



**Facultad de Medicina
Departamento de Ciencias Biomédicas**

**“Efecto del Resveratrol sobre la
proliferación e invasión en líneas de
Cáncer Gástrico AGS y MKN45: Posible
relación entre SOD, NF-kB y Heparanasa”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en
Biología Celular y Molecular**

DANIEL IVÁN ROJO VERA

Director de Tesis: Joan Villena García

Supervisor Programa: Mario Párraga San Román

DICIEMBRE 2014



**Facultad de Medicina
Departamento de Ciencias Biomédicas**

**“Efecto del Resveratrol sobre la
proliferación e invasión en líneas de
Cáncer Gástrico AGS y MKN45: Posible
relación entre SOD, NF-kB y Heparanasa”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en
Biología Celular y Molecular**

DANIEL IVÁN ROJO VERA

Realizado en:

**Departamento Ciencias Biomédicas
Edificio Bruno Gunther
Facultad de Medicina
Universidad de Valparaíso**

Director de Tesis: Joan Villena García

Supervisor Programa: Mario Párraga San Román

DICIEMBRE 2014

A mi mujer, hija y los que vendrán...

*Quando llevo a la casa
estas ahí,
y amarramos los sueños...
Laborando el comienzo de una historia
sin saber el fin.*

Victor Jara

*A la ronda, ronda
Mi mayor fortuna
es mi mariposa
En capullo cuna.*

Charo Cofré

Agradecimientos

Agradezco a cada una de las personas sin las cuales la realización de esta Tesis no hubiera sido imposible.

A Rosita, que sin tu apoyo ni siquiera esta oración existiría.

A mis 2 familias, la nortina y la de Viña, por su ayuda y apoyo en todo.

A todo el equipo docente del Magíster en Ciencias Médicas, que en sus cátedras y consejos me ayudaron a descubrir el, hasta ese minuto, inexplorado trabajo de laboratorio de investigación.

A Tamara, Eduardo, Yasenka e Iván, ya que sin su ayuda aún estaría en el laboratorio intentando obtener resultados.

A la Doctora María Aparecida S. Pinhal, por su amabilidad en realizar experimentos que contribuyeron a la finalización de esta tesis, junto a las gestiones del Doctor San Martín para su contacto y manejo de muestras.

Y por último, a Mario y en especial a mi director de tesis Joan, no solo por su ayuda en este trabajo, sino que también por ser consejeros, estar presentes en mi decisión y aportar con su auspicio para el ingreso al programa de doctorado que actualmente curso.

Índice

Resumen.....	6
Abstract.....	7
Abreviaturas.....	8
Introducción.....	9
Hipótesis.....	24
Objetivos.....	25
Materiales y métodos.....	26
Resultados.....	39
Discusión.....	56
Conclusiones.....	65
Bibliografía.....	66

Resumen

El cáncer constituye la segunda causa de muerte en nuestro país, siendo el cáncer gástrico el más frecuente como causa de mortalidad en ambos sexos. Este cáncer posee una sintomatología vaga en estadíos iniciales, suele ser de diagnóstico tardío, posee gran capacidad de invasión y metástasis y a pesar del tratamiento actual posee mal pronóstico en etapas avanzadas. La enzima Heparanasa ha sido implicada como de factor pronóstico y mediador clave en el proceso invasivo de este cáncer, existiendo otros factores que pueden modificar su función y actividad como el NF-kB o la enzima superóxido dismutasa. En la búsqueda de nuevas terapias el polifenol resveratrol aparece como promisorio herramienta anticancerígena. En el presente trabajo se muestra el efecto sobre la proliferación e invasión que ejerce resveratrol sobre las líneas de cáncer gástrico AGS y MKN45. Además, resveratrol aumentó la actividad de superóxido dismutasa, disminuyendo la activación de NF-kB en ambas líneas celulares y redujo la actividad de Heparanasa en la línea AGS. Esto permite plantear que resveratrol, además de disminuir la proliferación de las líneas celulares AGS y MKN45, posee efecto en la capacidad invasiva de ambas líneas celulares y que al menos en la línea celular AGS el efecto anti invasivo de resveratrol, al menos en parte, está asociado a la disminución de la actividad de Heparanasa y a la modulación de la actividad de superóxido dismutasa y NF-kB.

Abstract

Cancer is in Chile the second most common cause of death, and Gastric Cancer is the most frequent in both sex. Moreover, Gastric Cancer is very difficult to diagnosis in early stages, is frequent to find the disease in late stages and it has a large invasion and metastasis capacity. Furthermore, even with treatment the prognosis is poor.

The enzyme called Heparanase has been implied as a prognosis factor and a key mediator in the invasive process of Gastric Cancer. Heparanase activity and function can be modified by NF- κ B as well the enzyme of Superoxide dismutase. In the search of novel therapies for Gastric Cáncer Resveratrol seems a promising tool. This research shows the effect of Resveratrol over the proliferation and invasión capacity of gastric cáncer lines AGS and MKN45. Moreover, Resveratrol increases the activity of Superoxide dismutase with a decrease of the activation of NF- κ B in both cell lines and a decreased Heparanase activity in AGS. Those results allow to propose how Resveratrol, besides of the effect over the proliferation, reduces the invasion capacity in AGS at least in part through the effect over Heparanase and their modulation of Superoxide dismutase and NF- κ B.

Abreviaturas

Se utiliza la abreviatura extraída de la literatura en inglés.

ADN: ácido desoxirribonucleico.
ARN: ácido ribonucleico.
AP-1: proteína activadora 1.
bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos.
bME: beta mercaptoetanol.
CAPE: fenil ester del ácido cafeico.
COX-2: ciclooxigenasa 2.
EDTA: ácido etildiaminotriacético.
EMSA: ensayo de cambio de movilidad electroforética.
GAG: glicosaminoglicanos.
HGF: factor de crecimiento de hepatocitos.
HS: heparán sulfato.
HSPGs: proteoglicanos con heparán sulfato.
MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos.
MMPs: metaloproteinasas de la matriz.
NF-kB: factor nuclear kappa beta.
PBS: buffer fosfato salino.
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
ROS: especies reactivas de oxígeno.
siRNA: rna pequeño de interferencia.
SBF: suero bovino fetal.
SOD: superóxido dismutasa.
SRB: sulforodamina.
TCA: ácido tricloroacético.
TEM: transición epitelio mesénquima.
TGFb: factor transformador de crecimiento beta.
TRIS: hidrodimetil aminometano.
uPA: activador del plasminógeno del tipo urinario.
UV: ultra violeta.
VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial.

Introducción:

El cáncer es la segunda causa de muerte en Chile, siendo el cáncer gástrico el más frecuente en ambos sexos, presentando una tasa de mortalidad estable en el tiempo en torno a 20 por 100.000 habitantes en nuestro país, pero con tendencia a ser 2 a 3 veces más común en hombres [1]. A nivel mundial el cáncer gástrico es la segunda causa de muerte y posee una distribución geográfica variable; países como Chile, China, Costa Rica y Japón poseen las tasas de mortalidad más altas[2]. A su vez, dentro de Chile también se observan diferencias por regiones: Bío-bío y Araucanía con las mayores tasas, región central con frecuencia intermedia y Antofagasta con tasas bajas, sin conocerse a la fecha las causas precisas de este fenómeno [3].

La histología predominante en el Cáncer Gástrico es la de adenocarcinoma, dentro de la cual se distinguen 2 tipos clásicos definidos por Laurén en 1965:

-El tipo intestinal, que se visualiza histológicamente con apariencia de glándulas de tejido intestinal bien diferenciado. Este tipo deriva de una atrofia gástrica o metaplasia intestinal, es común en pacientes mayores en zonas geográficas de alto riesgo [4] y se ve relacionado a factores etiológicos ambientales, tales como la infección por *H. pylori*, alto consumo de cloruro de sodio, nitritos y nitratos (en forma de alimentos preservados por medio de la curación) y el tabaco. Nitritos y nitratos llevan a la formación de compuestos N-nitrosos y nitrosaminas, los cuales se relacionan directamente a daño de ADN y por este medio a la carcinogénesis [5]. A su vez, el proceso patogénico de *H. pylori* produce daño en la mucosa gástrica por medio de enzimas como ureasa y fosfolipasa, generando

un ambiente que tiende al estrés oxidativo y que lleva a disminución de los mecanismos reparadores del ADN en este epitelio, generando un proceso inflamatorio crónico y mayor riesgo de carcinogénesis [6].

-El tipo difuso, que se desarrolla como una infiltración del tejido gástrico pobremente diferenciado, dando el aspecto macroscópico de “bota de cuero“. Este tipo, también denominado Linitis Plástica, se manifiesta de forma endémica en pacientes jóvenes [4], y se ha relacionado a la herencia como principal factor etiológico [5].

La distribución geográfica global de la frecuencia y de la mortalidad por cáncer gástrico puede ser explicada, en parte, por los factores etiológicos ambientales [2]. Cabe destacar que con el correr de los años ha existido una tendencia a la estabilización en las tasas de incidencia y mortalidad a nivel mundial, hecho atribuido al control de estos factores de riesgo [2].

En el caso de nuestro país, también existe una tendencia a la estabilización de las tasas con un aumento de la proporción de casos del tipo histológico difuso y que llega a superar el 60% en la novena región (región que concentra la mayor tasa de mortalidad) [7]. No existen estudios que expliquen con claridad este fenómeno, pero es posible plantear la hipótesis de la herencia como factor asociado, debido a la mayor proporción de población nativa americana no mestiza presente en aquella región [2, 5, 8].

El cuadro clínico clásico proviene del daño tumoral sobre el estómago, caracterizándose en etapas avanzadas por dolor epigástrico, hemorragia digestiva, baja

de peso y anorexia [1], sin embargo, la sintomatología en etapas tempranas es vaga y poco específica [5].

Murakami en 1971 definió la categoría de cáncer incipiente como aquella lesión que no compromete más allá de la submucosa, independiente del compromiso de linfonodos. Se ha estimado que el progreso de cáncer Incipiente a etapas avanzadas tiene una media de 44 meses [9] y su tratamiento presenta muy buenos resultados [1, 5, 9, 10]. Sin embargo, la detección del cáncer incipiente es baja ya que el diagnóstico depende de la presencia de síntomas y en nuestro país no supera el 20% respecto al total de cáncer gástrico [7]. Los esfuerzos para la realización de endoscopías digestivas altas (método diagnóstico del cáncer gástrico incipiente) en Japón y Corea del Sur han aumentado esta cifra a 50% y 40% respectivamente [9].

Superada la etapa de Cáncer Incipiente y a medida que comienza a aparecer compromiso de linfonodos la sobrevida comienza a disminuir, llegando incluso a no superar en promedio los 6 meses en las etapas más avanzadas [2, 9, 10]. La ya mencionada falta de sintomatología en etapas tempranas influye de esta forma en disminuir la sobrevida y limitar las opciones de tratamiento [5].

El proceso de invasión y metástasis, que define la sobrevida de un paciente con cáncer gástrico, es parte de las denominadas “Características distintivas del Cáncer” [11]. Estas características conforman un modo práctico de cómo organizar el complejo proceso de la enfermedad neoplásica y corresponden a:

- Autosustentación de las señales proliferativas

- Evasión de supresores de crecimiento
- Evasión a la muerte celular
- Establecimiento de la replicación ilimitada
- Inducción de la angiogénesis
- Activación de la invasión y la metástasis [11]

Asociado a esto existen 2 características distintivas emergentes, definidas como la capacidad de reprogramar el metabolismo celular de acuerdo a las necesidades del tumor y el proceso de evasión a la destrucción por el sistema inmune [12]. Estas características se ven potenciadas por la inestabilidad genómica incrementada asociada al proceso tumoral y además por un entorno inflamatorio pro-neoplásico, sin dejar de lado una dimensión compleja de la dinámica del proceso neoplásico en la cual se observa un grupo de células fenotípicamente sanas pero reclutadas al servicio del tumor denominado “Microambiente tumoral“(Figura 1) [12].

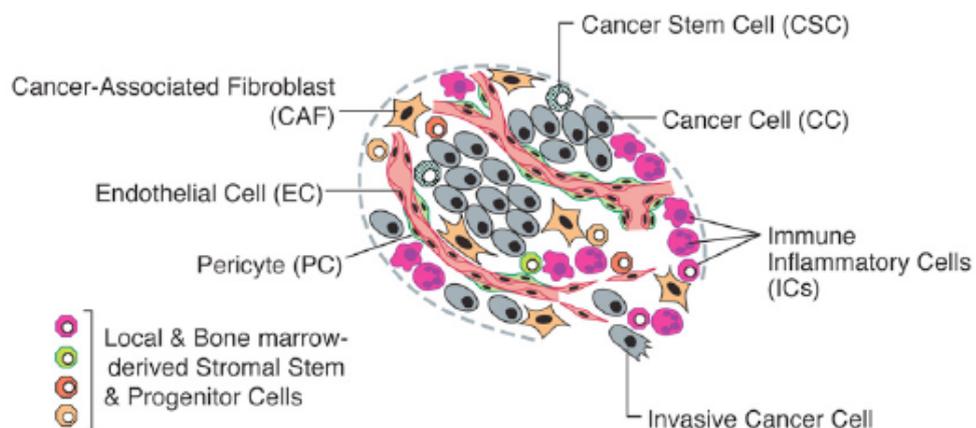


Figura 1: Microambiente tumoral: en el esquema se aprecian células asociadas “sanas“, reclutadas al servicio del tumor[12].

En este contexto una de las barreras que debe franquear las células epiteliales gástricas para migrar, invadir y producir metástasis son las membranas basales del

epitelio, para luego superar la matriz extracelular, siendo estas las primeras barreras que evitan los eventos de invasión y metástasis [13].

La invasión consiste en tres grandes procesos: adhesión a la matriz extracelular, degradación de la matriz extracelular por diferentes enzimas proteolíticas y migración [14, 15]. Muchos estudios han demostrado que la inhibición de la migración y de la degradación de la matriz extracelular previene las metástasis [16-18].

Al ser parte de esos procesos, las células epiteliales gástricas pierden su adherencia habitual, se vuelven móviles y cambian su morfología epitelial a una similar a un fibroblasto, proceso resumido en el concepto de transición epitelio-mesénquima (TEM) [12]. La pérdida de E-cadherina juega un rol clave en la pérdida de adherencia celular en la TEM, siendo en cáncer gástrico donde se ha mostrado su importancia [19] y el proceso continúa con la expresión de enzimas con la capacidad de degradar la matriz extracelular [12].

En cáncer gástrico el activador del plasminógeno del tipo urokinasa (uPA) y varias metaloproteinasas de la matriz (MMPs) han sido relacionados con la degradación de la membrana basal y la matriz extracelular, así como asociados a la progresión del tumor [17, 20-24]. Las MMPs incluyen una variada gama de proteasas dependientes de zinc agrupadas clásicamente en: gelatinasas, colagenasas, estromelisininas y MMPs asociadas a membrana[21]. En cáncer gástrico MMP-2 (gelatinasa A), MMP-3 (estromelisinina 1) y MMP-9 (gelatinasa B) son las MMPs que se han relacionado al proceso degradativo ya mencionado[22-25]. Por su parte, uPA activa plasmina, la cual tiene efecto degradador de la matriz y además activa la MMP-8 (un tipo de colagenasa)[20].

Otra enzima relacionada a la degradación de la membrana basal y la matriz extracelular es la denominada Heparanasa (endo-beta-glucuronidasa), enzima que rompe las cadenas del glicosaminoglicano (GAG) Heparán sulfato (HS) en los Proteoglicanos con Heparán sulfato (HSPGs) [26]. En la matriz extracelular el perlecano, así como otros HSPGs interactúan con la fibronectina, lamininas y colágenos para la mantención de su arquitectura [26].

Los HSPGs a su vez sirven como depósito de una serie de citoquinas y factores de crecimiento, dentro de los cuales destacan: el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor básico de crecimiento fibroblástico (bFGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento transformador beta (TGFb) [26]. Según esto, además del efecto mecánico sobre la arquitectura de la matriz extracelular, la acción de la Heparanasa libera las citoquinas y factores de crecimiento que se encuentran anclados a las cadenas de HS [26, 27]. Es más, también hay evidencia que muestra que la escisión del HS genera fragmentos bioactivos, que modulan el efecto sobre los receptores celulares de los factores de crecimiento y con ello el comportamiento celular [26, 27].

Esta enzima es relevante en la extravasación de las células del sistema inmune (linfocitos T y B, neutrófilos, macrófagos y mastocitos) liderando el tráfico a tejidos durante la inflamación [26]. También se ha demostrado alta expresión de esta enzima por las células trofoblásticas en el proceso de invasión placentaria y en plaquetas, donde contribuyen a remodelar la matriz extracelular que se asocia a la formación de un coágulo [26].

Junto a la degradación de la matriz extracelular por acción enzimática de la Heparanasa, se ha descrito funciones de ésta en la superficie celular [28]. En un caso la pro-heparanasa agrupa sindecanos lo que activa una cascada de señalización que incluye a Rac1, aumentando la capacidad adhesiva, además de generar expansión de la superficie celular [28, 29]. En otro caso la pro-heparanasa se une a su receptor-ligando de superficie celular lo que activa cascadas de señalización que incluyen proteínas como Akt, p38 y Src, dando como resultado la expresión de citoquinas como VEGF, factor tisular y COX2 [28, 29].

La vía del receptor de superficie de Heparanasa, al generar las citoquinas mencionadas también aumenta la capacidad adhesiva, la superficie celular y le agrega propiedades de motilidad celular [28, 29]. Además, vía activación del receptor del factor epidérmico de crecimiento por Src, estimula la proliferación celular en la carcinogénesis [28, 29]. De esta forma, más allá de la función fisiológica como mediador en la inflamación [26] la Heparanasa jugaría un rol clave en la invasión tumoral, el cambio de las células a células con características mesenquimáticas, la consolidación de la invasión mediante angiogénesis y el crecimiento tumoral [26, 27].

La expresión de Heparanasa se ha relacionado en el proceso de invasión tisular de una larga serie de cánceres dentro de los que destacan: colon, gástrico, vejiga, pancreático, prostático, esofágico, entre otros [26]. El rol de Heparanasa en cáncer gástrico es relevante ya que en los pacientes en los cuales las células expresan esta enzima su pronóstico empeora, registran curvas de supervivencia similares a los pacientes con tipificaciones avanzadas y la detección de la expresión de Heparanasa se correlaciona al menos con diseminación ganglionar [27, 30]. Tal es el grado de

correlación con la sobrevida en cáncer gástrico que al trazar un gráfico de sobrevida de Kaplan-Meier la curva de presencia de Heparanasa tiene la misma significancia estadística que la invasión local, ganglios afectados y metástasis (Figura 2) [27].

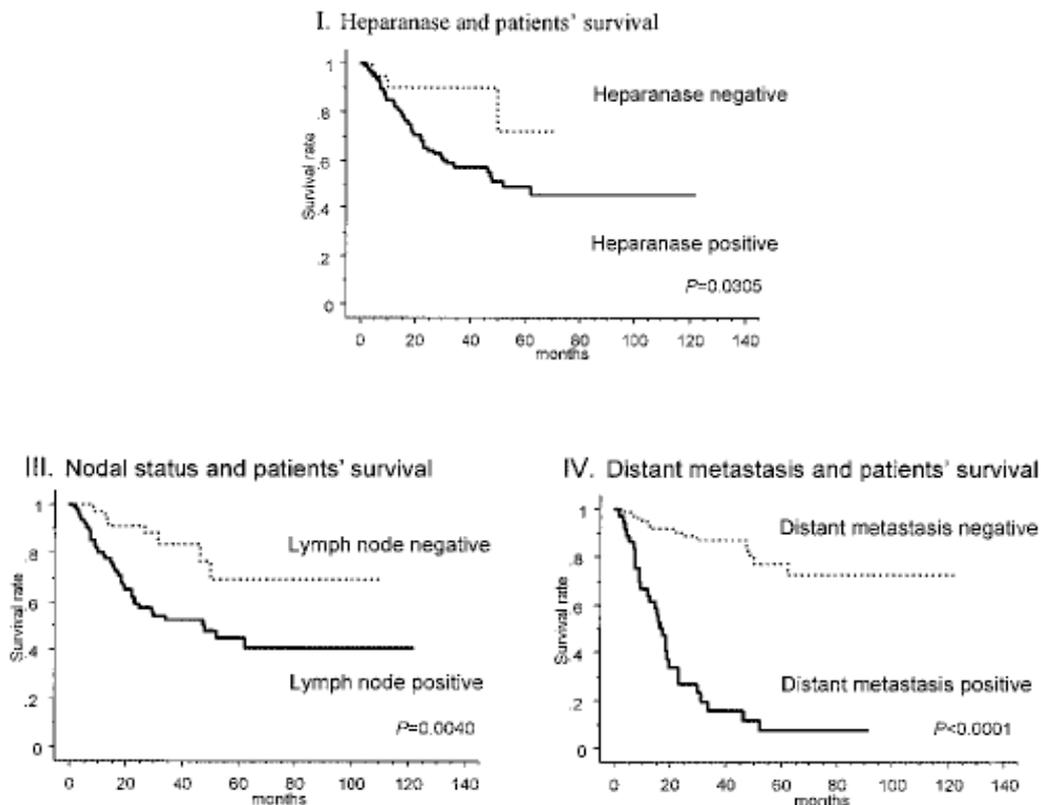


Figura 2: Curvas de Kaplan-Meier, se observa como la presencia de Heparanasa traza curvas similares de sobrevida a la de linfonodos y metástasis positivos[27].

Estos antecedentes han llevado a la identificación de Heparanasa como un posible mediador para bloquear en carcinogénesis, situación que llevó al diseño de ARN pequeños de interferencia (siRNA) destinados a silenciar la expresión génica de la Heparanasa: El uso de siRNA *in vitro* en células de cáncer gástrico reduce la capacidad adhesiva, invasiva y metastásica reduciendo la angiogénesis, teniendo un efecto menor sobre la proliferación celular[17, 31].

En otro aspecto del complejo proceso de degradación de la membrana basal la literatura muestra el rol mediador que juegan las especies reactivas de oxígeno (ROS) en dicho proceso [32]. Las ROS se enmarcan dentro del grupo de moléculas que presentan uno o más electrones desapareados, grupo denominado genéricamente “radicales libres, siendo esta característica la que les confiere su gran reactividad química siendo capaces de interaccionar con múltiples macromoléculas tales como: ADN, ARN, proteínas, lípidos, entre otras. Los radicales libres incluyen las ROS (radicales superóxido, hidroxilo, hidroxiperoxilo y alcoxilos) y las especies nitrogenadas. En particular, las ROS son producidas a consecuencia del metabolismo aeróbico mitocondrial y otras fuentes intracelulares como el citocromo p450, flavoproteín oxidasas y las enzimas peroxisomales que participan en el metabolismo de los ácidos grasos [33].

Las ROS participan en importantes procesos fisiológicos tales como la producción de prostanglandinas, destrucción de bacterias por polimorfonucleares, detoxificación en el hígado y señalización intracelular [34, 35]. Por otra parte, el daño a macromoléculas que provocan las ROS está implicado en la patogénesis de importantes enfermedades, como la enfermedad cardiovascular y el cáncer [34].

El daño y la disminución de la eficacia de reparación del ADN mediado por ROS es común en el proceso de carcinogénesis [35], así como también las ROS han sido implicadas en la activación anormal de las MMPs y uPA vía sistema de señalización MAPK y en la regulación de factores de transcripción (como AP-1 y NF-kB), además de organizar la actina y proteínas relacionadas en la formación de las estructuras denominadas invadopodias (evaginaciones de la membrana celular que actúan de cabeza de invasión en la membrana basal) y participando en la TEM como parte de la vía de señalización que lleva a un aumento de la capacidad invasiva de las células tumorales

[32]. Existe evidencia además de la relación de ROS con Heparanasa, describiéndose la mediación de estas especies en la expresión de Heparanasa con el subsecuente aumento de la degradación de HS en procesos tipo ateromatosis y glomerulopatías [36, 37]. Además de mediar el efecto de proteasas y glucuronidasas y de participar en la TEM, las ROS también tendrían efecto directo en la degradación del HS, lo que al menos ha sido investigado *in vitro* en glomerulopatías [38, 39].

Las células poseen enzimas que regulan el rol fisiológico y protegen a la célula de los efectos deletéreos de las ROS, dentro de las cuales se incluyen la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa [40]. La enzima superóxido dismutasa (SOD) es una importante defensa celular contra las ROS, convirtiendo el radical superóxido en peróxido de hidrógeno. Se ha constatado que la sobreexpresión de la forma extracelular de SOD (SOD3) disminuye la capacidad invasiva *in vitro* de líneas celulares de cáncer de mama, reduciendo las ROS, pero además disminuyendo la expresión de Heparanasa [41].

Otro mediador que regula la expresión de Heparanasa en células tumorales es el factor nuclear kappa beta (NF- κ B)[42], cuya activación se ha relacionado con el aumento de la expresión de Heparanasa y peor pronóstico en cáncer gástrico [43], además de estar implicado en procesos propios de la carcinogénesis como son la proliferación, migración y metástasis, entre otros [44].

La familia de factores de transcripción NF- κ B/rel corresponden a un grupo de proteínas relacionadas estructuralmente que forman homodímeros y heterodímeros; encargados de regular más de 150 genes que incluyen citoquinas, quimoquinas, inmunoreceptores y moléculas de adhesión celular[45]. El dímero más común y denominado específicamente NF- κ B corresponde al heterodímero p50/RelA (p50/p65).

Este al ser activado se trasloca al núcleo uniéndose a las secuencias de ADN específicas regulando la expresión génica de sus genes diana [45].

Numerosos procesos fisiológicos del sistema inmune y de la respuesta inflamatoria tiene como marco regulador la activación del NF-kB, por lo que no es de extrañar que su activación patológica influya en la carcinogénesis[46].

Se ha relacionado la activación del NF-kB en la carcinogénesis por las siguientes razones [44]:

- 1) Regula la transcripción de muchos genes que están involucrados en la promoción de la proliferación, angiogénesis, metástasis y la evasión de la muerte celular [44, 46].
- 2) Se plantea su activación por el estímulo hipóxico en el microambiente tumoral, activación que perpetúa la carcinogénesis [44].
- 3) La activación de NF-kB está relacionada al incremento en la resistencia a quimioterapéuticos y radioterapia [44, 46].
- 4) La activación constitutiva del NF-kB está presente en una gran variedad de líneas celulares de cánceres y en cánceres [44, 46].
- 5) Las expresiones aberrantes del NF-kB se han relacionado al desarrollo de la carcinogénesis [44].

Junto a la ya mencionada evidencia de aumento de su activación en cáncer gástrico [43], existe evidencia de la reducción de la migración celular en procesos hiperplásicos, específicamente la hiperplasia neointimal vascular post injuria, al bloquear el NF-kB con gliotoxina [47] y disminución de la proliferación en la línea celular de cáncer gástrico AGS sometidas a estímulo inflamatorio de *H. pylori* al bloquear la activación de NF-kB con fenetil éster de ácido cafeico (CAPE) [48].

Además, es importante recalcar la relación entre NF- κ B y ROS. La transcripción de genes que dependen de NF- κ B (SOD, catalasa, heme oxidasa, entre otras), regulan los niveles de ROS en la célula, así como los niveles de NF- κ B son regulados por ROS. Es decir, dependiendo del contexto las ROS pueden activar o inhibir la cascada de señalización de NF- κ B [49].

Existen otras alternativas al ya mencionado bloqueo de la expresión de Heparanasa con siRNA, variadas moléculas pequeñas (benzoaxazol, entre otras), glicosaminoglicanos (heparinas, heparinas de bajo peso) y proteínas han sido probadas con distintos resultados sobre el desempeño de Heparanasa y su efecto sobre los procesos de invasión y metástasis de distintas líneas celulares [26]. Un grupo interesante de moléculas pequeñas que se ha buscado su efecto sobre mediadores clave del proceso carcinogénico son los fitoquímicos, los cuales estando disponibles a través de la dieta o como parte de las medicinas tradicionales han sido ligados a la reducción de incidencia a nivel poblacional de diversos cánceres cuando se mantiene un consumo elevado [50].

Dentro de estos fitoquímicos ha sido interesante el estudio de compuestos fenólicos con propiedades antiinvasivas y antimetastásicas. De acuerdo a la cantidad de anillos aromáticos y la hidroxilación o grupos funcionales asociados de estos pueden clasificarse en monofenoles, polifenoles o fenoles ácidos. Ejemplos de estos grupos incluyen: la curcumina, el ácido gálico, el gingerol, entre otros (Figura 3). A su vez, la lista de estudios *in vitro* e *in vivo* en las cuales se ha demostrado disminuir invasión y actividad metastásica es larga, nombrando estudios desde hepatoma hasta el cáncer de mama [51]. Uno de estos compuestos, un polifenol denominado resveratrol, ha congregado especial atención.

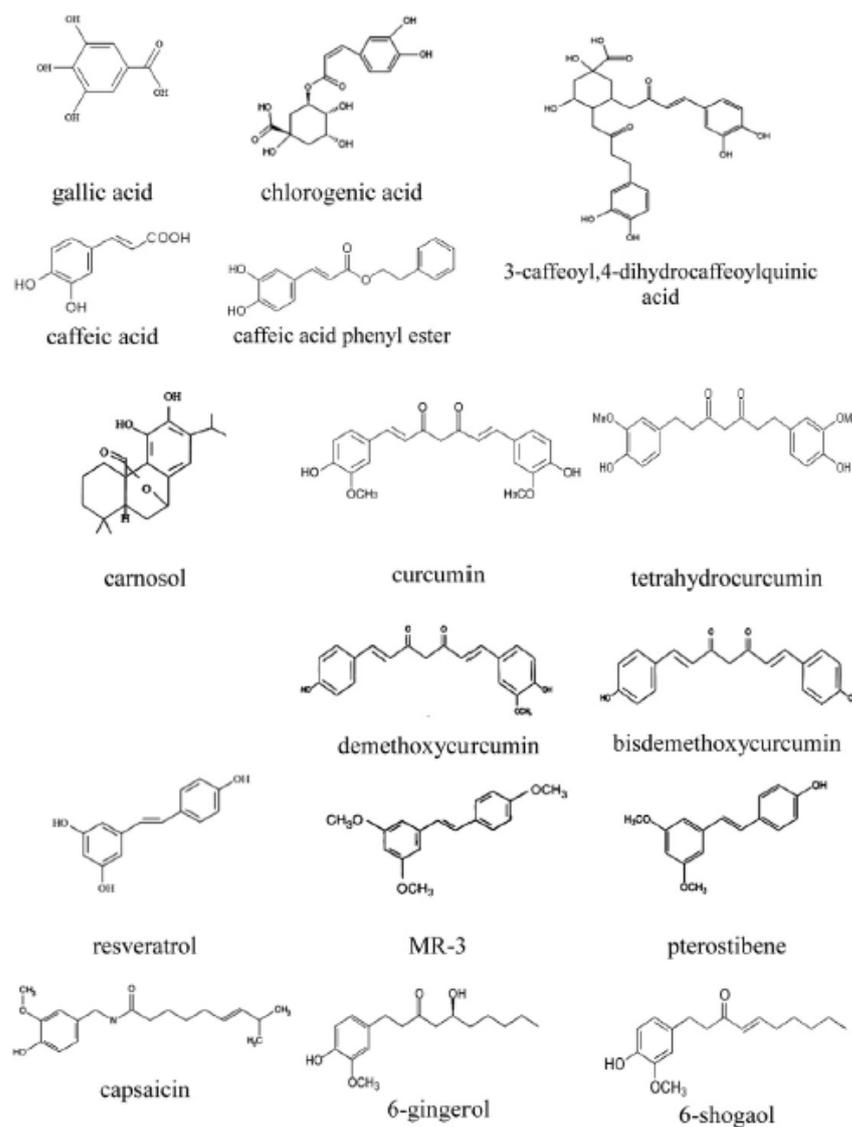


Figura 3: Estructura de polifenoles con efecto antineoplásico conocido[51].

El resveratrol (3,5 4'-trihidroxiestilbeno) es una fitoalexina naturalmente producida en una gran variedad de plantas frente a estímulos como el estrés, radiación UV, infecciones fúngicas, entre otros [52]. Plantas como la vid, el maní o una gran variedad de bayas producen este polifenol y su uso medicinal data de la medicina Védica (uso de extracto de la raíz de la vid como tónico cardiovascular), con datos de su uso en la medicina tradicional china y japonesa en preparados antifúngicos y como antilipomiente con extractos del heléboro blanco (Figura 4) [52].

La cocina francesa se caracteriza por su uso abundante de materia grasa animal, alta en ácidos grasos saturados, pero a pesar de ello no se constata una prevalencia de enfermedad cardiovascular comparativamente mayor a otros países europeos. Esta situación pasó a llamarse “la paradoja francesa” y fue atribuida al alto consumo de vino *per cápita*. El resveratrol se encuentra en concentraciones considerables en el vino, por lo que prontamente se le atribuyó a este polifenol ser el responsable de dicha paradoja [53].

Los efectos del resveratrol incluyen: supresión de la lipoperoxidación y de la síntesis de eicosanoides, inhibición de la agregación plaquetaria, capacidad antioxidante, antiinflamatoria, vasodilatadora; efectos antivirales, antibacterianos, entre otros [52]. Sin embargo, una de las ramas de investigación asociadas a resveratrol que ha alcanzado ribetes muy prometedores es la de la prevención y tratamiento del cáncer [52, 54].

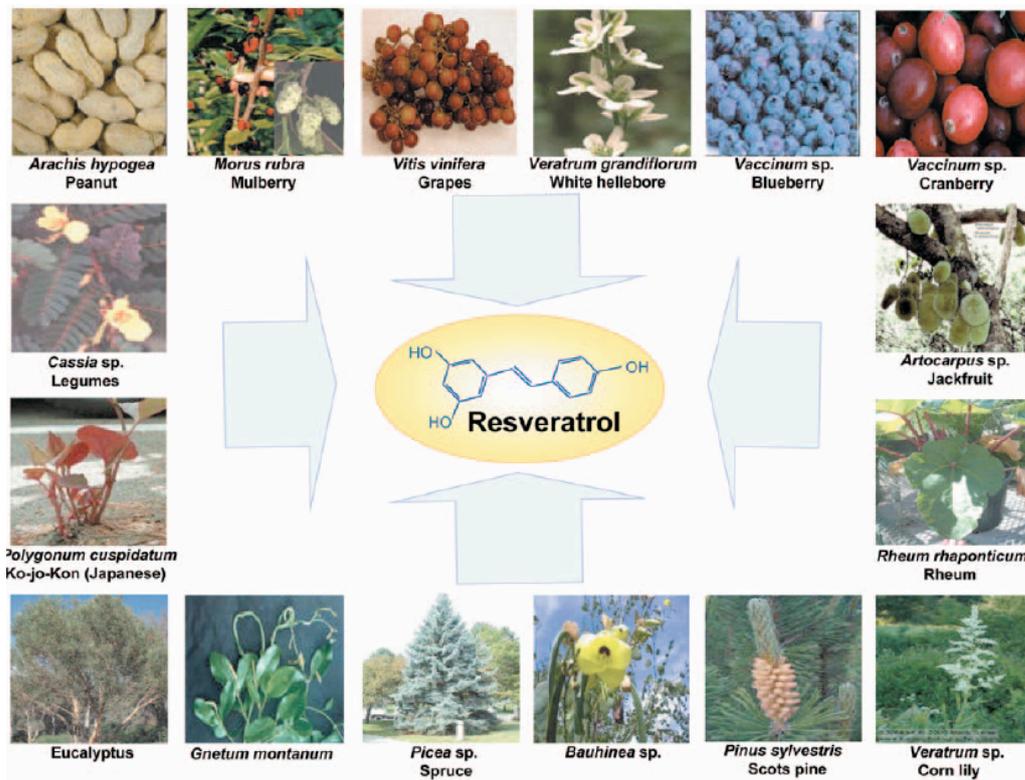


Figura 4: Fuentes vegetales de resveratrol[52]

Los estudios en los que se ha utilizado han mostrado una inhibición de las 3 mayores fases de la carcinogénesis: iniciación, promoción y progresión, además de poseer efecto inductor de apoptosis [55]. *In vitro* se han descrito efectos del resveratrol sobre el crecimiento en células de cáncer de mama, células leucémicas, linfomas, melanoma y carcinomas de piel, cáncer de colon, cuello de útero y adenocarcinoma gástrico [35, 52, 56-58].

A su vez, diversos estudios han mostrado que este compuesto es un potente inhibidor de la activación del NF- κ B, mostrándose en mieloma múltiple una disminución de la traslocación nuclear de NF- κ B, lo que estaría relacionado con algunos de los efectos anticarcinogénicos que posee el resveratrol [58, 59]. Esta situación fue ratificada *in vivo* en un modelo de inducción de cáncer de mama, en el cual se demostró por EMSA como el resveratrol inhibe la activación de NF- κ B, así como enzimas involucradas en el proceso invasivo, como la COX y MMP-9 [56].

El escalado de evidencia desde el nivel pre clínico de *in vitro* a modelo animal, ha generado suficiente evidencia como para iniciar numerosos ensayos clínicos actualmente en curso. Estos buscan dilucidar la efectividad en humanos de este polifenol, tanto para la prevención como la terapéutica del cáncer [60, 61].

Además, el resveratrol incrementa la actividad de la SOD-1, SOD-2, SOD3/SODextracelular, así como de otros mediadores que regulan las formas reactivas de oxígeno [62, 63]. Este mecanismo, además de disminuir los efectos nocivos de ROS sobre las células, es una posible vía por la cual el resveratrol puede disminuir la actividad de Heparanasa y así disminuir la capacidad invasiva del adenocarcinoma gástrico.

Todos los antecedentes anteriormente expuestos nos permiten plantear la siguiente hipótesis:

“El resveratrol reduce la invasividad del adenocarcinoma gástrico *in vitro*, aumentando la actividad de SOD, disminuyendo la activación de NF- κ B y atenuando la actividad de heparanasa, “

Objetivo General:

-Estudiar el efecto de resveratrol sobre la capacidad invasiva del adenocarcinoma gástrico *in vitro*, ligado a su efecto sobre la actividad de SOD, activación de NF-kB y Heparanasa en las líneas celulares de cáncer gástrico AGS y MKN45.

Objetivos específicos:

- Determinar el efecto del resveratrol sobre la viabilidad de las líneas celulares de cáncer gástrico AGS y MKN45.
- Evaluar el efecto del resveratrol sobre la capacidad invasiva de las líneas celulares de cáncer gástrico AGS y MKN45.
- Determinar el efecto de resveratrol sobre la actividad de SOD en las líneas celulares de cáncer gástrico AGS y MKN45.
- Determinar el efecto de resveratrol sobre la activación de NF-kB en las líneas celulares de cáncer gástrico AGS y MKN45.
- Determinar el efecto del resveratrol sobre la actividad de Heparanasa en las líneas celulares de cáncer gástrico AGS y MKN45.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

- Micropipetas *Biopette*[®], modelos p2, p10, p20, p200 y p1000.
- Micropipeta multicanal de 200 μ l *Biopette*[®].
- Puntas para micropipetas desechables de 10, 200 y 1000 μ l.
- Pipeta graduada *HGB*[®] de 10 ml.
- Propipeta *Fastpette*[®].
- Repipeteador *Handy Step*[®].
- Jeringa de 5 ml *Eppendorf*[®].
- Probeta de 100 ml *Duran*[®].
- Botellas de vidrio con tapa *Duran Schott*[®].
- Tubos para microcentrífuga de 1,7 ml *Eppendorf*[®].
- Tubos para centrífuga de 15 y 50 ml *Orange Scientific*[®].
- Placas petri para cultivo de tejidos de 60 y 100 mm *Orange Scientific*[®].
- Placas de micropocillos para cultivo de tejidos de 6, 24 y 96 pocillos *Orange Scientific*[®].
- Insertos para cultivo de tejido celular de 10 mm *Nunc*[®].
- Pinzas de punta fina invertida *Goot TS16*[®].
- Varillas de papel *Simond's*[®].
- Portaobjetos y cubreobjetos.

- Cámara de Neubauer doble *W. Schreck Hofheim/TS*[®].
- Puntas para micropipetas con filtro desechable de 10, 20, 200 μ l *Axygen*[®].
- Raspador de células *Orange Scientific*[®].

2. Equipos

- Cámara de flujo laminar clase II *ESCO*[®].
- Incubadora *Kendro Laboratory Products*[®].
- Microscopio óptico invertido *Japan Optical Corporation*[®].
- Baño termostático *Memmert*[®].
- Centrífuga modelo TJ-6 *Beckman*[®].
- Lector de Microplacas *Biotek*[®].
- Microscopio de fluorescencia invertido motorizado modelo IX 81 *Olympus*[®].
- Cámara Digital modelo DP 71 *Olympus*[®].
- Balanza analítica modelo TE 214 S *Sartorius*[®].
- Refrigerador modelo Altus 700 *Mademsa*[®].
- Centrífuga 5415 R *Eppendorf*[®].
- Incubadora *Memmert*[®].
- Espectrofotómetro *Thermo Spectronic*[®].
- Congelador *Beste*[®].
- Vortex V1 plus *Boeco*[®].

- Centrífuga *Wealtec*[®].

3. Reactivos

- Resveratrol *Sigma-Aldrich*[®].

- Etanol *Merck*[®].

- DMEM/HIGH GLUCOSE *HyClone*[®].

- HAM' S/F-12 *HyClone*[®].

- Suero Bovino Fetal *Gibco*[®].

- Penicilina-Estreptomicina *GibcoBRL*[®].

- Tripsina-EDTA *Gibco*[®].

- Buffer Fosfato Salino (PBS en inglés) *Gibco*[®].

- Azul de Tripán *Gibco*[®].

- Ácido Acético *Winkler LTDA*[®].

- Ácido Tricloroacético (TCA en inglés) *Winkler LTDA*[®].

- Sulfurodamina B (SRB) *Sigma-Aldrich*[®].

- Hidroximetil-aminometano (TRIS) *Merck*[®].

-Triton X-100 *Merck*[®].

-Beta mercapto etanol *Merck*[®].

-PMSF *Merck*[®].

- Metanol *Merck*[®].

- Cristal Violeta *Merck*[®].
- Hydromount (medio para montaje acuoso) *National Diagnostics*[®].
- BD Matrigel Matrix *BD Biosciences*[®].
- Agua Ultra pura (Mili Q)
- Dietilpirocarbonato (DEPC) *Winkler*[®].
- Isopropanol *Sigma-Aldrich*[®].
- Albúmina de Suero de Bovino (BSA en inglés) *New England Biolabs*[®].
- Kit de ensayo de actividad de superóxido dismutasa *BioVision*[®].
- Reactivo Bradford *Sigma-Aldrich*[®].
- Kit extracción nuclear *Cayman*[®].
- Kit de ensayo de factor de transcripción NF-kB(p65) *Cayman*[®].

4. Metodología

Líneas celulares:

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer gástrico AGS y MKN45 adquiridas a la desde la American Type Culture Collection (ATCC) . Según se informa en los catálogos de las líneas celulares las células AGS son derivadas de la masa tumoral de un adenocarcinoma gástrico y las células MKN45 provienen de una metástasis hepática de un adenocarcinoma gástrico pobremente diferenciado.

Cultivo de las líneas celulares:

Las células fueron sembradas en placas petri con medio de cultivo DMEM/ HAM' S/F-12, suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivo (SBF), 100 U/ml de penicilina G y 100 μ g/ml de estreptomycin y fueron cultivadas a 37°C en una incubadora humidificada con 5% CO₂.

Antes de cada ensayo el medio de cultivo fue retirado de las células y lavado con 2 ml de PBS. Al retirar este último se le agregó 1 ml de Tripsina-EDTA 0,25% v/v y fue incubado a 37°C por 5 minutos para des-adherir las células de la placa. El efecto de la tripsina se neutralizó mediante la adición de 3 ml de medio de cultivo que posteriormente fueron recogidos en un tubo para ser centrifugados a 1500 rpm por 5 min. El pellet obtenido se re-suspendió y homogeneizó en 1 ml de medio de cultivo, del cual se extrajeron 20 μ l que se mezclaron en una razón 1:1 con azul de tripán. Este colorante se introduce en el interior de las células que pierden la integridad de su membrana, por lo que tiñe células no viables, permitiendo así contar en la cámara de Neubauer las células vivas

que están incoloras. El número de células que se cultivarán dependerá del ensayo que se realice.

Preparación de los compuestos:

Se disolvió el resveratrol en etanol absoluto obteniendo una concentración de 0,1M. Luego se diluyeron con agua Mili Q estéril para obtener una solución de 1mM a partir de las cuales se prepararon las concentraciones de trabajo. Estas soluciones se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Ensayo de viabilidad:

Para este ensayo se utilizaron placas de 96 pocillos sembrando en cada pocillo 3000 células resuspendidas en 100 μ l de medio de cultivo, las que fueron incubadas por 24 h para cada línea celular. Al pasar este tiempo, las células fueron incubadas con el resveratrol. De este compuesto se utilizó 8 concentraciones (200, 150, 100, 50, 25, 12,5 y 5 μ M) en sextuplicado. Como las soluciones madre de estos compuestos fueron disueltas en etanol, se hizo un control de solvente tratando las células con etanol al 1% v/v en sextuplicado para comprobar que no produce citotoxicidad. Como control negativo se dejaron 6 pocillos con células sin tratar y adicionalmente se dejaron 6 pocillos sin células para el blanco.

Una vez adicionados los compuestos, las placas fueron incubadas durante 72 h. Una vez transcurrido este tiempo las células fueron fijadas *in situ* por la adición de 25 μ l de TCA al 50% p/v durante 60 min a 4°C. Luego, el sobrenadante fue descartado y las placas fueron lavadas 3 veces con agua destilada para posteriormente añadir 50 μ l de SRB (al 0,1% p/v en ácido acético al 1% v/v) a cada pocillo, dejándolos reposar a

temperatura ambiente durante 30 min. Tras la tinción se lavaron 3 veces con 130 μ l de ácido acético al 1% v/v y se dejaron secar al aire. El material teñido en cada pocillo fue solubilizado con 200 μ l de TRIS 10 mM y finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en un lector de microplacas. Este procedimiento fue repetido 4 veces, promediando los valores de absorbancia.

A su vez, para las 3 dosis menores y el control de etanol el procedimiento se repitió a las 24, 48, 72 y 144 h para obtener los resultados de viabilidad correspondientes. Se promediaron los datos de 4 mediciones con las mismas características.

Los valores de absorbancia fueron graficados como porcentajes del control de etanol 1%.

La tinción con sulforodamina B (SRB) es un método aceptado por la NCI (Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos) que permite evaluar la viabilidad celular mediante tinción de proteínas. La SRB es un colorante aminoxanteno con dos grupos sulfónicos que se unen de forma electrostática con los residuos de los aminoácidos básicos de las proteínas en condiciones ligeramente ácidas produciendo una coloración púrpura. Como esta unión es estequiométrica, una mayor intensidad de la coloración indica una mayor cantidad de proteínas y por ende un mayor número de células.

Ensayo de invasión:

Para este ensayo se utilizaron placas de 100mm, de las cuales se utilizaron 3 para cada línea celular, en cada una de las cuales se sembraron 500.000 células crecidas en 10 ml y se incubaron a 37° C por 24 h. Luego, 2 de las 3 placas fueron tratadas con resveratrol 25 y 5 μ M respectivamente. La otra placa fue tratada con etanol al 1% v/v.

Estas placas fueron incubadas nuevamente por 24 hrs. Posteriormente, las células de cada placa fueron tripsinizadas, centrifugadas y contadas por separado para sembrar sólo las células viables en una cámara de invasión. Previamente a esta cámara se le adicionan 60 μ l de Matrigel, material que simula la membrana basal de un epitelio (compuesta por: 50 μ g/ml de laminina humana, 50 μ g/ml de colágeno de tipo IV humano y 2 mg/ml de gelatina en 10 mM de ácido acético) sobre la membrana porosa (Figura al final del apartado). La preparación de la cámara de invasión se realizó antes de sembrar las células ya que se requiere de la gelificación del matrigel, por lo que una vez puestos estos insertos en las placas de 24 pocillos, éstas fueron incubadas por 3 h a 37°C. Bajo el inserto y sobre el fondo del pocillo (compartimiento inferior) se agregaron 250 μ l de medio de cultivo suplementado con 10% de SBF y sobre el matrigel (compartimiento superior) se sembraron 250.000 células resuspendidas en 250 μ l de medio de cultivo suplementado con 1% de SBF, dejándolas finalmente en la incubadora por 48 h. Transcurrido este tiempo las células de la parte superior que no migraron a través del matrigel y la membrana porosa ya que no lograron invadir el matrigel fueron eliminadas con la ayuda de cotonetes de papel. Luego la membrana fue retirada de la cámara y las células adheridas a la parte inferior de ésta fueron fijadas con 100 μ l de metanol al 50% v/v por un periodo de 10 minutos. Seguidamente fueron teñidas con 100 μ l de cristal violeta para tinción de Gram al 1 % p/v durante 1 minuto y posteriormente lavadas con agua destilada para retirar el exceso de colorante. Finalmente las células adheridas a la membrana fueron contadas en 15 campos al azar fotografiados de un microscopio óptico a 100 X. Este procedimiento fue repetido 3 veces, la cantidad de células por campo fueron promediadas y graficadas como porcentaje en función al total de células que invadieron del control de etanol 1%.

Este ensayo se repitió para comparar el efecto de un inhibidor conocido de la activación de NF- κ B, la gliotoxina[48]. Se utilizaron 3 para cada línea celular, en cada una de las cuales se sembraron 500.000 células resuspendidas en 10 ml y se incubaron a 37° C por 24 h. Luego, 1 placa fue tratada resveratrol en 25 μ M, otra placa fue tratada con gliotoxina 100ng/ml y la restante fue tratada con etanol 1%v/v. La placa que fue tratada con gliotoxina se le administró el tratamiento 1 hora antes del proceso de tripsinizado, mientras que las tratadas con Resveratrol y etanol se incubaron 24 hrs con estos tratamientos. El resto de la metodología se siguió exactamente a la descrita previamente, repitiéndose este ensayo en 2 oportunidades, con lo cual y la cantidad de células por campo fueron promediadas y graficadas como porcentaje en función al total de células que invadieron del control de etanol 1%.

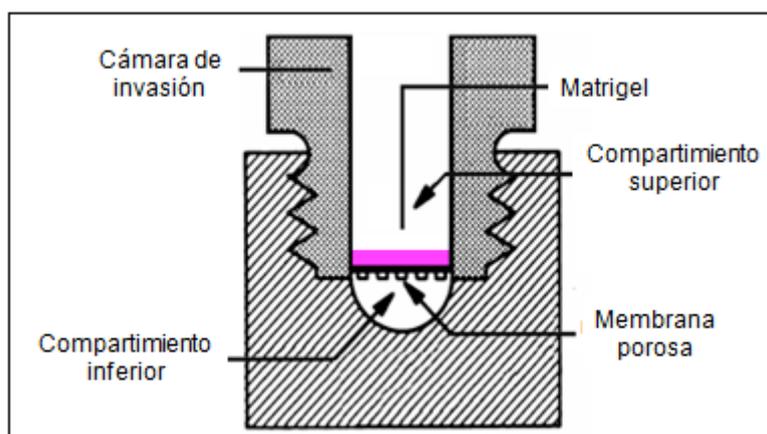


Figura 5: Ensayo de invasión.

Medición de actividad de SOD:

Para este ensayo se utilizaron placas de 100mm, de las cuales se utilizaron 4 para cada línea celular, en cada una de las cuales se sembraron 500.000 células resuspendidas en 10 ml y se incubaron a 37° C por 24 h. Luego, 3 de las 4 placas fueron tratadas con resveratrol en 25, 12,5 y 5 μ M respectivamente. La otra placa fue tratada con etanol al 1% v/v. Estas placas fueron incubadas nuevamente por 24hrs. Al concluir aquel

tiempo las células fueron tripsinizadas, centrifugadas y descartado el medio de cultivo para luego ser lisadas con Tris/Hcl, Triton X-100, BetaME y PMSF. Luego de lisadas, fueron centrifugadas a 14000 g por 5 minutos. El sobrenadante, que contiene la actividad total de SOD citosólica y mitocondrial fue sometida a los reactivos del Kit de actividad SOD *Biovision* (catalog #335-100) el cual está basado en un método colorimétrico de WST-1 el cual produce el tinte formazán en contacto con el anión superóxido, por lo que en presencia de SOD se inhibe su formación y es posible cuantificar mediante la medición de absorbancia a 450nm. La medición de actividad fue repetida 3 veces y sus valores promediados y normalizados por concentración de proteínas totales. Los resultados de actividad normalizados fueron graficados según el porcentaje en función al control de etanol 1%.

La concentración de proteínas totales fue realizada mediante el método colorimétrico que utiliza el reactivo Bradford.

Ensayo de activación de NF- κ B.

Para este ensayo se utilizaron placas de 100mm, de las cuales se utilizaron 5 para cada línea celular, en cada una de las cuales se sembraron 1.000.000 células resuspendidas en 10 ml y se incubaron a 37° C por 24 h. Luego, 3 de las 5 placas fueron tratadas con resveratrol en 25, 12,5 y 5 μ M, para cada línea celular respectivamente, 1 placa por cada línea celular fue tratada con gliotoxina 100ng/ml y la otra placa fue tratada con etanol al 1% v/v. Las placas tratadas con resveratrol y etanol fueron incubadas por 24rs por cada línea celular, mientras que las placas que fueron tratadas con gliotoxina se administró el tratamiento 1 hora antes del procedimiento de extracción de proteínas nucleares [48]. El fundamento del ensayo es purificar las proteínas de los núcleos, de tal forma que el p65 que haya traslocado a núcleo se unirá a la secuencia génica diana que

se encuentra adherida a los pocillos de la placa de 96 que viene incluida en el kit. Posterior a esto se realiza la lectura colorimétrica a 450nm de la reacción de HRP, que se correlaciona con la cantidad de p65 traslocado.

Se procedió a la extracción de proteínas nucleares, primero recolectando las células por separado de cada placa por medio de un “scraper” junto a su medio y previo a adición de solución de inhibición de fosfatasa se centrifuga a 300g por 5 minutos a 4°C. Posterior a centrifugar se desecha el sobrenadante. A cada pellet resultante se adiciona buffer hipotónico, dejando un periodo en hielo por 15 minutos de reposo, en espera de generar edema celular. Posterior a esto se adiciona Nonidet- P40, para luego proceder a microcentrifugar en pulse spin por 30 segundos. El pellet resultante se resuspende en buffer de extracción nuclear y se deja los tubos en hielo en una plataforma móvil, para que después de 30 minutos se centrifuge a 14000g por 10 minutos. El sobrenadante de este procedimiento posee la fracción nuclear, las cuales fueron almacenadas a -80°C hasta su uso en la cuantificación de p65.

Las muestras de las fracciones nucleares fueron sometidas a los reactivos y buffers que facilitan la unión del p65 presente en el extracto nuclear a la secuencia génica diana en cada pocillo de la placa incluida en el kit de ensayo de factor de transcripción NF- κ B(p65) *Cayman*[®]. Los valores de absorbancia de cada uno de los tratamientos en ambas líneas celulares fueron repetidos 2 veces y expresados como porcentaje de p65 traslocado en función del control de etanol, previa normalización por la concentración de proteínas totales del extracto nuclear.

Ensayo de Actividad de Heparanasa.

Para este ensayo se utilizaron placas de 100mm, de las cuales se utilizaron 4 para cada línea celular, en cada una de las cuales se sembraron 500.000 células resuspendidas en 10 ml y se incubaron a 37° C por 24 h. Luego, 3 de las 4 placas fueron tratadas con resveratrol en 25 , 12,5 y 5 μ M respectivamente. La otra placa fue tratada con etanol al 1% v/v. Pasadas las 24 horas se separa, previo a descartar, 1 ml de medio de cultivo por cada placa, al cual se le adiciona inhibidores de proteasas (P8340- Sigma Aldrich). En cuanto a las células, se adicionó a cada placa un preparado de 450 μ l de acetato de sodio 25mM, pH 5,5 junto a 150 μ l urea 7M y 6 μ l de inhibidores de proteasa (P8340- Sigma Aldrich). En aquel medio se realizó la remoción de las células de cada placa con la utilización de “scraper”, para luego sonicar en hielo el extracto en potencia máxima por 10 minutos en 2 oportunidades. Tanto los medios como los extractos celulares se liofilizaron y fueron guardados a -20° C.

Con estos extractos se realizó el ensayo de actividad de heparanasa, para lo cual el sustrato utilizado fue heparan sulfato biotinilado al 15% obtenido según lo descrito por Bouças y colaboradores (Bouças, Trindade et al. 2008).

En una placa de 96 pocillos (Nalge Nunc International, New York, USA) se adicionó 200 μ l de sulfato de protamina 10 μ g/ml (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Después de ser incubada por 18 horas a 37°C la placa fue lavada en 5 ocasiones con PBS. Posterior al lavado se adicionó 150 μ l por pocillo de albúmina bovina al 1% en PBS, incubándose por 2 horas a 37°C.

Posterior a un nuevo lavado con PBS se agregó 100 u/l de de heparan sulfato biotinilado solubilizada en acetato de sodio 25mM (pH5,5), llevándose a incubación por 18 horas a 37°C en baño húmedo. Después, los pocillos con el heparán sulfato biotinilado fueron

lavados 5 veces con PBS y una vez con acetato de sodio 25mM (pH5,5). A continuación se adiciona la muestra en estudio en un volumen no mayor de 50 μ l, para ser incubado en acetato de sodio 25mM (pH 5,5) por 18 horas a 37°C. Se lava con PBS y se incuba por 2 horas con 150 μ l albúmina bovina al 1% a 37°C, para posteriormente lavar nuevamente con PBS.

Se agregó estreptoavidina conjugada con europio (PerkinElmer, Waltham, USA) diluida al 1:1000 en PBS, en una cantidad de 100ul por pocillo, incubándose a temperatura ambiente por 40 minutos, protegido de la luz. Se lava con PBS y se adiciona solución de realce (PerkinElmer, Waltham, USA) por 3 minutos en agitación.

La placa fue leída en el lector Victor² (PerkinElmer, Waltham, USA). Los valores obtenidos corresponden a la cantidad de heparan sulfato inmovilizado no degradado y la actividad de heparanasa se definió como el heparán sulfato degradado fruto de la diferencia entre la cantidad de heparán inmovilizado despues de la incubación con las muestras comparados a la curva de concentraciones de heparán sulfato inmovilizado realizada sin muestras. Los ensayos fueron realizados en triplicado.

Análisis estadístico:

Para la búsqueda de significancia estadística de los resultados se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis para búsqueda de diferencia entre las medias de los grupos de tratamientos y el test no paramétrico de Wilcoxon para analizar la significancia de la diferencia de medias entre dos tratamientos distintos. Estos análisis fueron realizados en el programa Stata 10.

Resultados

Ensayo de viabilidad dosis-dependencia

Se utilizó la técnica colorimétrica de sulforodamina B, la cual permite correlacionar la masa celular a la absorbancia obtenida de cada ensayo. El resveratrol se disolvió en alcohol etílico al 100%, y al ser usado para investigar su rol biológico queda diluido en concentraciones no superiores al 1% del alcohol etílico. Dado que este solvente podría ejercer efecto sobre la supervivencia de las líneas celulares, previo a la realización de los ensayos con las distintas dosis de resveratrol se comparó la viabilidad de las líneas celulares tratadas con etanol al 1% v/v respecto a las células sin tratar.

En la figura 6 se muestra el control negativo en comparación con el control de solvente (etanol al 1% v/v).

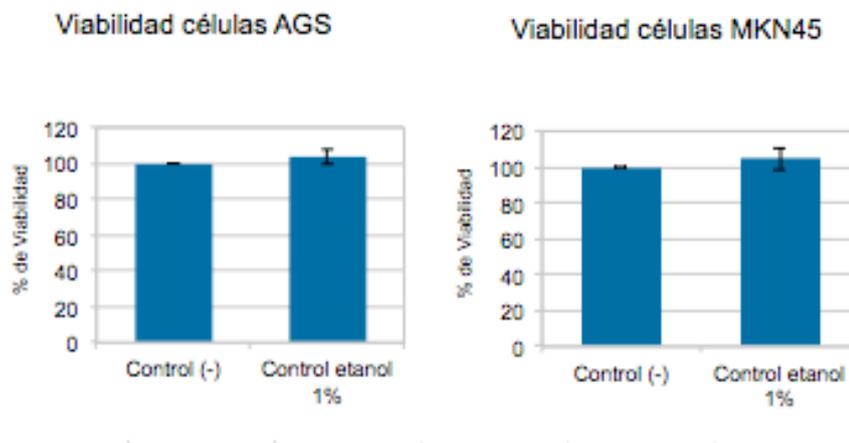


Figura 6: Viabilidad de células de las líneas AGS y MKN45 al ser expuestas a etanol 1% v/v (control de solvente). Los valores de absorbancia de seis mediciones por ensayo realizado por cuadruplicado fueron promediados y expresados como porcentaje del control sin exposición a etanol, con su respectiva desviación estándar. No existe diferencia estadísticamente significativa en la pequeña variación observable en el gráfico.

En la figura 6 se observa que el etanol al 1% v/v no tiene efecto significativo sobre la viabilidad celular en ninguna de las líneas celulares, no mostrando diferencia estadísticamente significativa en relación al control negativo ($p > 0,05$) en ambos casos,

por lo que a partir de estos resultados la comparación de los tratamientos se realizó entre las células tratadas con los compuestos y el control de solvente.

El efecto del resveratrol para cada dosis utilizada, tanto para la línea celular AGS (figura 7) como la MKN45 (figura 8) se observa en los siguientes gráficos:

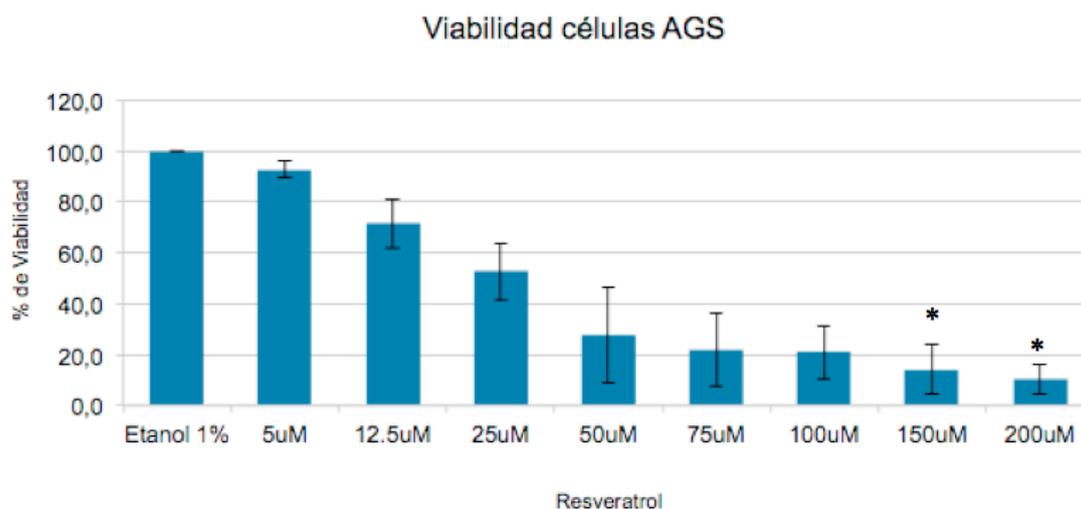


Figura 7: Efecto del resveratrol sobre la viabilidad en línea celular AGS. Los valores de absorbancia de seis mediciones por ensayo realizado por cuadruplicado fueron promediados y expresados como porcentaje del control sin exposición a etanol, con su respectiva desviación estándar. Existe significancia estadística (*) en la diferencia entre estos valores promedios ($p < 0,05$), específicamente para las concentraciones $150\mu\text{M}$ y $200\mu\text{M}$ con respecto al control ($p < 0,05$).

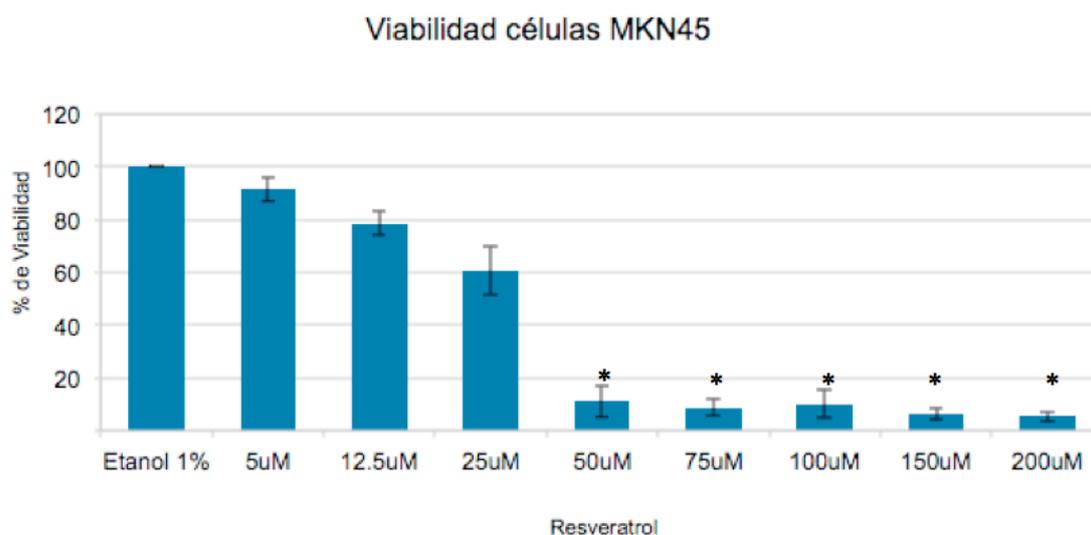


Figura 8: Efecto del resveratrol sobre la viabilidad en línea celular MKN45. Los valores de absorbancia de seis mediciones por ensayo realizado por cuadruplicado fueron promediados y expresados como porcentaje del control sin exposición a etanol, con su respectiva desviación estándar. Existe significancia estadística en la diferencia entre estos valores promedios ($p < 0,05$), específicamente para las concentraciones $200, 150, 100, 75, 50\mu\text{M}$ ($p < 0,05$).

En ambas líneas celulares se aprecia una disminución de la viabilidad dependiente de la dosis, encontrándose diferencias en la viabilidad con significancia estadística en ambos casos ($p < 0,05$).

En el caso de la línea celular AGS las concentraciones de resveratrol 200 μM , 150 μM reducen la viabilidad en más de 90% respecto al control, diferencia con significancia estadística ($p < 0,05$). En el caso de las concentraciones 100 μM , 75 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM y 5 μM se aprecia reducción en la viabilidad de alrededor un 80% en el caso de 100 μM y 75 μM , descendiendo progresivamente a reducción de más de 75% en el caso de 50 μM , 45% en el caso de 25 μM , llegando a viabilidades que superan el 70% y 90% en el caso de 12,5 μM y 5 μM , respectivamente.

En el caso de la línea celular MKN45 las concentraciones de resveratrol 200 μM , 150 μM , 100 μM , 75 μM , 50 μM presentan reducciones de la viabilidad mayores al 80%, llegando a mayores del 95% en caso de los 200 μM , con diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p < 0,05$). Las concentraciones 25 μM , 12,5 μM y 5 μM presentan reducciones desde el 40% hasta cerca del 10% en el caso de 5 μM .

Ensayo de viabilidad tiempo-dependencia

Se continuó trabajando con 3 concentraciones de Resveratrol (25 μM , 12,5 μM , 5 μM), tanto para este ensayo como para los siguientes. Estas concentraciones, a pesar de tener menor efecto sobre la viabilidad de ambas líneas de cáncer gástrico, poseen efecto *in vitro* demostrado en la inhibición de NF- κB en líneas celulares mieloides, linfoides y epiteliales [64, 65]. Se analizó el efecto de cada concentración de resveratrol a las 24, 48, 72 y 144 horas de exposición en relación al control de etanol al 1% v/v tal y como se indicó anteriormente para el análisis de dosis-dependencia .

En las siguientes figuras (figuras 9 y 10) se observa la viabilidad celular dependiente del tiempo:

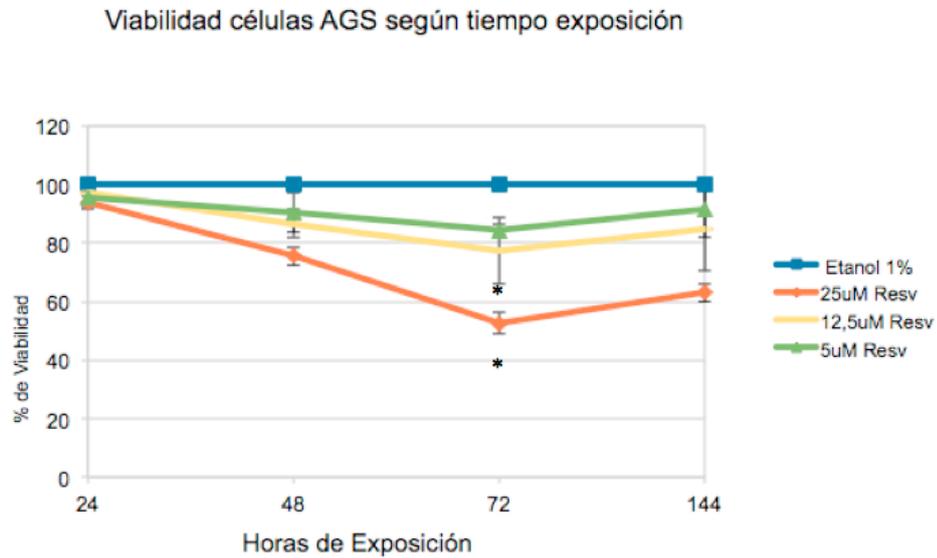


Figura 9: Efecto del resveratrol en dosis 25, 12,5 y 5 μM a las 24, 48, 72 y 144 horas de exposición en la línea celular AGS. Se grafica en función del control de etanol 1%v/v los promedios de las mediciones de absorbancia de 6 pocillos para cada concentración de resveratrol en las respectivas horas de exposición evaluadas, procedimiento realizado por cuadruplicado. Existe significancia estadística (*) entre horas de medición para las diferencias de viabilidad al utilizar 25 μM y 12,5 μM ($p < 0,05$).

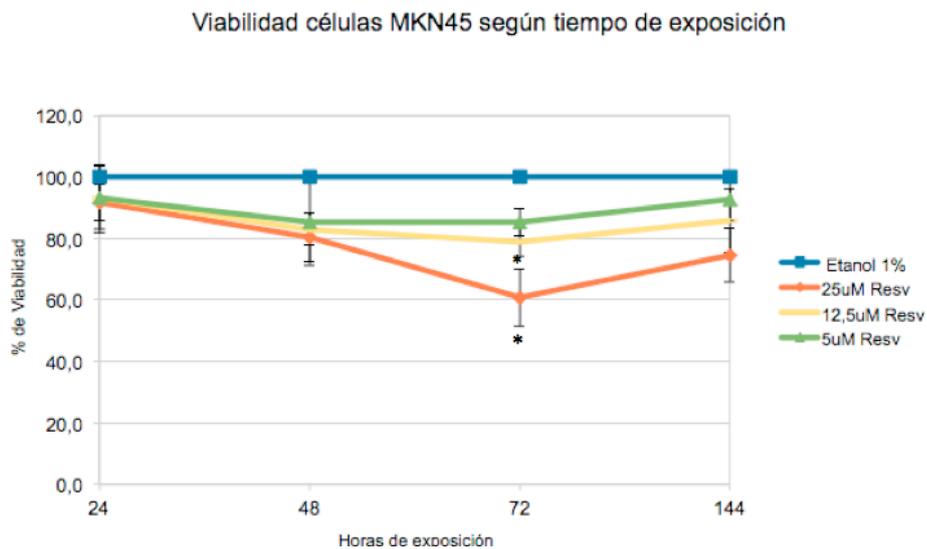


Figura 10: Efecto del resveratrol en dosis 25, 12,5 y 5 μM a las 24, 48, 72 y 144 horas de exposición en la línea celular MKN45. Se grafica en función del control de etanol 1%v/v los promedios de las mediciones de absorbancia de 6 pocillos para cada concentración de resveratrol en las respectivas horas de exposición evaluadas, procedimiento realizado por cuadruplicado. Existe significancia estadística (*) entre horas de medición para las diferencias de viabilidad al utilizar 25 μM y 12,5 μM ($p < 0,05$).

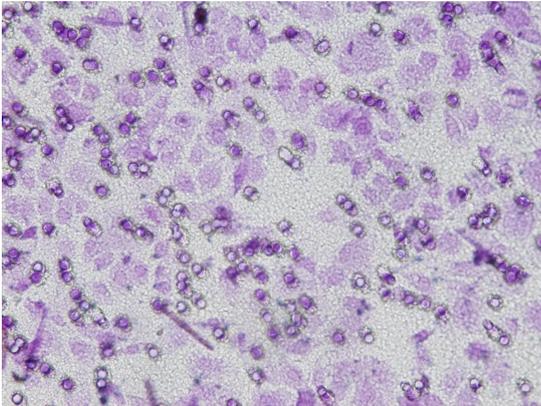
Se observa que en ambas líneas celulares el efecto del resveratrol sobre la viabilidad aumenta con el paso de las horas, llegando a un punto mínimo a las 72 horas, para luego revertirse en la medición de la viabilidad realizada a las 144 horas. Estas diferencias entre el efecto del resveratrol sobre la viabilidad dependiendo del tiempo poseen significancia estadística en ambas líneas celulares al disminuir la dosis hasta la concentración $12,5 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$), ya que si bien con la concentración $5 \mu\text{M}$ se observa un efecto mayor a las 72 horas, la diferencia no es estadísticamente significativa respecto a los otros tiempos de medición.

Efecto de resveratrol sobre la capacidad invasiva de las líneas celulares

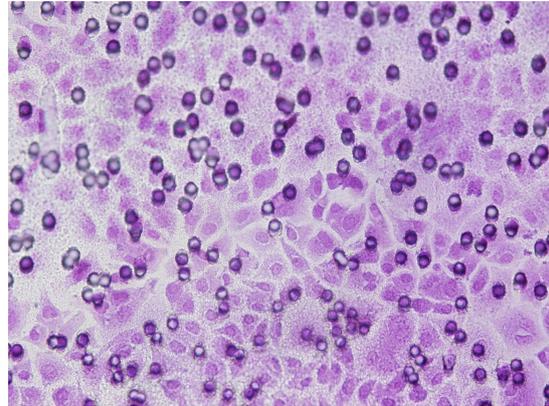
Se realizó el ensayo en cámara de invasión con el fin de evaluar la capacidad invasiva de las líneas celulares AGS y MKN45 sometidas al rango de concentraciones ya probadas en la prueba de tiempo-dependencia, para lo cual se utilizó una cámara de invasión con matrigel por cada concentración $25 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ y el control de etanol 1%. Este procedimiento fue realizado en triplicado, promediando los resultados de cada ensayo y expresando los resultados como porcentaje de células que logran invadir a través de la membrana porosa con respecto al control.

A continuación se muestran fotografías (400x) representativas del efecto del resveratrol sobre la capacidad invasiva de las líneas celulares (figura 11):

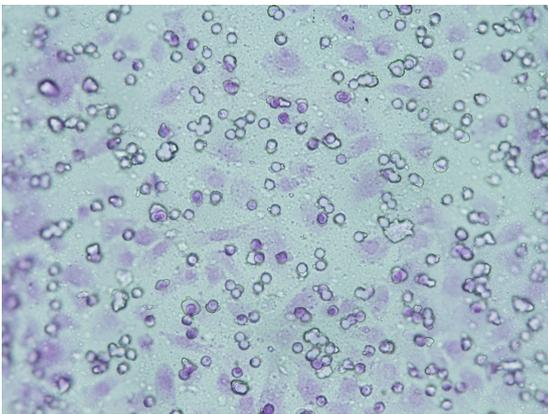
AGS Etanol 1%



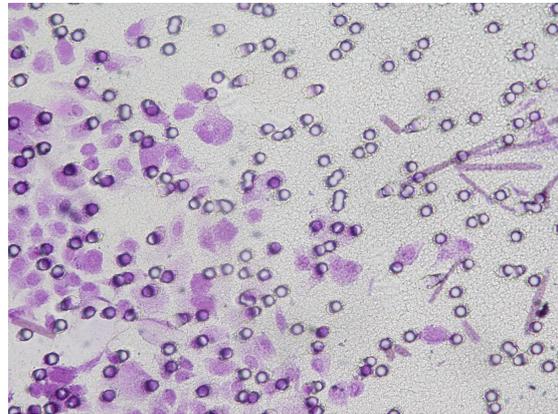
MKN45 Etanol 1%



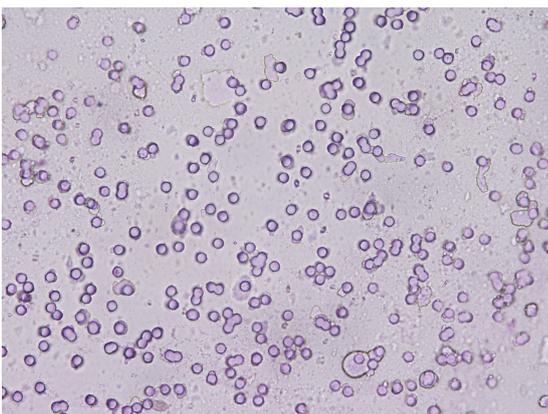
AGS 5 μ M Resveratrol



MKN45 5 μ M Resveratrol



AGS 25 μ M Resveratrol



MKN45 25 μ M Resveratrol

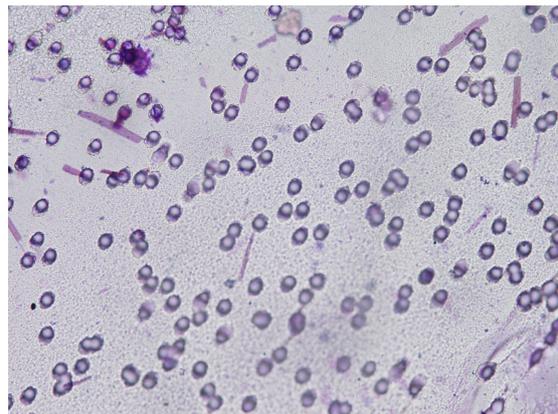


Figura 11: Fotografías (400x) representativas de los 15 campos evaluados al azar para cada membrana. Se puede apreciar una disminución del número de células, tanto para la línea celular AGS como MKN45 que logran invadir el matrigel y la membrana porosa en la medida que aumenta la concentración de Resveratrol, comparado al control de etanol 1%.

Para cuantificar este fenómeno se expone en los siguientes gráficos (figuras 12 y 13) el conteo de células:

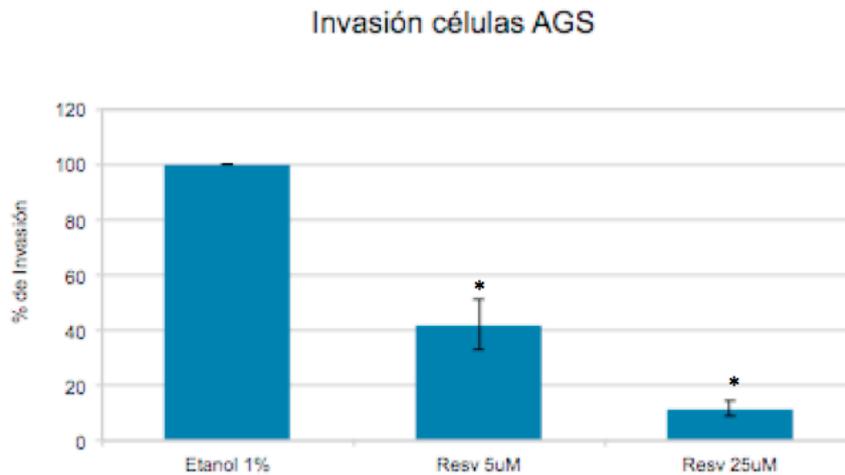


Figura 12: Ensayo en cámara de invasión. Células de la línea AGS fueron expuestas por 72 horas a cada concentración de resveratrol y el control de etanol. Las células que invadieron matrigel y membrana porosa fueron contadas de 15 campos (400x) al azar y la suma de células se promedió del triplicado del ensayo. Se grafica el promedio de células, con su respectiva desviación estándar, en función al control de etanol. Ambas concentraciones presentan significancia estadística (*) en su diferencia al control ($p < 0,05$).

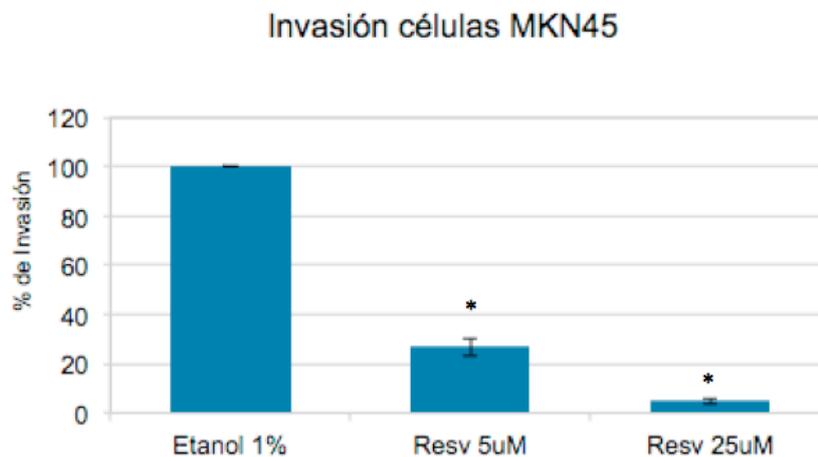


Figura 13: Ensayo en cámara de invasión. Células de la línea MKN45 fueron expuestas por 72 horas a cada concentración de resveratrol y el control de etanol. Las células que invadieron matrigel y membrana porosa fueron contadas de 15 campos (400x) al azar y la suma de células se promedió del triplicado del ensayo. Se grafica el promedio de células, con su respectiva desviación estándar, en función al control de etanol. Ambas concentraciones presentan significancia estadística (*) en su diferencia al control ($p < 0,05$).

Se puede apreciar en la línea celular AGS una disminución, respecto al control de etanol 1%, cercana a un 60% de la capacidad invasiva ($p < 0,05$) con la concentración de 5 μM de resveratrol, así como de cerca del 90% con la concentración 25 μM ($p < 0,05$).

En el caso de la línea celular MKN45 se aprecia una disminución, respecto al control de etanol 1%, de más de 70% de la capacidad invasiva ($p < 0,05$) con la concentración de 5 μM de resveratrol, así como de cerca del 95% con la concentración 25 μM ($p < 0,05$).

Actividad de SOD

Teniendo en cuenta el efecto del resveratrol sobre la capacidad invasiva de las líneas celulares AGS y MKN45 se procedió a evaluar el efecto de este polifenol sobre la actividad de SOD en ambas líneas celulares. resveratrol aumenta la actividad de las 3 isoformas de SOD [62, 63], así como en líneas de cáncer de mama el aumento de expresión de SOD3 disminuye la actividad de Heparanasa [41], situación que podría explicar el efecto de Resveratrol sobre la capacidad invasiva.

La actividad de SOD fue medida por triplicado para cada grupo de células tratadas con 25, 12,5 y 5 μM de resveratrol, así como para el control de etanol 1% de ambas líneas celulares y normalizada por la concentración de proteínas totales respectiva, quedando la actividad expresada en porcentaje de actividad respecto al control por cada $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas totales. Los siguientes gráficos (figuras 14 y 15) muestran los resultados de la actividad:

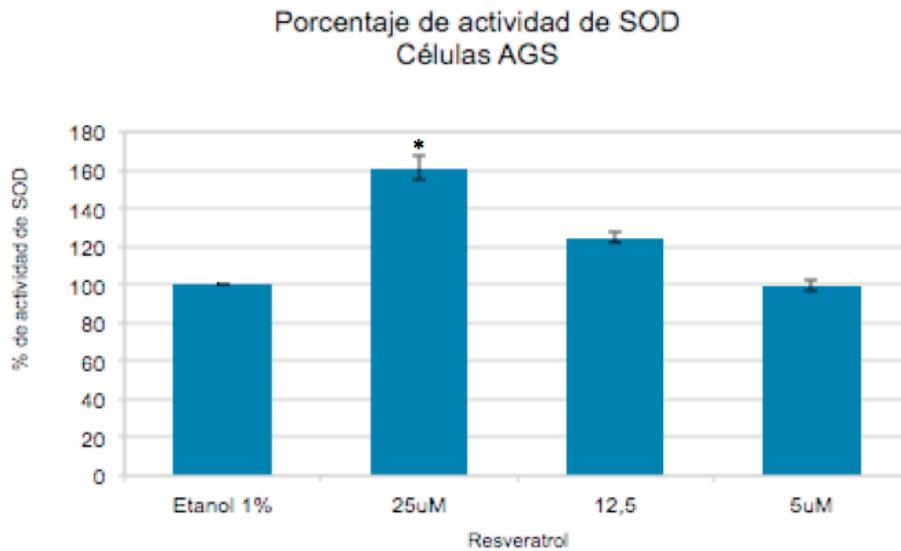


Figura 14: Actividad de SOD en función al control de etanol en células AGS, normalizada por concentración de proteínas totales. Valores obtenidos de 3 mediciones fueron promediadas y graficadas con sus respectivas desviaciones estándar. En el caso de la concentración 25 μM la diferencia alcanza significancia estadística (*) ($p < 0,05$).

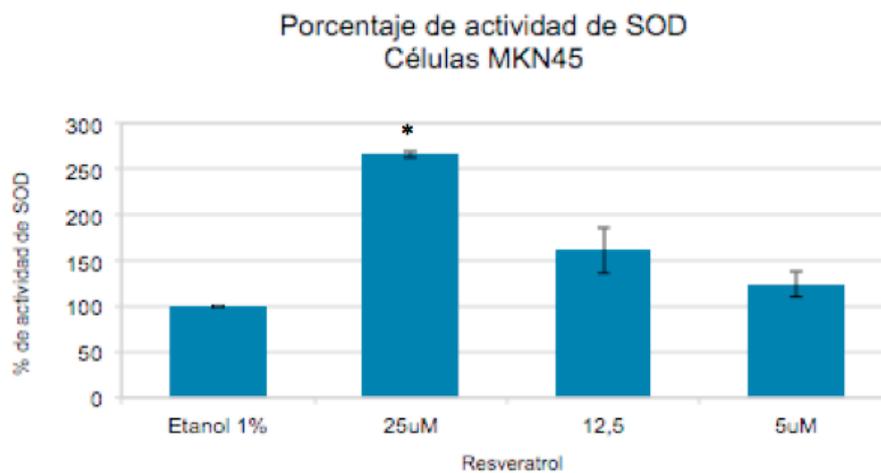


Figura 15: Actividad de SOD en función al control de etanol en células MKN45, normalizada por concentración de proteínas totales. Valores obtenidos de 3 mediciones fueron promediadas y graficadas con sus respectivas desviaciones estándar. En el caso de la concentración 25 μM la diferencia alcanza significancia estadística (*) ($p < 0,05$).

En el caso de la línea celular AGS, el resveratrol es capaz de aumentar el porcentaje de actividad de SOD en las concentraciones de 25 y 12,5 μM , llegando a un aumento de 60%, en el caso de la concentración 25 μM , sobre el control de etanol 1%, alcanzando significancia estadística ($p < 0,05$).

En el caso de la línea celular MKN45, las 3 concentraciones logran aumentar la actividad de SOD por sobre el control de etanol 1%, llegando a un aumento de 150% por sobre el control en el caso de la concentración de resveratrol 25 μM ($p < 0,05$). Las concentraciones 12,5 μM y 5 μM logran aumentos comparativamente mayores a los alcanzados a las mismas concentraciones en la línea celular AGS, sin embargo, no alcanzan la significancia estadística.

Activación de NF- κ B.

Con objeto de estudiar el efecto del resveratrol sobre la activación de NF- κ B, inhibición que podría explicar el efecto sobre la inhibición de la capacidad invasiva de las líneas celulares estudiadas se realizó el siguiente ensayo que cuantifica el p65 traslocado al núcleo por medio de una reacción enzimática colorimétrica asociada a HRP. Tanto para la línea celular AGS como MKN45 se comparó el efecto de resveratrol en 25, 12,5 y 5 μM , gliotoxina 100 ng/ml (inhibidor de activación de NF- κ B) y el control de etanol 1%. Se midió la absorbancia en duplicado para cada tratamiento, fue promediada, normalizada por las proteínas totales nucleares ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y expresada como porcentaje del resultado de activación respecto del control etanol.

Activación de NF-kB en línea AGS

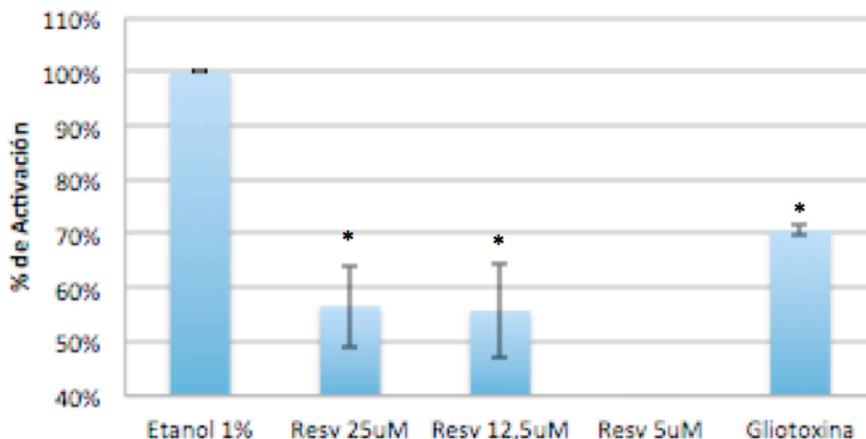


Figura 16: Actividad de NF-kB medido como el p65 traslocado a núcleo, en función del control y normalizado por proteínas nucleares totales en la línea celular AGS. Valores obtenidos del promedio de 2 mediciones de p65 con su respectiva desviación estándar. La diferencia en actividad para los 3 tratamientos graficados presenta significancia estadística (*) ($p < 0,05$). El extracto nuclear tratado con $5\mu\text{M}$ no pudo ser evaluado por destrucción errónea.

En la figura 16, correspondiente a la línea celular AGS se observa que, bajo el estímulo del tratamiento con gliotoxina 100ng/ml , un inhibidor conocido de NF-kB, el porcentaje de activación de este factor de transcripción se reduce en un 30%, disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Al igual que gliotoxina, el resveratrol en 25 y $12,5\mu\text{M}$ reduce la activación de NF-kB, en un porcentaje de alrededor un 45%, lo cual corresponde a una disminución significativa respecto al control.

Activación de NF-kB en línea MKN45

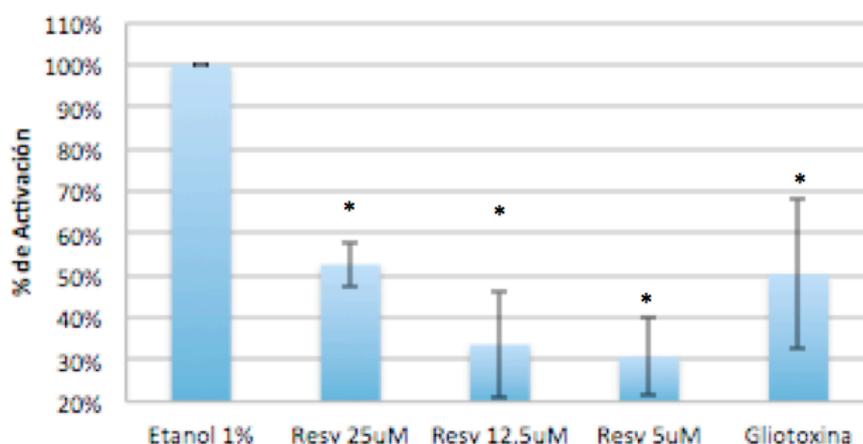


Figura 17: Actividad de NF-kB medido como el p65 traslocado a núcleo, en función del control y normalizado por proteínas nucleares totales en la línea celular AGS. Valores obtenidos del promedio de 2 mediciones de p65 con su respectiva desviación estándar. La diferencia en actividad para los 3 y gliotoxina tratamientos graficados presenta significancia estadística ($p < 0,05$).

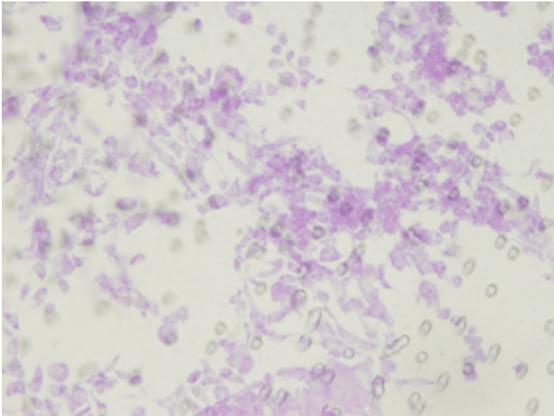
En la figura 17, correspondiente a la línea celular MKN45 se observa como, bajo el tratamiento con gliotoxina (100ng/ml), el porcentaje de activación de este factor de transcripción se reduce cerca de un 50%, disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Al igual que gliotoxina, el resveratrol en 25, 12,5 y 5 μM reduce la activación de NF-kB, en un porcentaje de alrededor un 50% en el caso del tratamiento con 25 μM de resveratrol y una disminución de aproximadamente 30% para las concentraciones de 12,5 y 5 μM , lo cual corresponde a una variación significativa respecto al control.

Efecto del resveratrol sobre la capacidad invasiva y su relación con NF-kB

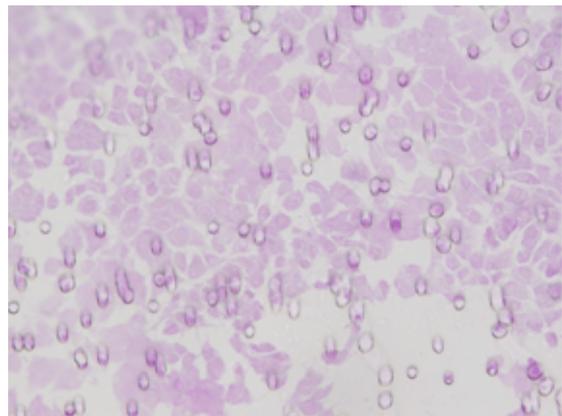
Considerando que el resveratrol se comporta de forma similar a gliotoxina en su efecto como inhibidor de la activación de NF-kB se realizó de nuevo el ensayo de invasión con matrigel. con las mismas características previamente descritas, salvo que se utilizaron 3 tratamientos: etanol 1% como control, Resveratrol 25 μM y gliotoxina 100ng/ml. Este procedimiento fue realizado en duplicado, promediando los resultados de cada ensayo y expresando los resultados como porcentaje de células que logran invadir con respecto al control.

A continuación se muestran fotografías (400x) representativas del efecto del resveratrol y/o gliotoxina sobre la capacidad invasiva de las líneas celulares (Figura 18):

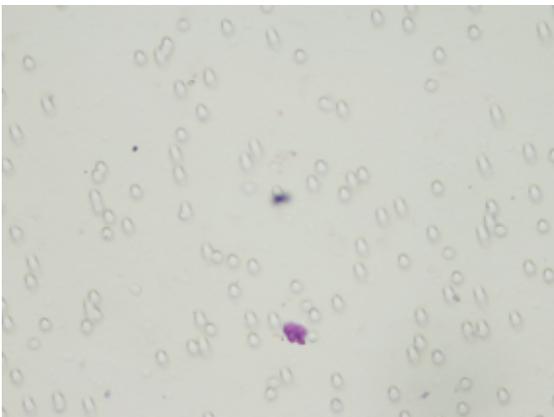
AGS Etanol 1%



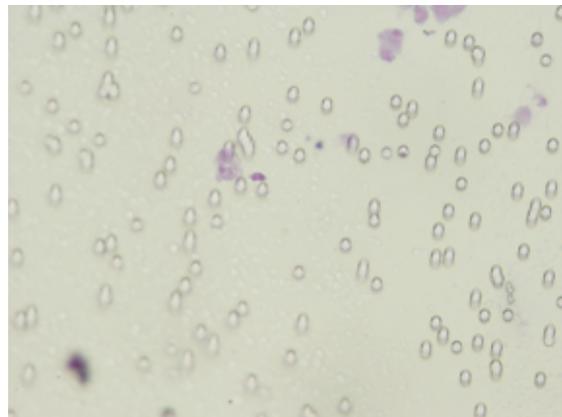
MKN45 Etanol 1%



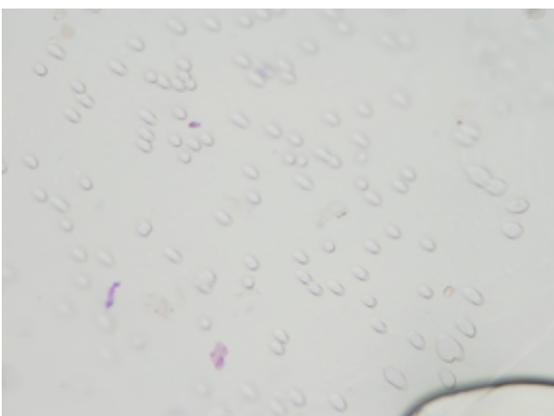
AGS 25 μ M Resveratrol



MKN45 25 μ M Resveratrol



AGS Gliotoxina 100ng/ml



MKN45 Gliotoxina 100ng/ml

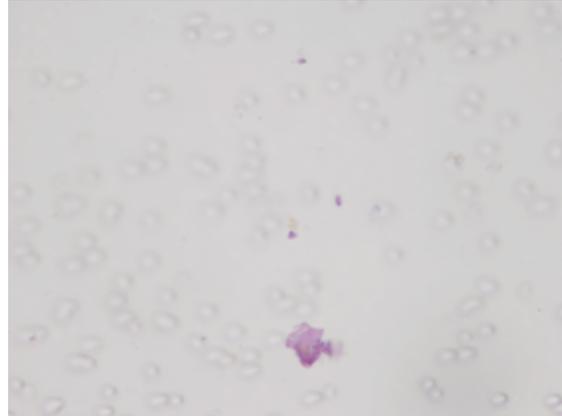


Figura 18: Fotografías (400x) representativas de los 15 campos evaluados al azar para cada membrana. Se puede apreciar una disminución del número de células, tanto para la línea celular AGS como MKN45 que logran invadir el matrigel y la membrana porosa, tanto para el tratamiento con resveratrol como el tratamiento con gliotoxina, inhibidor de la activación de NF- κ B, comparado al control de etanol 1%.

Las imágenes previas fueron cuantificadas y se muestran en los siguientes gráficos (figuras 19 y 20), en los cuales se observa que en ambas líneas celulares el tratamiento

con resveratrol 25 μ M ejerce un efecto inhibitorio de la invasividad *in vitro* análogo al que muestra el tratamiento con gliotoxina 100ng/ml, inhibidor de la activación de NF- κ B. Ambos tratamientos, tanto para la línea AGS como MKN45 presentan significancia estadística en comparación al control de etanol 1% ($p < 0,05$).

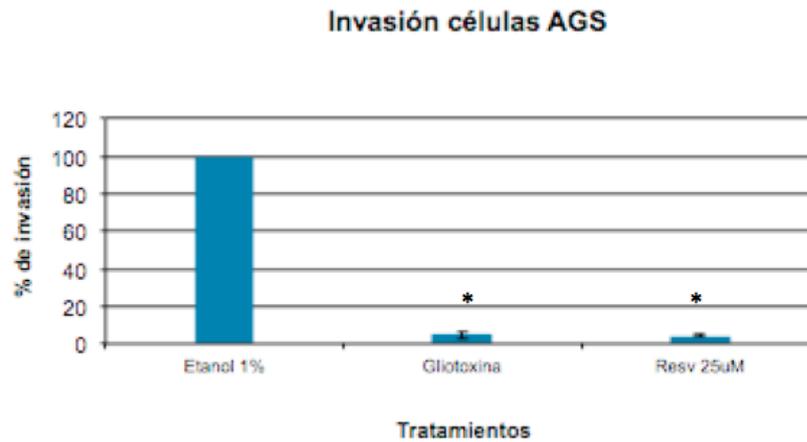


Figura 19: Ensayo en cámara de invasión. Células de la línea AGS fueron expuestas por 72 horas resveratrol 25 μ M, gliotoxina 100ng/ml y al control de etanol. Las células que invadieron matrigel y membrana porosa fueron contadas de 15 campos (400x) al azar y la suma de células se promedió del duplicado del ensayo. Se grafica el promedio de células, con su respectiva desviación estándar, en función al control de etanol. Ambos tratamientos presentan significancia estadística (*) en su diferencia al control ($p < 0,05$).

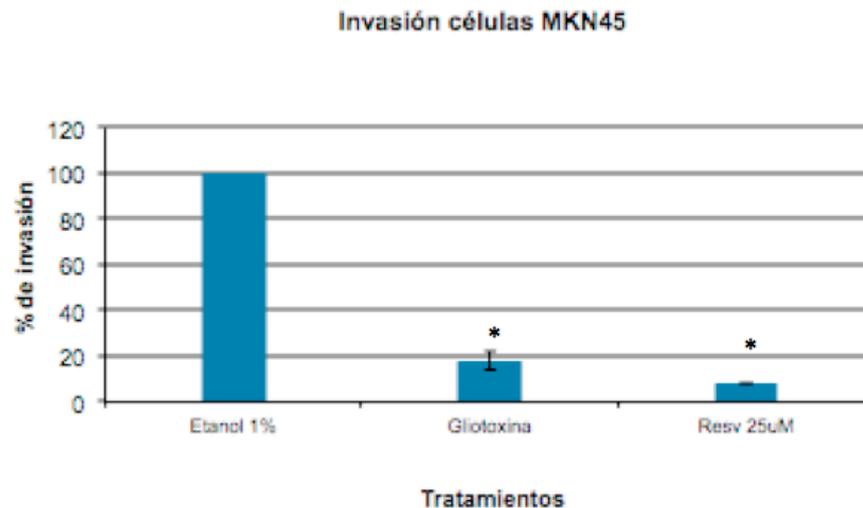


Figura 20: Ensayo en cámara de invasión. Células de la línea MKN45 fueron expuestas por 72 horas resveratrol 25 μ M, gliotoxina 100ng/ml y al control de etanol. Las células que invadieron matrigel y membrana porosa fueron contadas de 15 campos (400x) al azar y la suma de células se promedió del duplicado del ensayo. Se grafica el promedio de células, con su respectiva desviación estándar, en función al control de etanol. Ambos tratamientos presentan significancia estadística (*) en su diferencia al control ($p < 0,05$).

Actividad de heparanasa en las líneas celulares

Con el fin de cuantificar el efecto de resveratrol sobre la actividad de Heparanasa, enzima planteada como clave en este estudio en el proceso de invasión del cáncer gástrico, se realizó el ensayo en el cual expresan los resultados de la actividad de la enzima heparanasa en función a la capacidad de degradación de Heparán Sulfato por parte de la fracción celular del cultivo y del medio de cultivo de las líneas celulares AGS y MKN45 tratadas con Resveratrol en las concentraciones de 25 μ M, 12,5 μ M y 5 μ M comparado al control de etanol 1%.

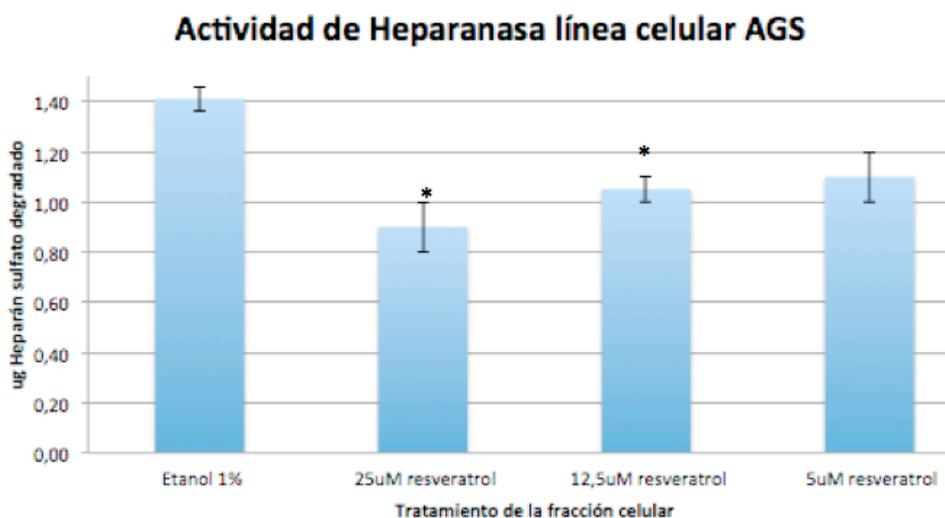


Figura 21: Actividad de Heparanasa calculada según la capacidad de degradación de heparán sulfato por cada fracción celular de líneas AGS expuestas a resveratrol y al control de etanol, normalizada por concentración de proteínas. Se grafica el promedio de los valores obtenidos del ensayo realizado en triplicado, con su respectiva desviación estándar. La disminución de actividad de heparanasa para 25 μ M y 12,5 μ M presenta significancia estadística (*) ($p < 0,05$).

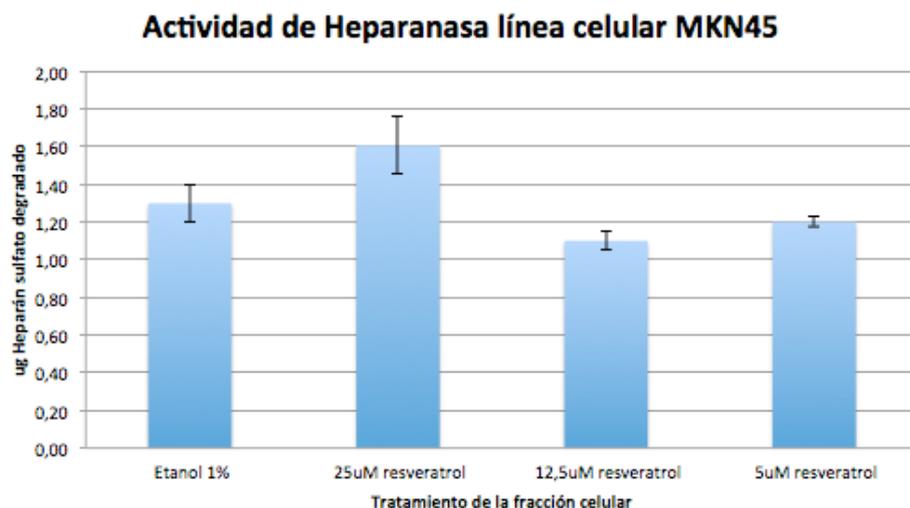


Figura 22: Actividad de Heparanasa calculada según la capacidad de degradación de heparán sulfato por cada fracción celular de líneas MKN45 expuestas a resveratrol y al control de etanol, normalizada por concentración de proteínas. Se grafica el promedio de los valores obtenidos del ensayo realizado en triplicado, con su respectiva desviación estándar. Las diferencias en la actividad de heparanasa de los distintos tratamientos no presenta significancia estadística ($p>0,05$).

Como se aprecia en el gráfico (figura 21) , en el caso de la línea celular AGS la extracción celular presenta una disminución de la actividad de heparanasa en las 3 concentraciones utilizadas frente al control, con disminución dependiente de la concentración de resveratrol, disminuyendo la actividad alrededor de un 40% en la concentración 25 μM de Resveratrol, y un 25% en la concentración 12,5 μM , respecto al control. La disminución de actividad provocada por ambas concentraciones de resveratrol mencionadas poseen significancia estadística ($p<0,05$). Si bien la concentración 5 μM de resveratrol genera disminución en promedio de la actividad, no alcanza significancia ($p>0,05$).

En el caso de la fracción celular del cultivo de la línea celular MKN45 (figura 22), existe un aumento sin significancia estadística de la actividad de heparanasa frente al tratamiento de 25 μM de resveratrol, mientras que las otras 2 concentraciones poseen una ligera disminución, pero al igual que la concentración mayor de resveratrol, sin significancia estadística ($p>0,05$).

Actividad de Heparanasa en medio de cultivo condicionado por línea AGS

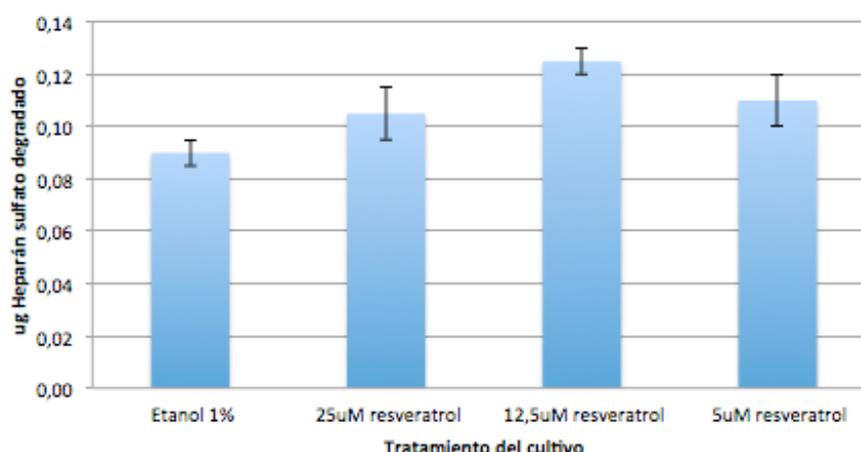


Figura 23: Actividad de Heparanasa calculada según la capacidad de degradación de heparán sulfato por los medios de cultivo condicionados de líneas AGS expuestas a resveratrol y al control de etanol, normalizada por concentración de proteínas. Se grafica el promedio de los valores obtenidos del ensayo realizado en triplicado, con su respectiva desviación estándar. Las diferencias en la actividad de heparanasa no poseen significancia estadística ($p > 0,05$).

Actividad de Heparanasa en medio de cultivo condicionado línea MKN45

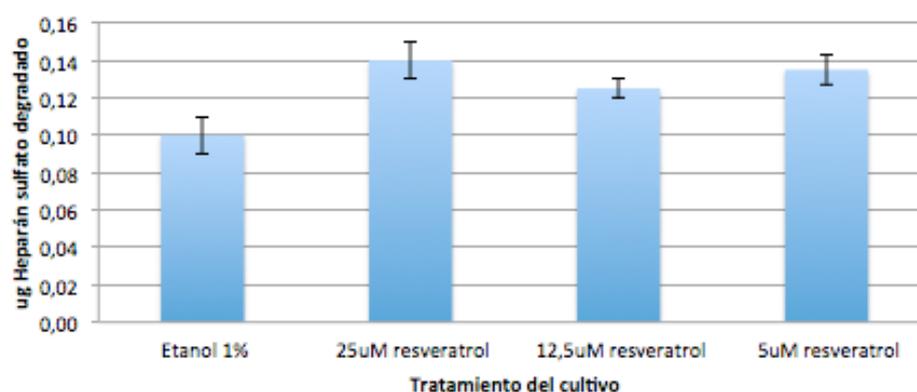


Figura 24: Actividad de Heparanasa calculada según la capacidad de degradación de heparán sulfato por los medios de cultivo condicionados de líneas AGS expuestas a resveratrol y al control de etanol, normalizada por concentración de proteínas. Se grafica el promedio de los valores obtenidos del ensayo realizado en triplicado, con su respectiva desviación estándar. Las diferencias en la actividad de heparanasa no poseen significancia estadística ($p > 0,05$).

En el caso del medio de cultivo condicionado por las células de las líneas AGS y MKN45 (figuras 23 y 24), se observa un aumento en la actividad de heparanasa, en función a la degradación de heparán sulfato, respecto al control. Sin embargo, estas diferencias no alcanzan significancia estadística ($p > 0,05$).

Discusión

El resveratrol puede considerarse dentro del grupo de los denominados fitoquímicos, término que se suele utilizar para definir a los compuestos bioactivos presentes en alimentos y bebidas de origen vegetal, sin valor nutricional, y que poseen cualidades preventivas o de tratamiento para ciertas enfermedades (enfermedades cardiovasculares, neoplásicas, neurodegenerativas, entre otras) [66-68]. Sin embargo, la definición es un poco más amplia, ya que a este grupo también pertenecen compuestos derivados de especies vegetales que han sido utilizadas como herramientas terapéuticas a lo largo de la historia, pero que no necesariamente son parte de la dieta (como lo es la Vincristina, derivada de la especie *Vinca rosea*, utilizada para el tratamiento del cáncer en la medicina tradicional india[69]) o incluso vegetales evitados por su potencial tóxico, como por ejemplo las especies del género *Taxus*, productores de la clase de quimioterapéuticos denominados taxanos [70], conocidas desde la antigüedad como fuente de venenos (como menciona Plinio el viejo en su Historia Natural).

El viaje del resveratrol desde los usos tradicionales de elementos vegetales que los contienen hasta las investigaciones en los más diversos campos de la salud humana, animal y vegetal incluye hallazgos prometedores en el complejo grupo de las patologías neoplásicas. Como ya fue expuesto, el resveratrol ha mostrado efecto beneficioso sobre la iniciación, promoción y progresión del proceso carcinogénico [55]. Hay algunos casos de quimiopreventivos/quimioterapéuticos de origen vegetal donde existe un mecanismo de acción único conocido que explica sus efectos, como es el caso del ya mencionado Taxol y su efecto sobre Topoisomerasa, sin embargo, este hecho no se ajusta a la mayoría de estos compuestos [70]. En general estos compuestos presentan un mecanismo complejo por el cual ejercen su efecto, y el resveratrol es ejemplo de aquello.

Una mirada a los mecanismos más importantes identificados que explicarían los efectos antineoplásicos del resveratrol serían: inhibición del citocromo p450 (lo que reduce la transformación de sustancias exógenas, denominadas procarcinógenos, en carcinógenos y aumenta biodisponibilidad de quimioterapéuticos), inhibición de ciclooxigenasa (reduciendo los mediadores inflamatorios que favorecerían el proceso carcinogénico)[55]; modulación del daño oxidativo inhibiendo la función de ornitina descarboxilasa y la lipoperoxidación, así como aumentando la actividad de SOD, glutatión peroxidasa, catalasa y quinona reductasa [71]. Asociado a aquello, el resveratrol ha demostrado inducir apoptosis eficientemente mediante la regulación al alza de p53, activación de caspasas, disminución de niveles de Bcl-2 y Bcl-x, incremento de Bax, inhibición de ciclinas tipo D e interferencias en las vías de señalización de NF-kB y AP-1[72]. Si bien en los procesos de invasión y metástasis se han descrito efectos del resveratrol sobre enzimas clave como las MMPs, la revisión bibliográfica y artículos de revisión no muestran el posible efecto que pueda tener sobre Heparanasa [54].

La figura 25 expone la gran cantidad de información a modo de esquema agrupando la relación de resveratrol con diferentes procesos celulares:

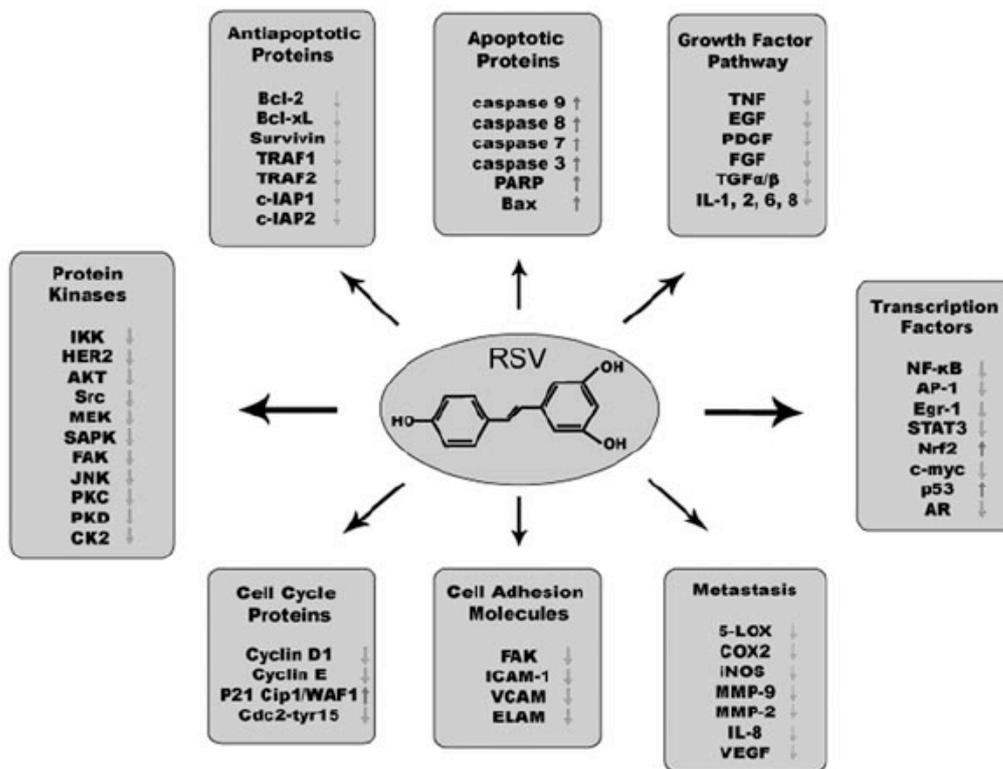


Figura 25: Blancos moleculares descritos en el efecto anti-carcinogénico del Resveratrol[54].

Existe evidencia *in vitro* de que resveratrol disminuye la proliferación de diversos tipos de cáncer e induce apoptosis y secuestro del ciclo celular en etapa S/G2, de forma dependiente de la dosis y con dosis efectivas desde los 5 μ M [54, 73, 74]. Así mismo, en el caso de cáncer gástrico, a nivel de líneas AGS y KATO-III se había demostrado previamente la disminución de la proliferación, con dosis de 100 μ M de resveratrol, con una dependencia al tiempo de exposición (efecto máximo a las 48hrs-72hrs)[75]. En el presente trabajo, se observa una disminución de la proliferación de más de 75% en las líneas AGS y MKN45 desde la concentración 50 μ M, llegando a niveles cercanos al 100% con dosis 200 μ M a las 72hrs. Esto muestra claramente como el resveratrol posee un efecto dependiente de la dosis utilizada, tanto para la línea celular AGS como la MKN45.

En caso de la prueba de tiempo dependencia se utilizaron las concentraciones 25, 12,5 y 5 μ M, en las cuales se logra significancia estadística de la disminución de la

proliferación a las 72 horas de exposición al compuesto. Posterior a esto la tendencia a la recuperación de los niveles celulares a las 144 horas es clara, volviendo a niveles de viabilidad en que la diferencia no posee significancia estadística. Con estos antecedentes es posible postular que el efecto de una dosis única de resveratrol *in vitro* sobre las líneas AGS y MKN45 posee dependencia al tiempo de exposición al compuesto.

La invasión y la metástasis en el proceso neoplásico son las principales causas de la falla de tratamiento, además de ser el evento que se relaciona con mayor frecuencia con la muerte del paciente [2]. De esta forma, estrategias para prevenir o suprimir la invasión y metástasis debieran mejorar la sobrevida de los pacientes con cáncer. La degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular son los eventos iniciales y esenciales que las células neoplásicas deben llevar a cabo para invadir tejidos colindantes y realizar metástasis a órganos distantes [76]. Los componentes de estas barreras (componentes de la matriz extracelular como HSPGs, colágenos, fibronectinas, lamininas, entre otros) son degradados por una batería enzimática celular; MMPs, así como Heparanasa [13]. Estas enzimas son importantísimas en procesos de migración leucocitaria y del desarrollo embrionario, pero en este caso son la clave de un proceso fisiopatológico grave y con consecuencias mortales en la mayoría de los casos.

Junto al ya nombrado efecto sobre la viabilidad, queda demostrado el efecto anti-invasivo del resveratrol en las líneas celulares AGS y MKN45 *in vitro*, invasión a través de la membrana con matrigel casi ausente en la concentración 25 μM y disminuyendo a menos de la mitad comparado al control en el caso de la concentración 5 μM . Estos resultados son similares a los obtenidos con el uso de siRNA contra heparanasa en cáncer gástrico [17]. A su vez, existe evidencia *in vitro* en líneas de cáncer de mama con un análogo natural del resveratrol, el piceatanol, donde se observa una reducción de cerca del 60% de invasión respecto al control a una concentración de 10 μM [24], lo que

hace de los resultados obtenidos con resveratrol en el presente estudio, datos muy prometedores.

Concordante a estos resultados, se aprecia un aumento de actividad total de SOD dependiente de la concentración de resveratrol, que varía entre 0,6 veces en la línea celular AGS y 1,5 veces en la línea celular MKN45. Esta situación concuerda con los resultados del ensayo de invasión, situación en la cual ROS se han implicado en la activación patológica de MMPs y uPA, así como en la sobreexpresión de Heparanasa y en el efecto directo en la degradación de HS. Es más, resultados previos a nivel de líneas de cáncer de mama demostraron que el secuestro de ROS por la sobreexpresión de la forma extracelular de SOD se relaciona con la disminución en la expresión y actividad de Heparanasa, teniendo como consecuencia una disminución de la capacidad invasiva de las líneas celulares en estudio [41].

Dentro del proceso que sigue la neoplasia para llevar adelante la invasión de los tejidos, el aumento de expresión de Heparanasa ha sido ligada en cáncer gástrico a la activación de NF- κ B [43]. Teniendo en cuenta ese hecho, se evaluó la activación de NF- κ B en ambas líneas celulares tratadas con resveratrol y se constató que existe una disminución de aproximadamente un 50% en la activación de NF- κ B al tratar la línea celular AGS con resveratrol en las dosis 25 y 12,5 μ M, así como una disminución de alrededor un 50% de la activación con el tratamiento de 25 μ M y aproximadamente un 70% con las dosis 12,5 y 5 μ M en la línea celular MKN45. Las disminuciones en la activación en ambas líneas celulares presentan significancia estadística ($p < 0,05$).

La activación de NF- κ B en presencia de resveratrol fue contrastada con gliotoxina (inhibidor específico de NF- κ B) a una concentración de 100ng/ml en ambas líneas celulares. Esos resultados muestran que si bien la disminución de activación de NF- κ B con los tratamientos de resveratrol muestran una tendencia a ser mayor, no existe

diferencia estadística entre los tratamientos con resveratrol y gliotoxina a 100ng/ml en los ensayos realizados. Estos resultados arrojan como el resveratrol presenta, al menos, la misma actividad de inhibición de la activación de NF-kB como la gliotoxina en las líneas de cáncer gástrico evaluadas.

Para evaluar la participación de NF-kB en los eventos de invasión, se realizó un nuevo ensayo en cámara de invasión, esta vez contrastando la dosis de resveratrol 25 μ M a la dosis de gliotoxina usada en la cuantificación de la activación de NF-kB. Tal como se esperaba, en ambas líneas celulares se observa como la inhibición de la activación de NF-kB mediada por gliotoxina 100ng/ml es similar a la que logra resveratrol 25 μ M, lo cual asociado a la inhibición que logra resveratrol de la activación de NF-kB permite inferir que la disminución de la capacidad invasiva de las líneas de cáncer gástrico tras el tratamiento con resveratrol podría deberse, al menos en parte, a la disminución de la activación de NF-kB inducida por resveratrol.

El efecto sobre la capacidad invasiva de ambas líneas celulares se correlaciona con los resultados sobre la actividad de SOD y la activación de NF-kB. Según lo planteado como hipótesis en este trabajo sería la Heparanasa el efector de invasión de estas líneas celulares de cáncer gástrico el que vería afectada su actividad a causa del efecto del resveratrol sobre SOD y NF-kB.

Al evaluar la actividad de Heparanasa las concentraciones 25 μ M y 12,5 μ M de resveratrol disminuyen con significancia estadística ($p < 0,05$) la actividad de Heparanasa de la fracción celular de la línea celular AGS. Este resultado aporta evidencia valiosa respecto al mecanismo que el resveratrol tendría para disminuir la capacidad invasiva de la línea celular AGS, al poseer efecto biológico sobre SOD y NF-kB.

Al evaluar la fracción celular de la línea celular MKN45 se observan resultados no concluyentes con la mayor actividad de SOD, disminución de la invasividad o la

disminución de la activación de NF- κ B. De esta situación se infiere que, si bien resveratrol tiene efecto sobre la actividad de Heparanasa en la línea celular AGS, al no tener efecto sobre la línea celular MKN45 debieran existir otros mecanismos mediante los cuales resveratrol disminuye la capacidad invasiva de esta línea celular. A su vez, las neoplasias suelen variar en su capacidad de resistencia a drogas [12], y si consideramos que el origen de las líneas celulares utilizadas en los ensayos tienen origen diferente en estadio neoplásico (derivado de tumor gástrico en el caso de AGS, derivado de metástasis hepática en MKN45 [77]) se podría plantear una posible explicación a esta diferencia basado en aquel hecho.

Al evaluar el efecto de resveratrol sobre la disminución de actividad de la Heparanasa secretada a medio en ambas líneas celulares no muestra resultados concluyentes. En la revisión bibliográfica no se encontró artículos que estudien la actividad de Heparanasa secretada a medio de cultivo, enzima que puede inactivarse frente a las variaciones de pH u otros factores fuera de las condiciones fisiológicas, por lo que faltan antecedentes para determinar si resveratrol influye en la actividad de esta enzima en los medios condicionados por las líneas AGS y MKN45.

Estudios previos muestran como el knock-down de Heparanasa disminuye la capacidad invasiva de líneas celulares de cáncer gástrico [17]. En el presente trabajo se constató el efecto *in vitro* del resveratrol sobre la capacidad invasiva de las líneas celulares AGS y MKN45. En la línea celular AGS existe disminución significativa de la actividad de Heparanasa con el uso de resveratrol, no así en la línea celular MKN45.

Por otro lado, en la bibliografía el resveratrol posee efecto sobre la actividad y niveles de MMPs (especialmente la MMP-2 y MMP-9) [56, 78], por lo que se puede plantear que la disminución de la capacidad invasiva de la línea celular MKN45 observada en el ensayo con matrigel en la cámara de invasión podría ser debida al efecto del

polifenol sobre MMPs. En este sentido, existe evidencia de que la inhibición de la activación de NF-kB reduce la expresión y actividad de MMPs, especialmente la MMP9, para la cual se encuentra evidencia molecular de que NF-kB se une específicamente a su secuencia génica. La evidencia aportada por el presente trabajo permite plantear que al menos en la línea celular AGS existe además disminución de la actividad de Heparanasa, concordante con la inhibición de NF-kB y la mayor actividad de SOD. Es posible plantear la hipótesis, al menos que para la línea celular MKN45 es la relación entre la inhibición de NF-kB y las MMPs lo que explicaría el efecto del resveratrol sobre la capacidad invasiva, asociado a los efectos de disminución de ROS mediados por la mayor actividad de SOD descrita en este trabajo.

Además existe evidencia de que la actividad de Heparanasa está involucrada en procesos fisiológicos de neovascularización, inflamación, migración leucocitaria, entre otras [79], lo que convierte esta enzima en un blanco interesante de estudio. Recientemente se logró generar un ratón knock-out a Heparanasa el cual resultó fenotípicamente sano, con vida de acuerdo al promedio y fértil. Al comunicar estos resultados los autores proponen, basados en el hallazgo del aumento de niveles de MMPs (especialmente MMP-2 y MMP-14) que serían estas enzimas las que compensan con su actividad la falta de Heparanasa [80].

Como ya fue mencionado, resveratrol es capaz de disminuir la capacidad invasiva de la línea celular AGS junto con disminuir la actividad de Heparanasa. Es necesario proseguir con nuevos estudios que puedan complementar este hecho, incluir nuevas líneas celulares de cáncer gástrico y aclarar como en la línea celular AGS el efecto del resveratrol también disminuiría actividad y/o niveles de MMPs. A su vez, los nuevos estudios debieran enfocarse a investigar como el resveratrol logra la disminución de la

capacidad invasiva de MKN45, sin un efecto aparente sobre Heparanasa, siendo la principal hipótesis el efecto sobre MMPs.

En la actualidad existen decenas de ensayos clínicos en curso (clinicaltrials.gov), tanto para uso como quimiopreventivo como adyuvante quimioterapéutico, que buscan trasladar a la medicina humana los hallazgos favorables antineoplásicos a nivel preclínico del resveratrol. Las concentraciones utilizadas *in vitro* en este estudio superan entre 2 a 100 veces la máxima concentración plasmática de resveratrol en humanos luego de una ingesta oral de 360 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (concentración límite por debajo de la cual no existe efecto adverso gastrointestinal) y en más de un estudio hay discordancia con los efectos, ya que a nivel de modelo animal se obtienen resultados de prevención y reducción de tamaño tumoral a dosis que están lejos de alcanzar lo que fue probado *in vitro* [57]. A la fecha no hay mayores datos en humanos respecto a la farmacocinética del resveratrol, situación que, basado en datos de acumulación en tejidos o la generación de metabolitos secundarios activos, podría explicar estas discordancias.

Esperamos que los hallazgos de este y futuros estudios preclínicos en cáncer gástrico sean contrastados y sirvan de complemento de los resultados que arrojen los ensayos clínicos, para así obtener el máximo provecho de esta prometedora molécula.

Conclusiones

- El resveratrol reduce la viabilidad, de una manera dependiente de la dosis y del tiempo, en las líneas celulares de cáncer gástrico AGS y MKN45.
- El resveratrol disminuye la capacidad invasiva de las líneas celulares de cáncer gástrico AGS y MKN45.
- El resveratrol aumenta la actividad de SOD en las líneas celulares de cáncer gástrico AGS y MKN45.
- El resveratrol disminuye la activación de NF-kB en las líneas celulares de cáncer gástrico AGS y MKN45.
- El resveratrol disminuye la actividad de Heparanasa en la línea celular de cáncer gástrico AGS.

Bibliografía

1. Minsal, *Guía Clínica Cáncer Gástrico MINSAL Chile*. 2006.
2. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
3. Csendes, A., et al., [*Clinical course characteristics of gastric cancer 1958-1990*]. Rev Med Chil, 1992. **120**(1): p. 36-42.
4. Lauren, P., *The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification*. Acta Pathol Microbiol Scand, 1965. **64**: p. 31-49.
5. Nagini, S., *Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention*. World J Gastrointest Oncol, 2012. **4**(7): p. 156-69.
6. Houghton, J. and T.C. Wang, *Helicobacter pylori and gastric cancer: a new paradigm for inflammation-associated epithelial cancers*. Gastroenterology, 2005. **128**(6): p. 1567-78.
7. Tapia Oscar, R.J.C., et al. *Cáncer gástrico en una región de Chile: Comparación de variables clínicas y morfológicas en dos períodos (1986-1995 y 1996-2005)*. Rev Chilena de Cirugía, 2010. **62**(2): p. 125-130.
8. Chile, I.n.d.e.d. *Estadísticas demográficas y vitales*. Available from: <http://www.ine.cl>.
9. Sano, T. and A. Hollowood, *Early gastric cancer: diagnosis and less invasive treatments*. Scand J Surg, 2006. **95**(4): p. 249-55.
10. Huang, B., et al., *Long-term survival results and prognostic factors of early gastric cancer*. Exp Ther Med, 2011. **2**(6): p. 1059-1064.
11. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
12. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
13. Liotta, L.A. and W.G. Stetler-Stevenson, *Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation*. Cancer Res, 1991. **51**(18 Suppl): p. 5054s-5059s.
14. Bellon, G., et al., *Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis*. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **49**(3): p. 203-20.
15. Minard, M.E., et al., *The role of the guanine nucleotide exchange factor Tiam1 in cellular migration, invasion, adhesion and tumor progression*. Breast Cancer Res Treat, 2004. **84**(1): p. 21-32.

16. Valachovicova, T., et al., *Soy isoflavones suppress invasiveness of breast cancer cells by the inhibition of NF-kappaB/AP-1-dependent and -independent pathways*. Int J Oncol, 2004. **25**(5): p. 1389-95.
17. Zheng, L., et al., *Small RNA interference-mediated gene silencing of heparanase abolishes the invasion, metastasis and angiogenesis of gastric cancer cells*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 33.
18. Hwang, E.S. and H.J. Lee, *Allyl isothiocyanate and its N-acetylcysteine conjugate suppress metastasis via inhibition of invasion, migration, and matrix metalloproteinase-2/-9 activities in SK-Hep 1 human hepatoma cells*. Exp Biol Med (Maywood), 2006. **231**(4): p. 421-30.
19. Brooks-Wilson, A.R., et al., *Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria*. J Med Genet, 2004. **41**(7): p. 508-17.
20. Zhang, L., et al., *Correlative studies on uPA mRNA and uPAR mRNA expression with vascular endothelial growth factor, microvessel density, progression and survival time of patients with gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(25): p. 3970-6.
21. Folgueras, A.R., et al., *Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(5-6): p. 411-24.
22. Gencer, S., et al., *Silencing of the MMP-3 gene by siRNA transfection in gastric cancer AGS cells*. J Gastrointestin Liver Dis, 2011. **20**(1): p. 19-26.
23. Han, H., et al., *CADPE inhibits PMA-stimulated gastric carcinoma cell invasion and matrix metalloproteinase-9 expression by FAK/MEK/ERK-mediated AP-1 activation*. Mol Cancer Res, 2010. **8**(11): p. 1477-88.
24. Ko, H.S., et al., *Piceatannol suppresses breast cancer cell invasion through the inhibition of MMP-9: involvement of PI3K/AKT and NF-kappaB pathways*. J Agric Food Chem, 2012. **60**(16): p. 4083-9.
25. Peng, C.W., et al., *Co-evolution of cancer microenvironment reveals distinctive patterns of gastric cancer invasion: laboratory evidence and clinical significance*. J Transl Med, 2010. **8**: p. 101.
26. McKenzie, E.A., *Heparanase: a target for drug discovery in cancer and inflammation*. Br J Pharmacol, 2007. **151**(1): p. 1-14.
27. Tang, W., et al., *Heparanase: a key enzyme in invasion and metastasis of gastric carcinoma*. Mod Pathol, 2002. **15**(6): p. 593-8.
28. Levy-Adam, F. et al., *Tumorigenic and adhesive properties of heparanase*. Semin Cancer Biol, 2010. **20**(3): p. 153-60.
29. Fux, L., et al., *Heparanase: busy at the cell surface*. Trends Biochem Sci, 2009. **34**(10): p. 511-9.

30. Wang, Z., et al., *Positive association of heparanase expression with tumor invasion and lymphatic metastasis in gastric carcinoma*. Mod Pathol, 2005. **18**(2): p. 205-11.
31. Zheng, L.D., et al., *Stable knockdown of heparanase expression in gastric cancer cells in vitro*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(43): p. 5442-8.
32. Tochwawng, L., et al., *Redox regulation of cancer cell migration and invasion*. Mitochondrion, 2013. **13**(3): p. 246-53.
33. Tudek, B., et al., *Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging*. Am J Transl Res, 2010. **2**(3): p. 254-84.
34. Castro, L. and B.A. Freeman, *Reactive oxygen species in human health and disease*. Nutrition, 2001. **17**(2): p. 161, 163-5.
35. Ziech, D., et al., *Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis*. Mutat Res, 2011. **711**(1-2): p. 167-73.
36. van den Hoven, M.J., et al., *Regulation of glomerular heparanase expression by aldosterone, angiotensin II and reactive oxygen species*. Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(9): p. 2637-45.
37. Rao, G., et al., *Reactive oxygen species mediate high glucose-induced heparanase-1 production and heparan sulphate proteoglycan degradation in human and rat endothelial cells: a potential role in the pathogenesis of atherosclerosis*. Diabetologia, 2011. **54**(6): p. 1527-38.
38. Raats, C.J., et al., *Hydroxyl radicals depolymerize glomerular heparan sulfate in vitro and in experimental nephrotic syndrome*. J Biol Chem, 1997. **272**(42): p. 26734-41.
39. Raats, C.J., et al., *Glomerular heparan sulfate alterations: mechanisms and relevance for proteinuria*. Kidney Int, 2000. **57**(2): p. 385-400.
40. McCord, J.M., *The evolution of free radicals and oxidative stress*. Am J Med, 2000. **108**(8): p. 652-9.
41. Teoh, M.L., et al., *Overexpression of extracellular superoxide dismutase attenuates heparanase expression and inhibits breast carcinoma cell growth and invasion*. Cancer Res, 2009. **69**(15): p. 6355-63.
42. Andela, V.B., et al., *Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor kappaB*. Cancer Res, 2000. **60**(23): p. 6557-62.
43. Cao, H.J., et al., *Tumor metastasis and the reciprocal regulation of heparanase gene expression by nuclear factor kappa B in human gastric carcinoma tissue*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(6): p. 903-7.
44. Garg, A. and B.B. Aggarwal, *Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development*. Leukemia, 2002. **16**(6): p. 1053-68.
45. Gilmore, T.D., *The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6842-4.

46. Van Waes, C., *Nuclear factor-kappaB in development, prevention, and therapy of cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(4): p. 1076-82.
47. Toyoda, T., et al., *Anti-inflammatory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a nuclear factor-kappaB inhibitor, on Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils*. Int J Cancer, 2009. **125**(8): p. 1786-95.
48. Pozo, M., et al., *Gliotoxin inhibits neointimal hyperplasia after vascular injury in rats*. J Vasc Res, 2009. **46**(4): p. 278-89.
49. Morgan, M.J. and Z.G. Liu, *Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling*. Cell Res, 2011. **21**(1): p. 103-15.
50. Khan, N., et al., *Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies*. Cancer Lett, 2010. **293**(2): p. 133-43.
51. Weng, C.J. and G.C. Yen, *Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives*. Cancer Treat Rev, 2012. **38**(1): p. 76-87.
52. Aggarwal, B.B., et al., *Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies*. Anticancer Res, 2004. **24**(5A): p. 2783-840.
53. Kopp, P., *Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'?* Eur J Endocrinol, 1998. **138**(6): p. 619-20.
54. Liu, B.L., et al., *New enlightenment of French Paradox: resveratrol's potential for cancer chemoprevention and anti-cancer therapy*. Cancer Biol Ther, 2007. **6**(12): p. 1833-6.
55. Jang, M., et al., *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes*. Science, 1997. **275**(5297): p. 218-20.
56. Banerjee, S., et al., *Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-kappaB, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9*. Cancer Res, 2002. **62**(17): p. 4945-54.
57. Gescher, A.J. and W.P. Steward, *Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003. **12**(10): p. 953-7.
58. Sun, C., et al., *Resveratrol downregulates the constitutive activation of nuclear factor-kappaB in multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and invasion, arrest of cell cycle, and induction of apoptosis*. Cancer Genet Cytogenet, 2006. **165**(1): p. 9-19.
59. Aggarwal, B.B., *Nuclear factor-kappaB: the enemy within*. Cancer Cell, 2004. **6**(3): p. 203-8.
60. Gescher, A., et al., *Resveratrol in the management of human cancer: how strong is the clinical evidence?* Ann N Y Acad Sci, 2013. **1290**: p. 12-20.

61. Vang, O., et al., *What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e19881.
62. Spanier, G., et al., *Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4)*. J Physiol Pharmacol, 2009. **60 Suppl 4**: p. 111-6.
63. Xia, N., et al., *Resveratrol reverses endothelial nitric-oxide synthase uncoupling in apolipoprotein E knockout mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **335**(1): p. 149-54.
64. Holmes-McNary, et al., *Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I κ B kinase*. Cancer Res, 2000. **60**(13): p. 3477-83.
65. Manna, S.K., et al., *Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- κ B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6509-19.
66. Russo, M., et al., *Phytochemicals in cancer prevention and therapy: truth or dare?* Toxins (Basel), 2010. **2**(4): p. 517-51.
67. Liu, R.H., *Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals*. Am J Clin Nutr, 2003. **78**(3 Suppl): p. 517S-520S.
68. Liu, R.H., *Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action*. J Nutr, 2004. **134**(12 Suppl): p. 3479S-3485S.
69. Garodia, P., et al., *From ancient medicine to modern medicine: ayurvedic concepts of health and their role in inflammation and cancer*. J Soc Integr Oncol, 2007. **5**(1): p. 25-37.
70. Cragg, G.M. and D.J. Newman, *Natural products: a continuing source of novel drug leads*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(6): p. 3670-95.
71. Agarwal, C., et al., *Anticarcinogenic effect of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in human prostate carcinoma DU145 cells: modulation of mitogenic signaling and cell-cycle regulators and induction of G1 arrest and apoptosis*. Mol Carcinog, 2000. **28**(3): p. 129-38.
72. Francy-Guilford, J. and J.M. Pezzuto, *Mechanisms of cancer chemopreventive agents: a perspective*. Planta Med, 2008. **74**(13): p. 1644-50.
73. Rigolio, R., et al., *Resveratrol interference with the cell cycle protects human neuroblastoma SH-SY5Y cell from paclitaxel-induced apoptosis*. Neurochem Int, 2005. **46**(3): p. 205-11.
74. Roemer, K. and M. Mahyar-Roemer, *The basis for the chemopreventive action of resveratrol*. Drugs Today (Barc), 2002. **38**(8): p. 571-80.
75. Riles, W.L., et al., *Resveratrol engages selective apoptotic signals in gastric adenocarcinoma cells*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(35): p. 5628-34.

76. Boyd, D., *Invasion and metastasis*. *Cancer Metastasis Rev*, 1996. **15**(1): p. 77-89.
77. ATCC. *Biological resources, Cell lines characteristics* 2014 [cited 2014].
78. Liu, P.L., et al., *Resveratrol inhibits human lung adenocarcinoma cell metastasis by suppressing heme oxygenase 1-mediated nuclear factor-kappaB pathway and subsequently downregulating expression of matrix metalloproteinases*. *Mol Nutr Food Res*, 2010. **54 Suppl 2**: p. S196-204.
79. Nasser, N.J., *Heparanase involvement in physiology and disease*. *Cell Mol Life Sci*, 2008. **65**(11): p. 1706-15.
80. Zcharia, E., et al., *Newly generated heparanase knock-out mice unravel co-regulation of heparanase and matrix metalloproteinases*. *PLoS One*, 2009. **4**(4): p. e5181.