *efecto secundario* o *efecto colateral* del tratamiento. La intensidad y especificidad del efecto dependen del tipo de antineoplásico, la dosis, el tiempo de exposición, el tipo celular y las condiciones metabólicas y fisiológicas particulares de cada individuo (5).

Algunos de los efectos toxicológicos más frecuentes de los antineoplásicos son hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, neurotoxicidad, cardiopatías e infertilidad. Sus manifestaciones clínicas iniciales van desde náuseas, vómito, pérdida de peso, inflamación de las mucosas (mucosistis) y alopecia hasta leucopenia, anemia y desórdenes cognitivos (7).

La toxicidad de los antineoplásicos es un factor

que obliga a modificar la dosis o el tiempo de tratamiento; la reducción de cualquiera de estos dos factores disminuye las posibilidades de controlar el cáncer (2, 7).

Por otra parte, las células neoplásicas pueden tener una respuesta adaptativa al tratamiento con el antineoplásico, que provoca resistencia al fármaco debido a la generación de nuevas mutaciones adaptativas o por selección de clones resistentes que favorecen el desarrollo del tumor (3, 8).

### Tipos de antineoplásicos

Existen diferentes formas de clasificar a los antineoplásicos, la más utilizada es según su mecanismo de acción. De acuerdo con este criterio (2, 5) los antineoplásicos se clasifican en:

- a) **Agentes alquilantes.**- Moléculas que contienen en su estructura un grupo alquilo que ataca al átomo de nitrógeno en la posición N-7 de la guanina del DNA o que pueden formar puentes intercatenarios, estos últimos se denominan alquilantes bifuncionales, de manera que los aductos formados por esta reacción impiden la replicación. Dentro de este grupo se encuentran: la ciclofosfamida, la ifosfamida, la mitomicina C, la carmustina, el busulfan y la temozolomida, entre otros.
- b) **Análogos de platino.**- Moléculas basadas en platino y cloro o platino y amonio, que forman entrecruzamientos con el DNA de manera similar a los agentes alquilantes bifuncionales, impidiendo la replicación. El cisplatino, el carboplatino y el oxaliplatino son los principales representantes de este grupo.
- c) **Antimetabolitos.**- Moléculas análogas a las esenciales para la síntesis de DNA y con ello para la replicación, tienen mayor actividad durante la fase S del ciclo celular. Estos compuestos pueden inhibir directamente o indirectamente la síntesis de purinas o pirimidinas. Pertenecen a este grupo el metotrexato, la mercaptopurina y el fluorouracilo.
- d) **Inhibidores de topoisomerasa.**- Inhiben la actividad de la topoisomerasa I y II y producen fragmentación de las cadenas de DNA y falla en la replicación, actúan principalmente en células en fase S. El irinotecan y el topotecan son ejemplos de inhibidores de la topoisomerasa I; los inhibidores de la topoisomerasa II incluyen a la doxorubicina, la daunorubicina, la mitoxantrona y la amsacrina.
- e) **Antibióticos citotóxicos.**- Moléculas inicialmente aisladas a partir de actinomicetos con propiedades antibacterianas y antineoplásicas.
- f) **Antimicrotúbulos.**- Moléculas aisladas inicialmente de la planta *Vinca rosea* que interaccionan con la tubulina para evitar la formación o la despolimerización del huso mitótico; en ambos casos no es posible entrar en la metafase y la célula muere por apoptosis. Su mayor actividad se presenta durante la fase M del ciclo celular. Los alcaloides vinca, tales como la vinblastina y la vinorelbina, inhiben el ensamblaje de los microtúbulos; en tanto que los taxanos, como el paclitaxol y el docetaxol, evitan su despolimerización.

### La apoptosis como efecto farmacológico de los antineoplásicos

A pesar de que los fármacos antineoplásicos se empezaron a utilizar hace más de cincuenta años, los mecanismos de acción y las vías metabólicas involucradas no han sido completamente dilucidadas. Tampoco se han identificado los mecanismos de interacción entre la célula neoplásica y los agentes antineoplásicos debido a que los tumores cancerosos están formados por subclonas de células neoplásicas que cambian a medida que evoluciona la enfermedad (1, 2).

La quimiosensibilidad y la quimiorresistencia son respuestas adaptativas de la célula neoplásica al antineoplásico. Ambas dependen de las características fenotípicas y genotípicas particulares de cada subclona celular y de la influencia del microambiente tumoral. Para el organismo es crítico mantener un balance entre la velocidad de la proliferación y de la muerte celular. Cuando el equilibrio se desplaza hacia la proliferación de las células neoplásicas, el tumor canceroso no solo aumenta de tamaño, también se incrementa su potencial invasivo y se pueden producir células metastásicas (1, 2, 9).

Las investigaciones sobre la apoptosis inducida por antineoplásicos se han enfocado en la participación de las moléculas involucradas en el inicio de la apoptosis pero aún falta dilucidar las moléculas y vías involucradas en el proceso apoptótico. Para lograr el efecto farmacológico el antineoplásico induce, directa o indirectamente, una serie de respuestas celulares basadas en la modulación de citocinas, hormonas, factores de crecimiento y vías

de señalización que desembocan en la activación intrínseca o extrínseca de la apoptosis de la célula neoplásica (2).

En el caso de la respuesta adaptativa de las células neoplásicas, el fármaco o sus metabolitos dañan al DNA, bloquean los sistemas de reparación celular e inhiben la apoptosis, de manera que las células neoplásicas podrían dividirse a pesar del material genético dañado y contribuir a la generación de nuevas clonas portadoras de mutaciones asociadas con la quimiorresistencia. El daño al DNA también podría afectar a las células no neoplásicas y provocar mutaciones que en algún momento darían origen a poblaciones de células neoplásicas derivadas del efecto del tratamiento antineoplásico; tanto en células neoplásicas como en no neoplásicas el antineoplásico podría dañar la síntesis de proteínas, las membranas citoplasmática y mitocondrial, alterar el equilibrio oxidativo y el potencial energético de las células, en conjunto estas alteraciones podrían contribuir a la evasión de la apoptosis (2, 8, 9).

La apoptosis inducida por los antineoplásicos en las células neoplásicas es, en términos generales, similar al proceso apoptótico inducido por otros agentes o condiciones en células no neoplásicas: a) Mediante la vía intrínseca, el estímulo que induce la apoptosis actúa directamente en la célula que desencadena una serie de reacciones que inician con la activación de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak, la inhibición de las antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL y la liberación del citocromo C; posteriormente a ello se forma el apoptosoma y se inicia la cascada de activación de caspasas, iniciando por la caspasa-9 la cual activa a las caspasas efectoras -3 y -7; b) Por la vía extrínseca, caracterizada por la secreción de mediadores como Fas o TNF- $\alpha$  por células cercanas a la célula que entrará en apoptosis. Después de su liberación Fas o TNF- $\alpha$  se unen a los receptores de muerte (DR) principalmente los DR4 y DR5 y se recluta a la caspasa-8 como caspasa iniciadora. La activación de la caspasa-8; activa a la caspasa-3 para iniciar la apoptosis del tipo I (independiente de la mitocondria) o bien, la caspasa-8 corta a la proteína Bid para después liberar al citocromo C y activar la apoptosis tipo II (dependiente de la mitocondria) (2, 9, 10).

A partir de estudios en células resistentes a los antineoplásicos se ha podido comprobar que además de las moléculas antes mencionadas la vía PI3K/Akt tiene un importante papel para determinar la inducción o la inhibición de la apoptosis. También influyen las proteínas de choque térmico Hsp; la survivina, una proteína que participa en la formación del cinetocoro y que es supresora de la

apoptosis, las proteasas de la familia de las calpaínas y el factor de necrosis NF- $\kappa$ B (9, 11, 12).

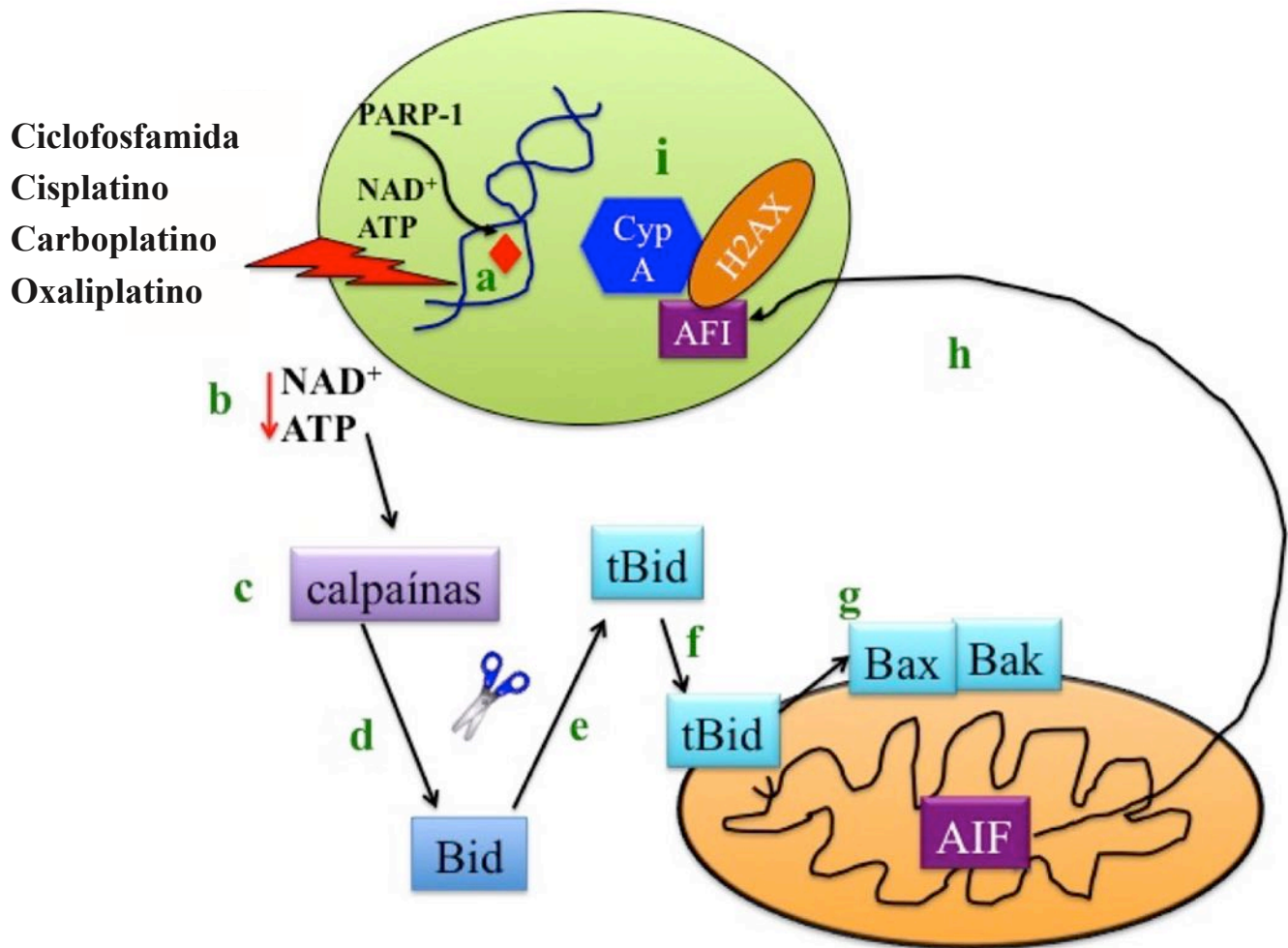
Es evidente que dada la gama de antineoplásicos no es posible establecer un modelo único que explique la apoptosis inducida por estos fármacos. Los efectos de los antineoplásicos sobre los fenómenos apoptóticos también son variados, dependientes de dosis y de respuestas celulares complejas, así como una serie de factores específicos para célula, órgano, tejidos, organismo y especie. Por lo tanto, la caracterización del proceso apoptótico es tarea compleja y hasta el momento la investigación se ha enfocado al estudio de la apoptosis inducida por unos cuantos fármacos, los de uso más frecuente. La información disponible debe analizarse en su contexto.

### **a) Antineoplásicos que inducen la apoptosis por la vía intrínseca: Ciclofosfamida, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, aclarubicina, doxorubicina y mitoxantrona**

#### *Apoptosis inducida por agentes alquilantes o por los análogos del platino*

El antineoplásico alquilante ciclofosfamida (CTX) y los análogos de platino: cisplatino (CPT), carboplatino y oxaliplatino forman aductos con el DNA (Fig. 1.a) y al hacerlo detienen la maquinaria de replicación. En respuesta al daño al DNA la célula incrementa la síntesis de la enzima poli-ADP-ribosa (PARP-1) dependiente de NAD<sup>+</sup> (Fig. 1.a) como un mecanismo de reparación del daño; si el daño no puede ser reparado o la célula no cuenta con suficiente NAD<sup>+</sup> y ATP estas moléculas se agotan rápidamente (Fig. 1.b), y le sigue la activación de calpaínas (Fig. 1.c). Estas proteínas cortan a Bid (Fig. 1.d) y lo transforman en tBid (Fig. 1.e), el cual se moviliza del citosol a la mitocondria (Fig. 1.f) y contribuye a la activación de Bax (Fig. 1.g); posteriormente Bax aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial y favorece la liberación del Factor Inductor de Apoptosis (AIF) desde la mitocondria hacia el citosol y el núcleo (Fig. 1.h). En el núcleo AIF se asocia con las proteínas ciclofilina A (Cyp A) y H2AX (Fig. 1.i) para formar el complejo de degradación del DNA (13, 14, 15).

La expresión de PARP-1 tiene como objetivo la reparación del daño al DNA y la sobrevivencia celular; sin embargo cuando el daño no puede ser reparado la célula induce la muerte celular por apoptosis mediante el mecanismo antes descrito; la disminución de la concentración de NAD<sup>+</sup> y ATP, antes de iniciar la apoptosis induce la muerte por necrosis. Existe evidencia de que la apoptosis no es la única forma de muerte celular inducida por



**Figura 1. Mecanismo de apoptosis inducida por agentes alquilantes y análogos de platino.** Las reacciones que culminan con la apoptosis inducida por la ciclofosfamida, el cisplatino, el carboplatino y el oxaliplatino inician con la expresión de PARP-1 después del daño al DNA generado por estos antineoplásicos. Abreviaturas: PARP-1, enzima poli-ADP-ribosa dependiente NAD<sup>+</sup>; AIF, Factor Inductor de Apoptosis; CypA, ciclofilina A.

los metabolitos de estos antineoplásicos; las condiciones celulares podrían incluir la participación de otras moléculas y conducir a otro tipo de muerte celular. Por ejemplo, en células SGC-7901 de cáncer gástrico incubadas con oxaliplatino, durante las primeras 32 h la muerte celular fue por apoptosis de acuerdo al mecanismo antes descrito. Después de 32 h la presencia de lactato deshidrogenasa y de Cyp A en el medio es un indicador del rompimiento de la integridad de la membrana plasmática; lo que coincidió con el incremento en la expresión de Bmf, una proteína inhibidora de la apoptosis. La máxima actividad de PARP-1 y de las caspasas -9 y -3 ocurrió a las 24 h, después de este tiempo las caspasas se encontraron como procaspasas y disminuyó la concentración de PARP1; los anteriores datos junto con los resultados de los ensayos con anexina V, las observaciones al microscopio

electrónico y los ensayos con z-VAD, un inhibidor de caspasas, y con Nec-1, un inhibidor de necrosis, permiten concluir que el oxaliplatino induce la muerte tanto por apoptosis como por necrosis como resultado del cambio de condiciones en el ambiente celular debido al proceso apoptótico y que la necrosis es una vía alterna en células resistentes a la apoptosis (14, 15).

#### Apoptosis inducida por antraciclinas

Las antraciclinas inhiben la actividad de las topoisomerasas I o II y provocan el rompimiento de una o ambas cadenas del DNA. Este daño al DNA induce la apoptosis por la vía intrínseca con o sin la participación de las caspasas. Un mismo antineoplásico puede inducir la apoptosis por la vía intrínseca por mecanismos que difieren en la identidad de

**Tabla 1****Comparación de los eventos proapoptóticos inducidos por doxorubicina en dos líneas celulares.**

Los eventos proapoptóticos ocurren en diferentes tiempos dependiendo del tipo celular. Las proteínas proapoptóticas de la familia BH3, NOXA y PUMA, tienen un importante papel en la apoptosis independiente de caspasas inducida por doxorubicina en células Jurkat y U937 y son específicas por tipo celular.

Indicador de apoptosis		Células Jurkat	Células U937	
Pérdida de potencial de membrana mitocondrial	Etapa	Intermedia	Temprana	
	Dependencia de caspasas	No	No	
	Participación de caspasas	Acelera el proceso	Acelera el proceso	
Expresión de proteínas antiapoptóticas	Bcl-2	Disminución	No se altera	
	Bcl-XL	Disminución	No se altera	
	Mcl-1	Etapa temprana	Sobreexpresión	Sobreexpresión
		Etapa intermedia y tardía	Disminución	Disminución
Expresión de proteínas proapoptóticas	Subfamilia Bax	Bax	No se altera	
		Bak	No se altera	
	Subfamilia BH3	NOXA	Sobreexpresión temprana	No se expresa
		PUMA	No se expresa	Sobreexpresión temprana
Activación de Bax y Bak	Dependencia de caspasas	No	No	
	Participación de proteína subfamilia BH3	NOXA	PUMA	

las moléculas participantes y en la temporalidad dependiendo del tipo celular. Por ejemplo, en la apoptosis inducida por la doxorubicina (DTX) *in vitro* destacan dos aspectos: la participación de proteínas de la familia Bcl-2 es necesaria para la activación de la apoptosis independiente de la actividad de las caspasas y la dependencia de las caspasas es específica del tipo celular (16, 17).

En ensayos *in vitro* con dos líneas celulares: células Jurkat de linfocitos T inmortalizados y células U937 de leucemia promonocítica, incubadas con DTX se comprobó que en ambos casos la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial requiere

de la activación de las caspasas -2,-3,-6,-7,-8 y -9, en su ausencia se genera un estado de pérdida intermedia del potencial que retrasa la liberación del citocromo C. En tal caso es posible la inducción a apoptosis de forma independiente a la actividad de caspasas, debido a la participación de proteínas de la familia Bcl-2 que contribuyen a la liberación del AIF y fragmentación del DNA. Sin embargo, la temporalidad de los eventos, la identidad y el nivel de expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 difieren entre ambos tipos celulares (16).

En la tabla 1 se presenta un comparativo entre los eventos que conducen a la apoptosis, inde-

pendiente de caspasas, inducida por DTX en dos líneas celulares bajo las mismas condiciones de incubación; se destacan las diferencias en temporalidad y concentración e identidad de las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas entre ambas líneas celulares y con respecto al proceso activado por caspasas (16).

Por otra parte, también hay evidencia de diferencias en el tiempo de inducción a apoptosis entre fármacos del mismo tipo. Los antineoplásicos inhibidores de la topoisomerasa I o II aclarubicina (ACL), mitoxantrona (MTX) y DTX, difieren entre sí en el tiempo de inducción a la muerte celular; en los tres casos se encontraron células apoptóticas y necróticas, en diferentes proporciones. Los resultados concuerdan con los datos de los ensayos *in vitro* con el oxaliplatino, a menor tiempo transcurrido entre el daño al DNA y la muerte celular se incrementa el porcentaje de células que mueren por apoptosis. En el caso de las antraciclinas, la actividad de la caspasa-3 no es necesaria, sin embargo participa en la inducción a apoptosis en una etapa más temprana (15, 17).

En ensayos con células neoplásicas de fibroblasto de ratón (NIH 3T3) y de fibroblastos de peritoneo de hámster (B14) la ACL induce la muerte celular en una etapa más temprana y con mayor relación celular apoptosis/necrosis; en el extremo opuesto la MTX requiere de mayor tiempo y el mayor porcentaje de muerte es por necrosis. La sensibilidad a estas antraciclinas difiere entre las líneas celulares utilizadas en el ensayo. Ambas son igualmente sensibles a ACL, pero la sensibilidad a DTX y a MTX es diferente; las células B14 son 5 veces más sensibles a DTX y 2 veces más sensibles a MTX. Por otra parte, la MTX fue la antraciclina que provocó la mayor muerte celular, en un porcentaje mayor la muerte celular fue por necrosis y su LIC<sub>50</sub> (concentración del fármaco a la cual en el 50% de la población se inhibe la división celular) fue diez veces menor que la IC<sub>50</sub> de la ACL y de la DTX; estos resultados sugieren que a) La sensibilidad a estas antraciclinas es específica por tipo celular, b) Las antraciclinas pueden inducir la muerte celular por apoptosis y por necrosis, c) La relación apoptosis/necrosis inducida por las antraciclinas es dependiente del fármaco (17).

### **b) Antineoplásicos que inducen la apoptosis por la vía extrínseca tipo I: epotilona B, paclitaxol y 5-fluorouracilo**

#### *Apoptosis inducida por taxanos*

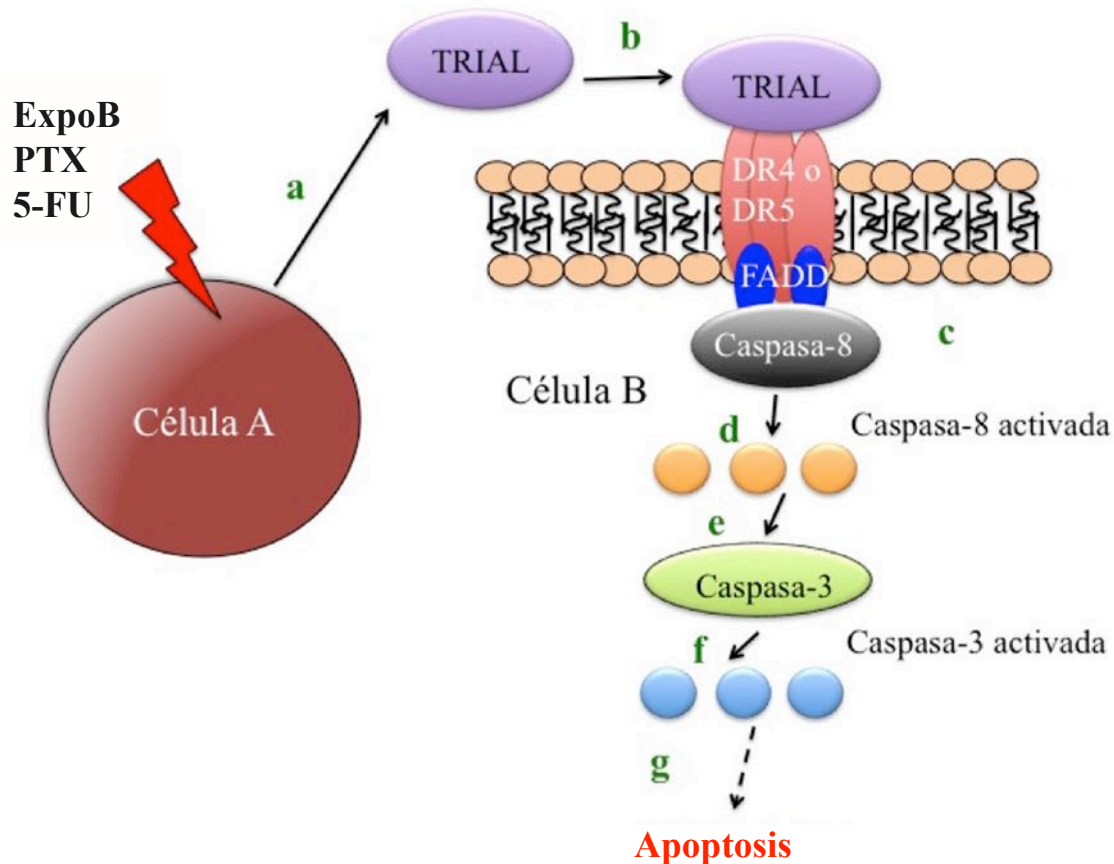
Los taxanos epotilona B (EpoB) y paclitaxol (PTX) inducen la apoptosis en células de ovario OV-90

por la vía extrínseca tipo I (independiente de la mitocondria) mediada por el ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL). Las células vecinas a las células que entrarán en apoptosis liberan a TRAIL como una respuesta a la presencia en el medio de EpoB, PTX o sus intermediarios metabólicos (Fig. 2 a). TRAIL se dirige hacia las células que entrarán en apoptosis (Fig. 2 b), la unión con su receptor, que en el caso de los taxanos es el receptor DR4 o el DR5, tiene como efecto la oligomerización y reclutamiento de la proteína portadora del dominio de la muerte asociado a Fas (FADD) y de la caspasa-8 para formar el complejo de señalización de inducción a la muerte celular (DISC). Después de la formación de DISC (Fig. 2.c) se activa la caspasa-8 (Fig. 2.d), la cual a su vez activa a la caspasa-3 (Fig. 2.e). Este último evento induce a la apoptosis por la vía extrínseca independiente de mitocondria. (18, 19).

La apoptosis de las células OV-9 inducida por EpoB o por PTX tiene como elementos en común la participación de TRAIL como iniciador del proceso apoptótico y la necesidad de la activación de las caspasas -8 para lograr la activación de la caspasa-3. La expresión de TRAIL, caspasa-3 y caspasa-8 es mayor y se detecta en etapas más tempranas en las células incubadas con EpoB en comparación a las incubadas con PTX; aunque la expresión inicial de TRAIL en células incubadas con PTX es baja en las etapas tempranas, con el tiempo se incrementa lo suficiente para activar a la caspasa-8 (18).

La hidrólisis de PARP por la caspasa-3 activada conserva las reservas de ATP intracelular al inactivar el sistema de reparación del DNA que lo consume; en las células expuestas a PTX se observa mayor porcentaje de efectos genotóxicos en comparación a lo observado en células incubadas con EpoB. Esta diferencia probablemente se relaciona con el tiempo requerido para activar a la caspasa-3; en el caso de PTX un retraso podría llevar a la célula a mecanismos de escape de la apoptosis y permitir la duplicación del DNA dañado, es decir a conservar una célula neoplásica (19, 20).

El 5-fluorouracilo (5FU), un análogo de uracilo induce apoptosis por la vía extrínseca de acuerdo al mecanismo descrito anteriormente (Fig. 2). También se ha observado que después de la unión de TRAIL con DR5 se pueden activar las vías apoptóticas MAPK y JNK e inhibir las vías antiapoptóticas IP3k/AKT y NfκB, de manera que se reúnen las condiciones para muerte celular por apoptosis inducida por 5FU. Existe evidencia, tanto *in vitro* como *in vivo*, de que 5FU actúa en sinergia con TRAIL para la inducción de la expresión de DR4 y DR5, el aumento de la expresión de las proteínas



**Figura 2. Mecanismo de la apoptosis inducida por taxanos y análogos de sustrato.** La apoptosis extrínseca tipo I inducida por los taxanos EpoB y PTX y el análogo de sustrato 5-FU inicia con la liberación de TRIAL por la célula A, la formación de DISC después de la unión de TRIAL con los receptores DR4 o DR5 en la célula B activa a las caspasas -8 y -3; la caspasa-3 continúa el proceso independiente de la mitocondria que culmina en la muerte de la célula B por apoptosis. Abreviaturas: EpoB, epotilona B; PTX, paclitaxol; 5-FU, 5-fluorouracilo; TRAIL, ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral; DR, receptor de la muerte; FADD, proteína portadora del dominio de la muerte asociado a Fas; DISC, complejo de señalización de inducción a la muerte celular.

proapoptóticas y la disminución de la expresión de las proteínas antiapoptóticas, con estos eventos se forma el complejo de señalización de inducción de muerte y se induce el proceso apoptótico (20, 21).

### Heterogeneidad de efectos farmacológicos y toxicológicos en la apoptosis inducida por los antineoplásicos

El estudio de los mecanismos por los cuales los antineoplásicos inducen apoptosis enfrenta otros aspectos que aumentan su complejidad: a) No es posible establecer una relación lineal entre la concentración de las moléculas blanco del antineoplásico y sus efectos farmacológicos, b) No se puede correlacionar la magnitud del daño con la capacidad del antineoplásico para inducir apoptosis y c) En las células neoplásicas puede haber subpoblaciones con distintas respuestas al fármaco y a la dosis que dependen de su metabolómica.

a) Relación entre la concentración de la molécula blanco y el efecto farmacológico del antineoplásico

Las topoisomerasas I y II son la molécula blanco de las antraciclinas, su inhibición provoca tensión en la molécula de DNA durante la replicación y genera rompimiento en las cadenas; por lo tanto el porcentaje de DNA fragmentado y la cantidad de uniones covalentes DNA-topoisomerasa se utilizan como índices de daño por estos antineoplásicos.

En ensayos *in vitro* con líneas celulares de carcinoma de testículo (SuSa, 833K y GH) y de carcinoma de vejiga (RT4, RT112 y HT1376) incubadas con (m-AMSA), DTX y ectoposido (VP16) se cuantificó el porcentaje del DNA fragmentado y la cantidad de uniones covalentes DNA-topoisomerasa. Las líneas celulares derivadas de testículo fueron más sensibles a la acción de los fármacos que las líneas derivadas de vejiga. El índice de daño en las células de testículo fue hasta 20 veces mayor



que en las líneas celulares de vejiga; sin embargo, la cantidad de la topoisomerasa II fue solo el doble de la encontrada en células de vejiga. Estos datos indican que si bien el nivel de expresión de la topoisomerasa II determina la sensibilidad a las antraciclinas, no hay una relación lineal entre la expresión de la molécula blanco y los índices de daño, lo que sugiere que existen factores adicionales involucrados en el efecto farmacológico de estos antineoplásicos (22).

### *b) Correlación entre la magnitud del daño a la célula neoplásica y su efecto farmacológico*

El mecanismo de acción de los agentes alquilantes es la formación de aductos con la molécula del DNA que provocan entrecruzamientos inter e intracatenarios y conducen a la apoptosis. En ensayos *in vitro* se incubaron once líneas celulares de linfoma de Burkitt con la mostaza nitrogenada HN2, un potente alquilante. No se encontraron diferencias entre las diversas líneas celulares con respecto al número de entrecruzamientos finales ni con respecto a su cinética de entrecruzamiento. Sin embargo, si se encontraron notables diferencias de sensibilidad entre las diferentes líneas celulares. La concentración necesaria para llevar a apoptosis al 50% de las células ( $LD_{50}$ ) y la concentración necesaria para inhibir el crecimiento tumoral al 50% ( $ID_{50}$ ) fueron significativamente menores en la líneas CA46 y MC116, mientras que las líneas Nawalwa y JLP119 fueron las más resistentes (23).

En otro estudio se obtuvieron resultados similares en células aisladas de cáncer metastásico de testículo y de vejiga incubadas con cisplatino (CPL). Las líneas celulares tumorales SuSa y 833K derivadas de testículo son altamente sensibles al CPL, mientras que las líneas celulares RT112 y RT4 de cáncer de vejiga se caracterizan por la resistencia al CPL relacionada con la frecuencia de mutaciones espontáneas inducidas por el antineoplásico. Las dos líneas celulares derivadas de cáncer vejiga fueron las de mayor frecuencia de mutaciones (células RT112) y las de frecuencia de mutación más baja (células RT4) lo que indica que no hay correlación entre la frecuencia de mutaciones como resultado de la formación de aductos entre el DNA y el CPL y la sensibilidad a este fármaco (24).

### *c) La sensibilidad a un mismo fármaco es diferente para cada subpoblación de células neoplásicas*

Al incubar con Ara-C a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ , las células de leucemia aguda (HL-60) que murieron durante las primeras 4 h lo hicieron por apoptosis; después de 8 h un 40% de la población

sobreviviente murió por apoptosis y entre las 12 y las 36 h el mayor porcentaje de las células que murieron lo hicieron por necrosis. Al aumentar la concentración de Ara-C la muerte celular ocurrió en menor tiempo, pero las proporciones de muerte por apoptosis/necrosis no se modificaron. Lo anterior reveló la existencia, dentro de una misma población celular, de subpoblaciones con diferente respuesta a una misma dosis y tipo de antineoplásico (25).

### **Apoptosis inducida por $\text{H}_2\text{O}_2$**

El término "especies reactivas" se refiere a metabolitos del oxígeno molecular (ROS) o productos de la reacción entre el oxígeno y el nitrógeno (RNS) caracterizados por ser más reactivos que el  $\text{O}_2$  a partir del cual se originaron. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es una especie reactiva generada principalmente por la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) teniendo como sustrato al radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), y en menor proporción por otras oxidasas como las xantinas (26, 27, 28).

La concentración intracelular del  $\text{H}_2\text{O}_2$  se encuentra en un rango desde picomolar hasta 100  $\mu\text{M}$ , a las cuales participa en importantes procesos fisiológicos, entre ellos la inducción a apoptosis. No obstante, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede ser tóxico aún a estas concentraciones debido a que en presencia de metales de transición como el  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{Cu}^{1+}$  puede formar al radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ), un radical altamente reactivo, involucrado en el daño oxidativo a lípidos, proteínas y DNA; el citocromo C y las enzimas catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), tioredoxina y peroxiredoxina protegen a la célula del riesgo de daño oxidativo por el incremento de la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (27, 28).

La evidencia de la participación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la inducción a apoptosis proviene de ensayos *in vitro* en donde se añade directamente el  $\text{H}_2\text{O}_2$  al medio y se evalúan diversos marcadores de apoptosis y los resultados se contrastan con los obtenidos en presencia de algún antioxidante endógeno como la catalasa o exógeno como el antioxidante trolox. En timocitos incubados con 0.5-10  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y sulfato ferroso (0.1 mM) se identificaron cambios estructurales y fragmentación del DNA característicos de apoptosis. La frecuencia de estos cambios en el DNA disminuyó al añadir trolox al medio de cultivo, lo que hace proponer al  $\text{H}_2\text{O}_2$  como inductor de la apoptosis (29).

El papel del  $\text{H}_2\text{O}_2$  como activador o inhibidor de la apoptosis depende de su interacción con el citocromo C, las proteínas MAPK, ERK, p38 y JNK, la proteína de choque térmico HSP27 y las caspasas -3, -8 y -9. La concentración de este oxidante es crítica, a una concentración menor a 100  $\mu\text{M}$  el  $\text{H}_2\text{O}_2$

**Tabla 2**

**Participación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como activador o inhibidor de la apoptosis.** La concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un factor crítico, a concentraciones menores de 100 μM actúa como activador de la apoptosis, a concentraciones iguales o mayores tiene un papel antiapoptótico.

Modelo	Molécula de interacción con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Efecto proapoptótico del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Efecto antiapoptótico del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Células CHO (30)	Citocromo C	Inducción de actividad de peroxidasa	Autooxidación
Células MCF-7 (31)	MAPK, ERK, p38 y JNK	Activación por fosforilación	Inactivación por MKP-1
Células Jurkat (33, 34)	Caspasas -3, -8 y -9	Proteólisis de sitios internos	Oxidación de residuos de cisteína de sitios catalíticos
Células HeLa (32)	HSP27		Aumento de expresión

actúa como inductor de la apoptosis, mientras que a una concentración igual o mayor se sobrepasa la capacidad de los sistemas antioxidantes y se inhibe el proceso apoptótico (30).

En células de ovario de hámster (CHO) el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un inductor de la apoptosis mediada por la liberación del citocromo C cuando su actividad de peroxidasa oxida a la cardiolipina; a concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mayores a 100 μM induce la autooxidación del citocromo C que provoca el rompimiento del enlace Fe-Met<sub>80</sub> y la inhibición de la apoptosis (30).

En células MCF-7 derivadas de cáncer de mama el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce apoptosis independiente de caspasas mediada por la fosforilación de las proteínas MAPK, ERK, p38 y JNK; el aumento de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementa la expresión de MKP-1, una proteína de respuesta temprana al estrés que inhibe la activación de la apoptosis por las vías p38 y JNK (31).

En células HeLa los microtúbulos del citoesqueleto se fragmentan cuando las células se incuban con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración menor de 100 μM. A partir de 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se encontró un incremento de la expresión de la proteína de choque térmico HSP27, así como su fosforilación mediada por la MAPKAP cinasa-2. La proteína HSP27 activada actúa como proteína de protección de la actina-F y evita la apoptosis (32).

### Apoptosis mediada por el daño oxidativo generado por los antineoplásicos

El daño oxidativo se refiere a la oxidación de las macromoléculas: carbohidratos, lípidos, proteínas o ácidos nucleicos por ROS o RNS que provoca alte-

raciones estructurales y funcionales, y tiene como resultado daños metabólicos, alteraciones celulares e incluso la muerte por apoptosis o necrosis (28).

El tratamiento con antineoplásicos puede incrementar el estrés oxidativo y modificar la actividad del sistema antioxidante. Se han realizado diversos ensayos, en su mayoría *in vitro*, para dilucidar si el estrés oxidativo es un mecanismo de acción requerido para el efecto farmacológico de los antineoplásicos o es parte de su toxicidad.

### *Apoptosis inducida in vitro por el metabolismo de la ciclofosfamida*

La CTX tiene una biotransformación por el citocromo P450 hepático y como resultado se produce la mostaza fosforamida (PAM), el metabolito con actividad antineoplásica responsable de la formación de aductos con el DNA que conducen a la activación de la apoptosis. En las etapas iniciales de la biotransformación se forman metabolitos altamente inestables, entre ellos el 4-hidroxiperóxido (4-HC) que se convierte sin activación metabólica en 4-hidrociclofosfamida (4-hidroxi-CTX), este último es el precursor de PAM. Durante la transformación de 4-HC a 4-hidroxi-CTX se produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y, mediante la reacción de Fenton se genera ·OH. El hidroxilo forma aductos que provocan la fragmentación del DNA e inducen la muerte por apoptosis (35).

Se ha demostrado la relación entre el incremento en la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la transformación del 4-HC, el daño al DNA y la activación de la apoptosis. En células HL-60 aisladas de leucemia humana, incubadas por separado con 4-HC o con CTX el porcentaje de células con daño al DNA

**Tabla 3**

**Esquema que muestra el incremento de especies reactivas del oxígeno y alteraciones al sistema antioxidantes por efecto de los antineoplásicos.** En diversos ensayos se ha observado un incremento en la generación de ROS, principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como efecto de los antineoplásicos. El incremento en la generación de ROS modifica la concentración y la actividad de diversos componentes del sistema antioxidante y provoca daño oxidativo. Las ↑ indican incremento y ↓ disminución. Abreviaturas: ROS, especies reactivas del oxígeno; CTX, ciclofosfamida, DTX, doxorubicina; 5-FU, 5-fluorouracilo; MTX, metotrexano; vinicristina, VCT; procarbazona (PCZ); cisplatino, CPL; dactinomicina, DTM; bleomicina, BMA; LPX, lipoperoxidación; TAC, capacidad antioxidante total; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GPX, glutatión peroxidasa; GST, glutatión S transferasa, GR, glutatión reductasa.

Modelo	Anti-neoplásico	ROS (Generación)	Daño Oxidativo		Sistema Antioxidante		
			LPX (Concentración MDA)	TAC (Equiv. trolox)	Enzima (Actividad)	Endógenos (Concentración)	Exógenos (Concentración)
Leucocitos aislados de linfomas y sarcoma (34)	BMA	O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ↑	↑				
Sangre y plasma de pacientes diversos tipos de cáncer (42, 43)	CTX, 5-FU y DTX	↑	↑				
Plasma de pacientes cáncer de pulmón (37)	DTX y CTX		↑	↓			
Células humanas cáncer próstata (44)	CPL	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ↑	↑				
Cardiomiocitos (38)	DTX	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ↑			GPX ↓		
Tejido cardíaco de ratas (35)	CTX		↑		SOD, CAT, GPX, GST, GR ↓	Ceruloplasmina ↓	Vitaminas E C ↓
Tejido renal de ratas (37)	CPL				CAT, SOD GPX ↓		
Enterocitos de ratas (40)	MTX	↑					

(fragmentación y formación de aductos 8-oxodG) y de células en apoptosis fue mayor cuando se incubaron con 4-HC; el efecto fue mayor al añadir NADH y Cu(II) al medio y disminuyó en presencia de catalasa y quelantes de cobre y no se observó en las células HP100, una clona que expresa una actividad de catalasa 18 veces mayor que HL-60. Los autores sugieren que la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

en la conversión de CTX en 4-HC podría contribuir, junto con el entrecruzamiento de las cadenas de DNA provocado por PAM, a la apoptosis inducida por CTX (35). Si bien estos resultados sugieren que la apoptosis inducida por CTX depende de la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante el metabolismo del fármaco, *in vivo* no se ha demostrado la relación entre el estrés oxidativo y la apoptosis. La eviden-

cia *in vivo* indica que la activación de la apoptosis depende de la formación de aductos entre PAM y el DNA sin la participación del estrés oxidativo (36).

#### *Nefrotoxicidad inducida por el metabolismo del cisplatino*

La apoptosis de células neoplásicas inducida por el tratamiento con cisplatino se activa por la formación de aductos entre el fármaco y el DNA y de entrecruzamientos, intra e intercatenarios en esta molécula. Se ha encontrado que el tratamiento con cisplatino está asociado al daño oxidativo: aumenta la concentración de malondialdehído, disminuye la concentración de glutatión de reducido (GSH) y la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GPX) en riñón y testículos de ratas. La nefrotoxicidad es uno de los principales efectos toxicológicos del tratamiento con cisplatino y se ha relacionado con la apoptosis de células del túbulo renal. La mitocondria es uno de los blancos del daño oxidativo debido a la oxidación de los grupos sulfhidrilo de algunas proteínas mitocondriales, a la inhibición de la entrada de calcio y a la reducción del potencial de membrana; el daño oxidativo a enzimas de la cadena respiratoria provoca la disminución de los niveles de ATP, el aumento en la lipoperoxidación y la reducción de la actividad del sistema antioxidante en tejido renal (37).

Efecto toxicológico y farmacológico del metabolismo de la doxorubicina

En células endoteliales aórticas de bovino (BAEC) y en cardiomiocitos el tratamiento con DTX incrementa la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Durante el metabolismo de la DTX se genera  $H_2O_2$ , el cual junto con el aumento del flujo de  $Ca^{2+}$  induce la expresión de eNOS, el incremento en la velocidad de generación de  $\cdot NO$  activa señales proapoptóticas. La participación del estrés oxidativo en la toxicidad del tratamiento con DTX se corrobora debido a que el co-tratamiento con antioxidantes aumenta la expresión de las proteínas antiapoptóticas Hsp70 y Bcl2 (29). Por otra parte, la apoptosis inducida por DTX en células neoplásicas es provocada por su interacción con la topoisomerasa I y no se ha comprobado la participación del estrés oxidativo (38).

#### **Incremento de especies reactivas del oxígeno y alteraciones en el sistema antioxidante durante el tratamiento con antineoplásicos**

La evidencia *in vivo* e *in vitro* demuestra que el metabolismo óxido-reductor de los antineoplásicos incrementa la generación de ROS, principalmente de  $H_2O_2$  y puede alterar la concentración o la acti-

vidad de los componentes del sistema antioxidante y causar daño oxidativo en células libres de cáncer. El estrés oxidativo podría contribuir a la toxicidad asociada al tratamiento con antineoplásicos.

En ensayos *in vitro* con cardiomiocitos se detectó un incremento en la generación de  $H_2O_2$  acompañado de la disminución de la actividad de GPX, la enzima antioxidante más abundante en el corazón y principal mecanismo de reducción del  $H_2O_2$  en este órgano; lo que hace suponer que la cardiotoxicidad, un efecto tóxico secundario muy grave durante el tratamiento con DTX, es consecuencia de estas alteraciones en el metabolismo oxidativo (39). En estudios con ratas se observó un aumento en la LPO del tejido renal, disminución de las enzimas SOD, CAT y GPX y aumento de apoptosis después de una dosis única de CPL; es probable que de esta forma se genere la nefrotoxicidad, una de las principales toxicidades de este fármaco (37).

El aumento del estrés oxidativo inducido por antineoplásicos en órganos libres de cáncer se ha detectado incluso cuando el fármaco no ingresa al órgano afectado. La inflamación generalizada de las mucosas, mucositis, es uno de los efectos tóxicos más frecuentes e inespecíficos del tratamiento con antineoplásicos y uno de los factores que provocan náusea y diarrea inmediatamente después de la administración, aun cuando el fármaco o sus metabolitos no se han distribuido sistémicamente. El incremento de la permeabilidad celular de los enterocitos se relaciona con el aumento de la generación de ROS, mayor actividad de mieloperoxidasa y una mayor LPO en fragmentos de intestino aislados de ratas previamente tratadas con MTX lo que indica que estos cambios no son provocados por la entrada directa del antineoplásico a la célula (40).

La alteración de la memoria a corto plazo, la disminución de la capacidad de orientación espacial, los problemas motrices y de concentración durante o después de haber recibido tratamiento con antineoplásicos que presentan algunos pacientes es conocido como "chemo brain". Este efecto tóxico resulta de particular interés debido a que no obstante la imposibilidad de los fármacos o sus metabolitos para atravesar la barrera hematoencefálica, por medio de técnicas de imagen se han detectado cambios morfológicos en el cerebro asociados con incremento de LPO en plasma, y en modelos animales se ha detectado daño oxidativo en lípidos y proteínas del cerebro y aumento de la apoptosis neuronal (41, 42, 43, 44). En ensayos animales se ha detectado un aumento de la concentración del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) en el

cerebro de animales tratados con antineoplásicos, es factible que el  $O_2^{\cdot-}$  generado durante el metabolismo de DTX induzca la oxidación de proteínas en plasma y con ello se incrementa la secreción de TNF- $\alpha$  por macrófagos; el TNF- $\alpha$  puede llegar al cerebro, atravesar la barrera hematoencefálica y generar estrés oxidativo al aumentar la actividad de la NOS (42).

### **El tratamiento con antioxidantes y la efectividad del antineoplásico**

El estrés y el daño oxidativo pueden disminuirse al administrar antioxidantes antes o durante el tratamiento con antineoplásicos. En ensayos *in vivo* el escualeno evitó la disminución de la actividad enzimática de SOD, CAT, GTX, GR y GST y de la concentración de vitamina C, vitamina E y ceruloplasmina en plasma provocado por CTX (45), el licopeno disminuyó la nefrotoxicidad durante el tratamiento con CPL (46) y la N-acetilcisteína los efectos del MTX en los enterocitos (40, 47). En grupos de pacientes bajo distintos esquemas de tratamiento también se han reportado mejorías en el estado general cuando el tratamiento antineoplásico va acompañado de la administración de antioxidantes. Los resultados *in vivo* y en pacientes sugieren que el uso de antioxidantes no disminuye la eficacia de los antineoplásicos y si contribuye a disminuir el daño oxidativo provocado por estos fármacos.

#### *Aumento de la concentración de GSH y la resistencia al cisplatino*

No obstante la evidencia a favor del empleo de antioxidantes durante el tratamiento con antineoplásicos, su uso se toma con cautela ante la posibilidad de que el estrés y el daño oxidativo sean necesarios para lograr el efecto farmacológico de los antineoplásicos. Más aún en algunos casos se ha encontrado una correlación entre el aumento de la concentración de los antioxidantes y la resistencia al antineoplásico.

En varios trabajos se ha encontrado correlación entre la concentración de GSH y la quimioresistencia al CPL. En las células Hep2 de carcinoma humano de laringe, resistentes al cisplatino, la concentración de GSH es mayor que en las líneas celulares sensibles a este antineoplásico (48). Incluso en las células resistentes, como las células tumorales T24 de vejiga, la inducción a apoptosis por cisplatino aumenta cuando las concentraciones intracelulares de GSH disminuyen (49).

La resistencia al CPL y su relación con la concentración de GSH puede ser el resultado de varios

procesos: a) Conjugación del GSH con el cisplatino para facilitar su salida de la célula; b) Reducción de la formación de aductos entre el cisplatino y el DNA debido a la conjugación entre el GSH y el cisplatino, c) Inhibición de la apoptosis por BCL-2 mediada por una vía antioxidante regulada por los niveles de GSH.

#### *a) Conjugación del GSH con el cisplatino para facilitar la salida de la célula*

El GSH se conjuga con el cisplatino por la actividad de la glutatión-S-transferasa (GST), el CPL conjugado con GSH puede salir de la célula por medio de los transportadores MRP2/cMOAT y MRP1/GS-X (50). Sin embargo, la correlación entre la formación del conjugado de cisplatino parece ser específica para ciertos tipos celulares; en líneas celulares de glioblastoma, adenocarcinoma de colon y de pulmón (52, 53) la expresión de GST es mayor en las células quimioresistentes pero en células de cáncer de ovario (52) o de pulmón (51) no se ha encontrado correlación entre la quimioresistencia al CPL y el nivel de expresión de GST. De la misma manera, algunas líneas resistentes al CPL tienen mayor número de transportadores MRP2/cMOAT y MRP1/GS-X en comparación a las líneas sensibles (53).

#### *b) Inhibición de la formación de aductos entre el cisplatino y el DNA debido a la conjugación entre el GSH y el cisplatino*

Los resultados de los ensayos *in vitro* con células HeLa o Me 665 de melanoma indican una relación entre el nivel de expresión de la gamma glutamil transpeptidasa (GGT), la conjugación entre el CPL y el GSH y la resistencia al fármaco (54), lo que sugiere que la conjugación del CPL con el GSH impide la unión del antineoplásico con otros nucleófilos celulares, como el DNA e inhibe la formación de aductos necesaria para la inducción a la apoptosis (53). Sin embargo, en ensayos *in vivo* ocurre lo contrario, a mayor expresión de la GT mayor eficacia del cisplatino lo que quiere decir que *in vivo* no hay una relación entre la actividad enzimática de la GGT y la apoptosis inducida por CPL (53, 55).

#### *c) Inhibición de la apoptosis por BCL-2 mediada por una vía antioxidante regulada por los niveles de GSH*

Diversos trabajos sugieren que la proteína BCL-2 inhibe la apoptosis mediante una vía antioxidante, especialmente a través de la regulación de los niveles de GSH. En células HeLa la sobreexpresión

de BCL-2 inhibe en un 30% la actividad de los transportadores RsGshT sinusoidales dependientes de metionina y responsables de la salida del GSH al plasma y no modifica la actividad de la gamma glutamilcisteína sintetasa (GGS), la enzima que forma al GSH; por lo tanto la concentración intracelular de GSH aumenta en un 60% (56), el GSH llega al núcleo en donde actúa como un inhibidor de la actividad de las caspasas. Se ha demostrado que la actividad antiapoptótica de BCL-2 se debe a su capacidad para regular la concentración del GSH, la adición de N-acetilcisteína al medio o añadir directamente el GSH al interior del núcleo inhibe la apoptosis aun en células que sobreexpresan BCL-2. Por otra parte, en células derivadas de linfoma de ratón incubadas con dietil maleato o diamina, como agentes que disminuyen la concentración de GSH, se incrementa la susceptibilidad a la apoptosis inducida por radiación en células que sobreexpresan BCL-2, lo que confirma que el papel antiapoptótico de BCL-2 se debe a su capacidad para regular las concentraciones intracelulares de GSH (57).

La proteína BCL-2 puede inhibir la apoptosis por una vía actividad por  $H_2O_2$  a concentraciones iguales o mayores de  $100 \mu M$ ; esta activación puede conducir al incremento de la actividad de SOD citoplasmática en las células NT-2 (teratocarcinoma) y de catalasa en células de neuroblastoma (SK-N-MC). El incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes no impide la LPO o el daño al DNA en ninguna de las dos líneas celulares (58). Sin embargo, BCL-2 no repara el daño al DNA, la inhibición de la apoptosis por sobreexpresión de BCL-2 en las células con daño oxidativo puede incrementar la tasa de la mutagénesis, incrementando el riesgo de carcinogénesis (59).

#### *Diferencias en la sensibilidad a los antineoplásicos entre células neoplásicas y células no neoplásicas*

Existen diferencias entre las células cancerosas y las células no cancerosas en cuanto a la relación entre la concentración de especies reactivas del oxígeno y la sensibilidad a los antineoplásicos. Las alteraciones metabólicas de las células cancerosas, especialmente el aumento del metabolismo anaeróbico durante el llamado efecto Walburg, producen un estado inherente de estrés oxidativo. Se ha encontrado que en las células neoplásicas la generación de ROS y RNS es mayor que en células no neoplásicas, y existe un incremento de la expresión de proteínas antioxidantes como SOD y catalasa, probablemente como un mecanismo de protección contra el daño oxidativo. Así mismo, el aumento en la concentración de ROS durante el

tratamiento con algunos antineoplásicos induce un incremento en su capacidad antioxidante.

En ensayos con células de leucemia el 2-metoxiestradiol (2-ME) inhibe la actividad de SOD e inducen la acumulación de superóxido ( $O_2^{\cdot}$ ) como parte de su mecanismo de acción y parece ser selectivo para células cancerosas. De igual manera se ha encontrado que en células aisladas de pacientes con cáncer de ovario, la inhibición de SOD por 2-ME también induce la apoptosis. Estos datos sugieren que el  $O_2^{\cdot}$  participa en la inducción a la apoptosis, y apoya la hipótesis de que la actividad de las enzimas antioxidantes es mayor en las células neoplásicas; sin embargo no son concluyentes debido a que la expresión de SOD varía entre células y tejidos y en algunos casos incluso es menor en células neoplásicas (60).

#### *Empleo de antioxidantes sin disminución del efecto farmacológico de los antineoplásicos*

En contraste con la evidencia del efecto antiapoptótico de los antioxidantes *in vitro*; en modelos animales se ha demostrado que la coadministración con antioxidantes no disminuye el comportamiento antitumoral de DTX ni de CPL, sino que además, aumenta la supervivencia de los animales (61). Adicionalmente, en ratones con carcinoma de colon tratados con catalasa intravenosa se puede observar una reducción de las metástasis a hígado (62).

En líneas celulares de carcinoma de mama humano, la incubación con vitamina C aumentó el efecto farmacológico de la DTX, el CPL y el paclitaxel aún en aquellas líneas celulares resistentes a los antineoplásicos (63). De la misma manera, en las células neoplásicas escamosas incubadas con el CPL y con el carboplatino, el 1,25-dihidroxi-16-ine-colecalciferol (Ro23-7553), un análogo del metabolito activo de la vitamina D, incrementó el número de las células que se mantuvieron en arresto en  $G_0-G_1$ , redujo el tamaño del tumor así como el número y tamaño de las metástasis (64).

Por otra parte, el tratamiento con una mezcla de plantas con propiedades antioxidantes, usadas en la medicina tradicional china en un modelo animal de cáncer hepático tratado con DTX, disminuyó la LPO y aumentó la concentración del GSH y la actividad de las enzimas CAT y SOD, también disminuyó la apoptosis de células no neoplásicas del riñón (órgano no afectado) y en el hígado (órgano afectado por cáncer) sin diferenciar células neoplásicas o no neoplásicas y no obstante la menor apoptosis global de las células del órgano afectado la supervivencia de los animales se incrementó en 50% (65).

Así mismo, la administración diaria de vitamina C (2 g/Kg) a ratones y cobayos con leucemia

tratados con DTX (5 mg/kg), protegió del daño estructural a los miocardiocitos, evitó el aumento de LPO en el corazón y prolongó el periodo de sobrevivencia del animal (66).

### Terapéutica en el uso de antioxidantes en el cáncer

Se estima que el consumo de antioxidantes por pacientes durante el tratamiento con antineoplásicos varía entre 10-87%, el amplio rango se debe a diferencias por tipo de cáncer, edad, educación, nivel socioeconómico y grupo étnico. En muchos casos los pacientes toman la decisión de utilizar antioxidantes como suplemento, con o sin la autorización del médico; en los casos en donde los antioxidantes se han utilizado como parte del tratamiento para aliviar los efectos tóxicos indeseables predomina el uso de glutatión, melatonina, vitaminas A, C y E, N-acetilcisteína, ácido elágico y mezclas de plantas medicinales propias de la cultura local. En una revisión del estado del arte Block y cols. encontraron que el uso de GSH en protocolos clínicos disminuía en 58% o más la neurotoxicidad, permitía completar los ciclos de tratamiento con antineoplásicos programados e incrementaba la sobrevivencia; en el 35% de los pacientes que tomó melatonina disminuyeron síntomas relacionados con los efectos secundarios a corto plazo: pérdida de peso, náuseas, vómito, fatiga y no se encontraron diferencias en la sobrevivencia entre estos pacientes y el grupo control. Solo un protocolo que utilizó N-acetilcisteína cumplió los criterios de inclusión del análisis efectuado por Block y cols., el objetivo inicial del uso de este antioxidante era prevenir la cardiotoxicidad, no se encontraron diferencias entre los pacientes tratados y aquellos que recibieron placebo, no obstante el 50% de los pacientes tratados con el antioxidante tuvieron remisión parcial, contra el 35% de los que consumieron un placebo; en el caso del empleo de vitamina C o mezcla de hierbas de la medicina tradicional no se encontraron diferencias entre los pacientes tratados y el grupo control, mientras que con el uso de las vitaminas A y E el porcentaje de pacientes que mostraron mejoría fue significativamente mayor al compararlos con los pacientes que recibieron placebo (67).

No obstante lo anterior, el uso de antioxidantes no es una práctica estándar durante el tratamiento con antineoplásicos. La cautela en su uso se debe en parte, a la falta de certeza sobre la participación del estrés oxidativo en el efecto farmacológico de


los antineoplásicos. Aun cuando existe evidencia *in vitro* que apoya lo anterior, en ensayos *in vivo* se ha comprobado que el estrés oxidativo forma parte de la toxicidad y no participa en la apoptosis inducida por los antineoplásicos.

Los resultados de ensayos *in vivo* y de protocolos clínicos sobre el uso de antioxidantes son alentadores, no obstante es preciso continuar con las investigaciones al respecto que permitan a) Homologar condiciones de ensayo y establecer criterios para hacer comparativos los resultados y cuantificar el beneficio del tratamiento, b) Ampliar el número de fármacos a estudiar y diseñar ensayos con combinaciones de antineoplásicos tal como ocurre en el tratamiento con los pacientes, c) Considerar la heterogeneidad del tumor y las diferentes respuestas al antineoplásico de las clonas de células neoplásicas que lo forman.

### Conclusiones

El  $H_2O_2$  es un inductor de la apoptosis y en el caso de algunos fármacos se genera durante su metabolismo, esta evidencia ha hecho suponer que el estrés oxidativo es requerido para el efecto farmacológico. Sin embargo, se ha demostrado que el  $H_2O_2$  induce a apoptosis por vías diferentes a las que utiliza para generar su efecto oxidante sistémico y que los antioxidantes reducen los efectos tóxicos oxidantes en células no neoplásicas sin disminuir la apoptosis de las células neoplásicas inducida por los antineoplásicos. Los antioxidantes protegen del daño oxidativo a los órganos libres de cáncer e incluso, en algunos casos, pueden potenciar el efecto antitumoral de los fármacos disminuyendo las metástasis o aumentando las probabilidades de sobrevivencia.

Los resultados a favor y en contra del uso de los antioxidantes deben analizarse en su contexto, la interacción antineoplásico-célula-antioxidante depende del tipo de fármaco o de la combinación de ellos en el tratamiento, del tipo de cáncer y de las subclonas que forman parte de la población tumoral, del tipo y combinación de antioxidantes y de condiciones genéticas y fisiológicas particulares de la persona enferma de cáncer.

La mejor comprensión del proceso de interacción antineoplásico-célula neoplásica-antioxidante es indispensable para establecer las condiciones del uso de los antioxidantes para proteger a los órganos libres de cáncer de los efectos tóxicos de los antineoplásicos sin disminuir el efecto farmacológico de éstos sobre las células neoplásicas. 

## REFERENCIAS

1. Almendro V, Marusyk A y Polyak K (2013) Cellular Heterogeneity and Molecular Evolution in Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 8:277-302
2. Priestman T (2012) *Cancer Chemotherapy in Clinical Practice*, Second Edition. Springer-Verlag, London, UK, pp 2-42.
3. Nowel P (1976) The clonal evolution of tumor cell population. *Science*, 194: 23-28.
4. Hanahan D. y Weinberg R. (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144: 646- 674.
5. Dy GK. y Adjei AA (2006) Principles of Chemotherapy. En *Oncology: An evidence-based approach*. Editor Chang A. Springer U.K. pp 14-40.
6. Burchman PC (2004) *An Introduction to Toxicology*. Springer, UK. pp 29-50.
7. Weij NI, Cleton FJ y Osanto S (1997) Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treatment Review* 23:209-240.
8. Aktipis CA, Boddy AM, Gatenby RA, Brown JS y Maley CC (2013) Life history trade-offs in cancer evolution. *Nature Rev. Cancer* 13:883-892.
9. Hickman JA (1992) Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer and Metastasis Reviews* 11:121-139.
10. Simões AP, Olie R, Gautschi O, Leech SH, Häner R, Hall J, Fabbro D, Stahel RA y Zangemeister-Wittke U (2000). bcl-xL antisense treatment induces apoptosis in breast carcinoma cells. *Int. J. Cancer* (87):582-590.
11. Chakraborty S, Mazumdar M, Mukherjee S, Bhattacharjee P, Adhikary A, Manna A, Chakraborty S, Khan P, Sen A, y Das T (2014) Restoration of p53/miR-34a regulatory axis decreases survival advantage and ensure Bax-dependent apoptosis of non-smal cell lung carcinoma cells. *FEBS Letters* (588):549-559.
12. Marzo I y Naval J (2008) Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy. *Biochemical Pharmacology* (76):939-946.
13. Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Emi M, Inoue H y Toge T (2002). Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Chemother Pharmacol* (50):343-352.
14. De Vos M, Schreiber V, Dantzer F (2012) The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: Current state of art. *Biochemical Pharmacology* (84):137-146.
15. Wu P, Zhu X, Jin W, Hao S, Liu Q y Zhang L (2015) Oxaliplatin triggers necrosis as well as apoptosis in gastric cancer SGC-7901 cells. *Biochem and Biophys Research Comm* (460):183-190.
16. López-Royuela N, Pérez-Galán P, Galán-Malo P, Yuste VJ, Anel A, Susín SA, Naval J y Marzo I (2010) Different contribution of BH3-only proteins and caspases to doxorubicin-induced apoptosis in p53-deficient leukemia cells. *Biochemical Pharmacology* (79):1746-1758.
17. Koceva-Chyta A, Jedrzejczak M, Skierski J, Kania K y Józwiak Z (2005) Mechanisms of induction of apoptosis by anthraquinone anticancer drugs aclarubicin and mitoxantrone in comparison with doxorubicin: Relation to drug cytotoxicity and caspase-3 activation. *Apoptosis* (10):1497-1514.
18. Rogalska A, Marczak A (2015) Epothilone B induces human ovarian cancer OV-90 cell apoptosis via external pathway. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (39):700-712.
19. Johnstone RW, Frew AJ y Smyth MJ (2008) The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset progression and therapy. *Nature Reviews Cancer* (8): 782-798.
20. Holoch PA y Griffith TS (2009) TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): A new path to anti-cancer therapies. *European Journal of Pharmacology* (625):63-72.
21. Wang H, Yang T y Wu X (2015) 5-Fluorouracil preferentially sensitizes mutant KRAS non-smal cell lung carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Molecular Oncology* (9):1815-1824.
22. Fry AM, Chresta CM, Davies SM, Walker MC, Harris AL, Hartley JA, Masters JRW y Hickson DI (1991) Relationship between Topoisomerase II Level and Chemosensitivity in Human Tumor Cell Lines. *Cancer Research* (51):6992-6995.
23. O`Connor PM, Wassermann K, Sarang M, Magrath I, Bohr VA y Kohn KW (1991) Relationship between DNA Cross-Links, Cell Cycle and Apoptosis in Burkitt`s Lymphoma Cell Lines Differing in Sensitivity to Nitrogen Mustard. *Cancer Research* (51):6550-6557.
24. Parris, CN, Walker, MC, Masters JW y Arlett C (1990) Inherent Sensitivity and Induced Resistance to Chemotherapeutic Drugs and Irradiation in Human Cancer Cell Lines: Relationship to Mutation Frequencies. *Cancer Research* (50):7513-7518.



25. Jianfeng Z, Yan C, Chongyu L, Jianping X, Dongjiao Y, Ping Z y Bianming W (1997) Ara-C induced apoptosis in human myeloid leukemia cell line HL-60: inducing apoptosis is the primary mechanism of chemotherapy. *Chinese Journal of Cancer Research* (3):183-187.
26. Seis H (2007) Total Antioxidant Capacity: Appraisal of a concept. *The Journal of Nutrition*. 137:1493-1495
27. Halliwell B (1999) *Free radicals in biology and medicine*. NY, Oxford University Press.
28. Konigsberg-Fainstein, M (2008) Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. México. Manual Moderno
29. Forrest V, Kang Y y McClain DE (1994) Oxidative stress-induced apoptosis prevented by trolox. *Free Radical Biology & Medicine* (16):675-684.
30. Kagan VE, Borisenko GG, Tyurina YY, Tyurin VA, Jiang J, Potapovich AI, Kini V, Amoscato AA y Fujii Y (1994) Interactions of cytochrome C with cardiolipin and phosphatidylserine. *Free Radical Biology & Medicine* (37):1963-1985.
31. Zohu JY, Liu Y y Wu GS (2006) The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in oxidative damage-induced cell death. *Cancer Res* (9):4888-4894
32. Huot J, Houle F, Spitz DR y Landry J (1996) HSP27 Phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res* (56):273-279.
33. Salvensen GS y Dixit V (1997) Caspases: Intracellular signaling by proteolysis. *Cell* (91):443-446.
34. Barbouti A, Amorgianiotis C, Kolettas E, Kanavaros P y Galaris D (2007) Hydrogen peroxide inhibits caspase-dependent apoptosis by inactivating procaspase-9 in an iron-dependent manner. *Free Radical Biology & Medicine* (43): 1377-1387.
35. Murata M, Suzuki T, Midorikawa K, Oikawa S y Kawanishi S (2004) Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. *Free Radical Biology & Medicine* (6):793-802.
36. Emadi A, Jones RJ y Brodsky RA (2009) Cyclophosphamide and Cancer: Golden Anniversary. *Nature Rev Clin Oncol* (6):638-647.
37. Saad S, Najjar Tao y Alashari M (2004) Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clin and Exper Pharm and Phys* (31):862-867.
38. Kalivendi SV, Kotamraju S, Zhao H, Joseph J y Kalyanaraman B (2001) Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of endothelial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* (276):47266-47276.
39. Doroshov J, Locker G y Myers CE (1980) Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites. *J Clin Invest* (65):128-135.
40. Maeda T, Miyazono Y, Ito K, Hamada K, Sekine S y Horie T (2010) Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats. *Cancer Chemother Pharmacol* (65):1117-1123.
41. Weijl NI, Cleton FJ y Osanto S (1997) Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treatment Reviews* (23):209-240.
42. Chen Y, Jungsuwadee P, Vore M, Butterfield DA y St. Clair DK (2007) Collateral damage in cancer chemotherapy: Oxidative stress in nontargeted tissues. *Molecular Interventions* (3): 147-156.
43. Sangeetha U, Das N, Koratkar R y Suryaprabha P (1990) Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer. *Free Radical Biology & Medicine* (8):15-19.
44. Look MP y Musch E (1994). Lipid peroxides in the polychemotherapy of cancer patients. *Chemotherapy* (40):8-15.
45. Senthilkumar S, Yogeeta SK, Subashini R y Devaki T (2006) Attenuation of cyclophosphamide induced toxicity by squalene in experimental rats. *Chemico-Biological Interactions* (160):252-260.
46. Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I, Ceribasi AO y Karaoglu A (2005) Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology* (212):16-123.
47. Itoh T, Terazawa R, Kojima K, Nakane K, Deguchi T, Ando M, Tsukamasa Y, Ito M y Nozawa Y (2010) Cisplatin induces production of reactive oxygen species via NADPH oxidase activation in human prostate cancer cell. *Free Radical Research* (9):1033-1039.
48. Brozovic A, Ambriovic-Ristov A y Osmak M (2010) The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Critical Reviews in Toxicology* (40):347-359.
49. Byun SS, Kim SW, Choi H, Lee C y Lee E (2005). Augmentation of cisplatin sensibility

- in cisplatin-resistant human bladder cancer cells by modulating glutathione concentrations and glutathione-related enzyme activities. *BJU International* (95): 1086-1090.
50. Suzuki H y Sugimaya Y (1998) Excretion of GSSG and glutathione conjugates mediated by MRP1 and cMOAT/MRP2. *Seminars in Liver Disease* (18):359-375.
  51. Steward DJ (2010). Tumor and host factors that may limit efficacy of chemotherapy in non-small cell and small cell lung cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (75):173-234.
  52. Van der Zee AGJ, Van Ommen B, Meijer C, Hollema H, van Bladeren PJ y de Vries EGE (1992). Glutathione S-transferase activity and isoenzyme composition in benign ovarian tumours, untreated malignant ovarian tumours, and malignant ovarian tumours after platinum/cyclophosphamide chemotherapy. *Br. J. Cancer* (6):930-936.
  53. Chen HH y Kuo MT (2010). Role of glutathione in the regulation of cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Metal-Based Drug*. 43 0939. doi:10.1155/2010/430939
  54. Hanigan M, Gallagher BC, Townsend DM y Gabarra V (1999)  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increases the resistance of tumors to cisplatin in vivo. *Carcinogenesis* (20):553-559.
  55. Franzini M, Corti A, Lorenzini E, Paolicchi A, Pompella A, De Cesare M, Perego P, Gatti L, Leone R, apostoli P y Zunino F (2006) Modulation of cell growth and cisplatin sensitivity by membrane  $\gamma$ -glutamyltransferase in melanoma cells. *European Journal of Cancer* (42):2623-2630.
  56. Meredith M, Cusik C, Soltaninassab, Sekhar K, Lu S y Freeman ML (1998) Expression of Bcl-2 increases intracellular glutathione by inhibiting methionine-dependent GSH efflux. *Biochemical and Biophysical Research Comm* (248):458-463.
  57. Voehringer DW (1998) BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radical & Medicine* (27):945-950.
  58. Lee M, Hyun DH, Marshall KA, Ellerby LM, Bredesen DE, Jenner P y Halliwell B (2001) Effect of overexpression of BCL-2 on cellular oxidative damage, nitric oxide production, antioxidant defenses, and the proteasome. *Free Radical Biology & Medicine* (31):1550-1559.
  59. Chernobennel-Lasserre C y Dosanjh MK (1997) Suppression of apoptosis by overexpression of Bcl-2 or Bcl-XL promotes survival and mutagenesis after oxidative damage. *Biocimie* (79):613-617.
  60. Oldham E, Liu J, Albitar M, Keating MJ y Huang P (2004) Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for the therapeutic selectivity. *Cancer Chemother Pharmacol* (53):209-219.
  61. Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuist GJ y H Joenje (1990). Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanism of cytotoxicity. *Pharmac. Ther* (47):219-231.
  62. Nishikawa M, Tamada A, Hyoudou K, Umeyama Y, Takashashi Y, Kobayashi Y, Kumai H, Ishida E, Staud F, Yabe Y, Takakura Y, Yamashita F, Hashida M (2004) Inhibition of experimental hepatic metastasis by targeted delivery of catalase in mice. *Clinical & Experimental Metastasis* (21):213-221.
  63. Kurkucher CM, Wagner U, Kolster B, Andreotti PE, Krebs D y Bruckner HW (1996). Ascorbic acid (vitamin C) improves the antineoplastic activity of doxorubicin, cisplatin and paclitaxel in human breast carcinoma cells in vitro. *Cancer Letters* (103):183-189.
  64. Ligth BW, Yu WD, McElwain MC, Russell DM, Trump DL y Johnson CS (1997). Potentiation of cisplatin antitumor activity using a vitamin D analogue in a murine squamous cell carcinoma model system. *Cancer Res.* (57):3759-3759.
  65. Qin XJ, He W, Hai CX, Liang X y Liu R (2008) Protection of multiple antioxidants Chinese herbal medicine on the oxidative stress induced by adriamycin chemotherapy. *Journal of Applied Toxicology* (28):271-282.
  66. Shimpo K, Nagatsu T, Yamada K, Sato T, Niimi H, Shamoto M, Takeuchi T, Umezawa H y Fujita K (1991) Ascorbic acid and adriamycin toxicity. *American J Clin Nutr.* (54):1298S-1301S.
  67. Block K.I, Koch A.C, Mead M.N, Tothy P.K, Newman R.A y Gyllenhaal C (2007) Impact of antioxidant supplement on chemotherapeutic efficacy: A systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *Cancer Treatment Reviews* (33):407-418.