

## Efecto inhibidor del agua reducida electrolizada sobre la angiogénesis tumoral

Jun YE,<sup>a,b</sup> Sí , LI,<sup>a</sup> a, c Takeki HAMASAKI,<sup>a</sup> d Noboru NAKAMICHI, y Takaaki KOMATSU,<sup>d</sup> Taichi KASHIWAGI,<sup>d</sup> Kiichiro TERUYA,<sup>a</sup> Ryuhei NISHIKAWA,<sup>d</sup> Takeshi Kawahara,<sup>d</sup> kazuhiro osada,<sup>d</sup> kazuko toh,<sup>d</sup> masumi abe,<sup>d</sup> Huaizé TIAN,<sup>d</sup> Shigeru KABAYAMA,<sup>de</sup> Kazumichi OTSUBO,<sup>F</sup> Shinkatsu MORISAWA<sup>de</sup> Yoshinori KATAKURA,<sup>a,d</sup> a,d y Sanetaka SHIRAHATA\*,a,d

una Escuela de Posgrado en Ciencias de la Vida de Sistemas, Universidad de Kyushu; Departamento de Tecnología de Recursos Genéticos, Facultad de Agricultura, Universidad de Kyushu; 6–10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812–8581, Japón: bKey Laboratory of the Ministerio de Educación para Biología Celular e Ingeniería de Células Tumorales, Escuela de Ciencias de la Vida, Universidad de Xiamen; fujian, 361005 PR China: c Escuela de Ciencias de la Vida, Universidad de Ciencia y Tecnología de Nanchang; Nanchang 330006, PR China: e Functional Water Cell Analysis Center Co., Ltd.; Fukuoka 812–0053, Japón: f Nihon Trim Co., Ltd.; 1–8–34 Oyodonaka, Kita-ku, Osaka 531–0076, Japón.

Recibido el 9 de junio de 2007; aceptado el 16 de octubre de 2007; publicado en línea el 17 de octubre de 2007

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un mediador clave de la angiogénesis tumoral. Las células tumorales están expuestas a un mayor estrés oxidativo en comparación con las células normales. Numerosos informes han demostrado que el estado redox intracelular (oxidación/ reducción) está estrechamente relacionado con el patrón de expresión de VEGF. electrolizado agua reducida (ERW) producida cerca del cátodo durante la electrólisis del agua intracelular barrida H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y disminuyó la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de una línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano, A549, y reguló a la baja ambos Transcripción de VEGF y secreción de proteínas de manera dependiente del tiempo. Para investigar la transducción de señales. vía involucrada en la regulación de la expresión de VEGF, inhibidores específicos de la quinasa activada por mitógeno (MAPK), Se aplicaron SB203580 (inhibidor de p38 MAPK), PD98059 (inhibidor de ERK1/2) y JNKi (inhibidor de proteína quinasa N-terminal c-Jun). Los resultados mostraron que solo PD98059 bloquea la expresión de VEGF, lo que sugiere una importante papel de ERK1/2 en la regulación de la expresión de VEGF en células A549. Además, ERW inhibió la activación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) de manera dependiente del tiempo. Experimentos de cocultivo para analizar *in vitro* el ensayo de formación de túbulos reveló que el medio acondicionado derivado de células A549 estimuló significativamente la formación de túbulos vasculares en todos los parámetros analizados: área total de túbulos, unión de túbulos, número de túbulos y longitud total de los túbulos. ERW contrarrestó el efecto del medio acondicionado con células A549 y disminuyó el tubo total longitud (p0.01). El presente estudio demostró que ERW regulaba negativamente la transcripción del gen VEGF y la secreción de proteínas a través de la inactivación de ERK.

Palabras clave agua reducida electrolizada; angiogénesis; estrés oxidativo; factor de crecimiento vascular endotelial; quinasa regulada por señal extracelular; Medio acondicionado con células A549

La angiogénesis tumoral, la formación de nuevos capilares sanguíneos por células endoteliales vasculares de vasos existentes, es un mecanismo importante para el suministro de nutrientes, oxígeno, factores de crecimiento y otros a las células tumorales. Las células tumorales desencadenan angiogénesis mediante la secreción de factores angiogénicos, especialmente el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A),<sup>1</sup> que juega un papel importante en la regulación de la angiogénesis normal y anormal.<sup>2</sup>

VEGF-A (comúnmente conocido como VEGF) se informó por primera vez como un factor inductor de la permeabilidad vascular secretado por el tumor células, y se conoce como factor de permeabilidad vascular (VPF).<sup>3</sup> La expresión del gen VEGF es iniciada por señales extracelulares que incluyen factores de crecimiento, mitógenos, éster de forbol, citoquinas y tensiones extracelulares. Los primeros tres de estos exógenos señales activan la vía Ras-Raf-MEK-ERK que transduce señales mitogénicas que regulan la proliferación o diferenciación celular. Las otras señales extracelulares activan el JNK/SAPK y vías p38 que regulan las respuestas celulares inflamatorias o de estrés.<sup>4</sup> VEGF se sobreexpresa en ambos Niveles de mRNA y proteínas en un alto porcentaje de malignos tumores animales y humanos, así como en muchos inmortalizados y líneas celulares transformadas.<sup>5-7</sup> El transcripto del gen VEGF-A se somete a empalmes alternativos para producir isoformas maduras de 121, 165, 189 y 206 aminoácidos, apareciendo VEGF165 predominante cuantitativa y funcionalmente en la mayoría de los estados angiogénicos.<sup>8</sup> VEGF121 y VEGF165 se secretan como solu-

compuestos bles, mientras que VEGF189 y VEGF206 siguen siendo células asociados a la superficie o se depositan principalmente en la matriz extracelular.<sup>9</sup>

Se sugiere que las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel importante en la angiogénesis.<sup>10</sup> Además, existe una creciente evidencia de la participación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la regulación de la angiogénesis.<sup>9,11-13</sup> Además, una variedad de líneas celulares derivados de tumores humanos se ha demostrado que producen grandes cantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>14</sup> Vigilancia constitutiva para celular la protección contra el estrés oxidativo la confieren los agentes antioxidantes intracelulares.<sup>15</sup> Las cantidades excesivas de ROS son tóxicas y causar una reducción de los niveles de antioxidantes intracelulares.<sup>16</sup> Se ha informado que el pretratamiento del corazón con antioxidantes exógenos mejoró su condición como resultado de la reducción de la producción de ROS.<sup>17</sup> El gen VEGF-A es uno que tiene su expresión regulada por ROS, especialmente por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Adicional Los datos respaldan que el ARNm de VEGF-A está regulado positivamente por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una forma dependiente de la dosis y el tiempo.<sup>18,19</sup> En conjunto, estos sugieren que algunos agentes antioxidantes endógenos así como exógenos pueden usarse para regular la expresión del gen VEGF-A y/o la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con fines terapéuticos.

El agua reducida electrolizada (ERW) ha atraído mucha atención debido a su potencial antioxidante. La electrólisis del agua produce típicamente dos formas de agua: agua reducida o alcalina (pH alto) cerca del cátodo y agua oxidata o ácida. (pH bajo) cerca del ánodo. Aplicaciones de oxidado

agua han sido reportados con frecuencia.<sup>20-22</sup> En Japón, ERW producido a partir de agua del grifo por purificadores electrolizadores de uso doméstico es popular ya que se cree que tiene beneficios para la salud. REG tiene ha demostrado ser clínicamente eficaz en el tratamiento de pacientes con síndrome del intestino irritable o dispesia no ulcerosa.<sup>23</sup> Shirahata et al. demostró por primera vez que los REG no sólo exhibió un pH alto, oxígeno disuelto bajo, hidrógeno molecular disuelto extremadamente alto, pero lo más importante, mostró actividad de eliminación de ROS y efectos protectores contra el daño oxidativo al ADN.<sup>24</sup> A partir de entonces, los efectos inhibidores de ERW sobre el daño celular pancreático inducido por aloxano<sup>25</sup> y sobre estrés oxidativo inducido por hemodiálisis en pacientes con enfermedad renal en etapa terminal (ESRD, por sus siglas en inglés)<sup>26,27</sup> . Kim y Kim informaron que los REG derivados del agua del grifo exhibieron un efecto antidiabético tipo 2 en experimentos con animales.<sup>28</sup>

Aunque los datos acumulados hasta el momento sugieren que los REG podría ser un agente antioxidante útil, se requieren más estudios para dilucidar los mecanismos de sus acciones en las células. A este fin, planteamos la hipótesis de que ERW podría regular VEGF-A expresión génica para ejercer efectos antiangiogénicos a través de la eliminación de ROS, en particular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Llevamos a cabo una serie de experimentos como primer paso para descubrir los mecanismos involucrados.

Aquí presentamos evidencia de que ERW atenúa tanto la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como la secreción de VEGF. Esto lleva entonces a la supresión de la angiogénesis inducida por células tumorales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación de Agua Reducida Electrolizada (ERW)

ERW (potencial de reducción de oxidación, 600 mV; pH 11) fue preparado electrolizando agua ultra pura que contiene 0,002 M NaOH a 100 V durante 60 min utilizando un dispositivo electrolizador equipado con electrodos de titanio recubiertos de platino (TI-200s, Nihon Trim Co., Osaka, Japón), y normalmente contiene 0,2 ppb Pt Nps cuando se analiza con un espectrómetro ICP-MS (datos no publicados). Se utilizó un dispositivo electrolizador de tipo discontinuo. Consistía en un recipiente de 4 l (190 mm de largo 210 mm de ancho 140 mm de altura) dividida por una membrana semipermeable (190 mm de ancho 130 mm de alto, 0,22 mm de espesor, poro el tamaño no se revela, Yuasa Membrane System Co., Osaka Japón). Se colocaron dos electrodos (70 mm de ancho y 110 mm de largo), colocado a una distancia de 55 mm de cada lado de la membrana semipermeable.

Cultivo celular y reactivos Todos alcalinos electrolizados ERW fue neutralizado agregando 1 ml de 10 mínimo Medio de Eagle (MEM) (pH 7) y 0,2 ml de tampón de ácido 4-(2-hidroxietil)pirexazina-1-etanosulfónico (HEPES) 1 M (pH 5,3) a 9 ml de ERW (pH 11) antes de su uso. pulmón humano adenocarcinoma, células A549 y embriones diploides humanos fibroblastos pulmonares, las células TIG-1 se obtuvieron de Health Banco de Recursos de Investigación Científica y mantenido en el MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) designado como 10% FBS/MEM (Biowest, Francia). Durante los experimentos, se cultivaron células A549 con MEM (sin FBS) preparado por dilución de 10 MEM con agua Milli Q que designado como MEM/Milli Q libre de suero o cultivado con MEM (sin FBS) preparado por dilución de 10 MEM con ERW que se designó como MEM/ERW sin suero. En un experimento preliminar realizado en el pasado, habíamos comparado dos Medios MEM preparados con solución acuosa de NaOH 0,002 M o con agua Milli Q para examinar si los medios MEM

con la adición de NaOH podría eliminar las ROS intracelulares o no, y tal efecto no se observó. Además, estos MEM se aplicaron medios a células de fibrosarcoma humano HT1080 y midió las expresiones génicas de la metaloproteína de matriz (MMP). No observamos ninguna diferencia en los niveles de Expresión de MMP entre células HT1080 cultivadas con el dos medios del MEM (observación no publicada). Juntos con estas observaciones y el conocimiento de que tanto MMP como VEGF son genes sensibles a redox, juzgamos que una adición de NaOH en medios de cultivo no tiene ningún efecto sobre intracelular estado redox y expresión de genes relacionados. Por lo tanto, utilizamos Medios MEM preparados con agua Milli Q como control en experimentos posteriores.

Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) fueron adquirido de Cambrex y cultivado en medio EGM-2 (Cambrex, MD, EE. UU.). Ácido homovanilílico (HVA) y peroxidasa de rábano picante tipo VI se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE. UU.). SB203580, PD98059 y el inhibidor de las proteínas quinasas c-Jun N-terminal (JNK) fueron adquirido de Calbiochem (CA, EE. UU.). el quantikine kit (inmunoensayo de VEGF humano, número de catálogo DVE00) se obtuvo de R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, EE.UU.). El kit de inmunoensayo Quantikine VEGF está diseñado para medir los niveles de VEGF165 en sobrenadantes de cultivos celulares. Se obtuvo un kit de tinción de túbulos de angiogénesis (para teñir CD31) de TCS Cellworks (Buckingham, Reino Unido). totales y El anticuerpo fosfo-ERK proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) se adquirió de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE. UU.). Diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) se adquirió de Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregón, EE. UU.).

Medición de la actividad de eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular por ERW H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido en células A549. utilizando DCFH-DA. Las células A549 se pretrataron con MEM/ERW sin suero durante 30 min y luego se incubaron con 5 DCFH-DA durante 30 min a 37 °C. DCFH-DA difundido libremente en células y luego fue hidrolizado por esterasas celulares para DCFH, que quedó atrapado dentro de la celda. Esta molécula no fluorescente luego se oxidó a diclorofluoresceína fluorescente (DCF) por la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular. Las células eran se lavó con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) para eliminar el DCFH-DA. Los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se midieron usando flujo citometría (EPICS XL System II; Beckman Coulter, EE. UU.) determinando la intensidad de la fluorescencia relativa a el de las células de control.

Medición de liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de Las células A549 en el medio de cultivo se analizaron mediante un método publicado.<sup>29</sup> Brevemente, las células A549 se cultivaron en un 24-placa de pocillos con MEM/Milli Q sin suero o sin suero MEM/ERW por 24 h. Las células se lavaron con PBS y luego se incuba con 800 l de tampón de reacción (100 M HVA, 5 unidades/ml de peroxidasa de rábano picante tipo VI y HEPES 1 mM en solución salina equilibrada de Hanks sin rojo fenol, pH 7,4). El tampón de reacción sin células se trató de la misma manera, como un control. Luego, esta solución se recogió después de la incubación durante 30 min, el pH se ajustó a 10,0 con 0,1 M tampón de glicina-NaOH y luego se midió la fluorescencia utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia (F-2500, Hitachi, Japón) a longitudes de onda de excitación y emisión de 321 nm y 421 nm, respectivamente.

Polimerasa de transcripción inversa semicuantitativa

enero de 2008

21

Reacción en cadena (RT-PCR) El ARN total se aisló utilizando un kit de aislamiento de ARN total de mamíferos GenEluteTM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.) y siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor. Las secuencias de cebadores para glicereraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) son 5ACCACAGTCCATGCCATCAC3 (adelante) y 5TC CACCACCTGTTGCTGTA-3 (reversa), que amplifican un Segmento de 512 pb (NCBI Acc#: NM 002046). Lo común Las secuencias de los cebadores para los transcritos de VEGF son 5GGGCCTCC GAAACCATGAAAC3 (directo) y 5CTGGTCCCCGA AACCCCTGAG3 (inverso), que se diferencian alternativamente transcritos de VEGF165 y VEGF121 empalmados generando fragmentos de 625 pb y 495 pb, respectivamente.8,30) PCR amplificó VEGF se llevó a cabo a 94 °C durante 45 s de desnaturalización, hibridación durante 45 s a 60 °C y extensión durante 1 min a 60 °C. 72 °C durante 35 ciclos usando polimerasa Taq (Takara). Asimismo, La amplificación por PCR para GAPDH se llevó a cabo a 94 °C para 3.5 min de desnaturalización, recocido por 30 s a 58 °C y extensión por 1 min a 72 °C por 30 ciclos. El semicuantitativo Los productos de RT-PCR no se saturaron en las condiciones utilizadas en los presentes experimentos. Los productos amplificados se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa y luego se fotografiaron. con una cámara digital (ATTO, Tokio). para densitométrica análisis, las imágenes grabadas fueron analizadas por una imagen NIH programa analizador (Imagen 1.62f) usando una computadora personal. Los valores por debajo del panel se normalizaron estableciendo arbitrariamente la densidad de las bandas VEGF165 y VEGF121 de no tratados Celdas A549 a 1.0. Se utilizaron transcritos de GAPDH como control interno de la actividad celular.

Medición de VEGF secretado en el cultivo Se sembraron células A549 medianas (5104 células/pozo) en 24- placas de pocillos con FBS/MEM al 10 % y se cultivaron durante la noche. El el medio se reemplazó con MEM/ERW sin suero y se incubó durante otras 24 h. El medio acondicionado se recogió para medir el VEGF secretado, que se midió según el protocolo del fabricante.

Preparación de medio acondicionado y ensayo de formación de túbulos Se sembraron células A549 (1106 células) en un Plato de 90 mm con FBS/MEM al 10% e incubado durante la noche. El medio se reemplazó con MEM/Milli Q sin suero o MEM/ERW libre de suero y cultivado durante 24 h. El medio acondicionado se recogió y se filtró con un filtro de 0,2 m. Las alícuotas se almacenaron en un congelador a 80 °C. El ensayo de formación de túbulos se realizó con un sistema de cocultivo. HUVEC se mezclaron con células TIG-1 a 1: 40, sembradas en 24- placas de pocillos y se cultivaron en medio EGM-2 durante la noche. El Se eliminó el medio y se añadió una mezcla de medios acondicionados de células A549 y EGM-2 mezclados en proporción 2:1. El medio acondicionado se cambió cada 2 d. Túbulos formados con diferentes medios fueron detectados con HUVEC-específico marcadores CD31 (PECAM-1). Brevemente, en el día 11, el medio se eliminó por completo y se fijó la placa de cocultivo durante 30 min con solución de etanol al 70%. Después de la incubación con PBS que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 1 %, la placa de cocultivo se incubó con un CD31 antihumano de ratón. anticuerpo (1: 4000) durante 60 min, seguido de otros 60 min incubación con un anticuerpo IgG anti-ratón de cabra secundario conjugado con fosfatasa alcalina (ambos anticuerpos fueron incluido en el kit de tinción de túbulos). Después de lavar la placa de cultivo, 5-bromo-4-cloro-3-indolifosfato toluidina sustrato de sal/cloruro de nitró-azul de tetrazolio (BCIP/NBT)

se añadió hasta que los túbulos adquirieron un color púrpura oscuro. A continuación, los cultivos de Co se secaron y analizaron. Formaciones de túbulos en el sistema de co-cultivo se observaron por microscopía de contraste de fase y las fotomicrografías se documentaron con un cámara digital (Olympus, Japón). Las imágenes grabadas fueron analizadas por el software de análisis de imágenes Angiogenesis (AngioSys 1.0, TCS, Cellworks, Reino Unido). Doce campos aleatorios por pocillo fueron fotografiados para la evaluación de la formación de túbulos.

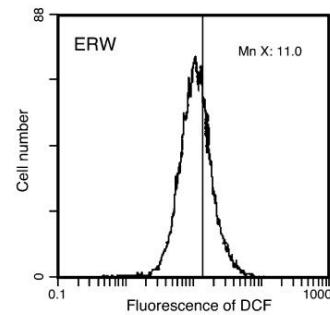
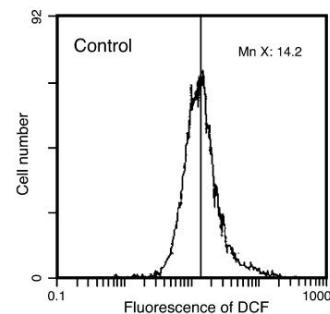
Análisis de Western Blot Las células tratadas adecuadamente se lavado con PBS e incubado con tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM , PMSF 1 mM , 1 % NP-40, SDS al 0,1 %, aprotinina 10 g/ml y EDTA 10 mM ) en hielo. Las células se recogieron con un raspador. El lisado fue entonces centrifugado a 12000g por 5 min. Treinta microgramos de muestras de proteína se hirvieron en una proporción de 3:1 con tampón de muestra ( Tris-HCl 250 mM pH 6,8, glicerol al 40 %, totoetanol -mercaptoal 20 %, SDS al 8 % y azul de bromofenol al 0,04 %) y electroforesis en SDS-PAGE . Las proteínas resueltas fueron entonces transfirieron a membranas Hybond-ECL (Amersham Bio Science, Reino Unido), que se bloquearon con Tween 20 al 0,05 %. PBS (T-PBS) que contiene un 10 % de leche desnatada en polvo (Wako, Osaka, Japón) y probado con anticuerpos primarios y secundarios acoplados con peroxidasa. Después de lavar tres veces con T-PBS, el anticuerpo unido se desarrolló utilizando un ECL más sistema de detección de transferencia Western (Amersham Biociencias, Reino Unido).

## RESULTADOS

ERW elimina el H2O2 intracelular y disminuye la Liberación de H2O2 de las células A549 Se ha informado que las células cancerosas producen grandes cantidades de ROS, incluyendo H2O2, 14) y que las ROS exógenas estimulan la inducción de VEGF en varios tipos de células.18,31) Se ha demostrado que ERW elimina eficazmente las ROS intracelulares en células HIT-T15 (una línea celular pancreática de hámster).25) Estos datos juntos sugieren que ERW podría regular la expresión de VEGF a través de ROS. Para probar esta idea y determinar si la actividad de eliminación de ROS de ERW es aplicable a otros tipos de células, comenzamos examinando el efecto de eliminación de ERW en células A549. A549 las células se trataron con MEM que contenía ERW y luego se incubaron con DCFH-DA. Los niveles de H2O2 intracelular se midieron mediante citometría de flujo determinando la intensidad de la fluorescencia relativa a la de las células de control, como se detalla en el Materiales y métodos. Los resultados mostraron una reducción del H2O2 intracelular, ya que la curva de señal obtenida de las células A549 tratadas con ERW (designadas como "ERW") se desplazó a la izquierda en comparación con las células A549 no tratadas (designadas como "Control") (Fig. 1A). Este cambio de la curva de la señal indicaría la eliminación de H2O2. Por lo tanto, se sugirió a ERW que eliminar el H2O2 intracelular en las células A549. Para probar el ROS actividad de depuración de ERW, examinamos el efecto de ERW sobre la liberación de H2O2 de las células A549. Nuestro método de prueba fue basado en la conversión del ácido homovanílico, un sustituto fenol, a su dímero fluorescente en presencia de H2O2 y peroxidasa de rábano picante. Como se muestra en la Fig. 1B, cuando A549 las células fueron pretratadas con ERW durante 24 h, la liberación de H2O2 de células A549 disminuyó a aproximadamente 40% en comparación al control no tratado (p<0,05). Así, los resultados confirmaron un informe anterior.25)

Los presentes resultados de dos ensayos diferentes capaces de

A



B

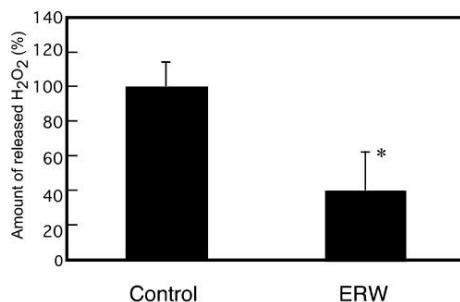


Fig. 1. Actividad de eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular de ERW (A) y supresión de la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las células A549 por ERW (B)

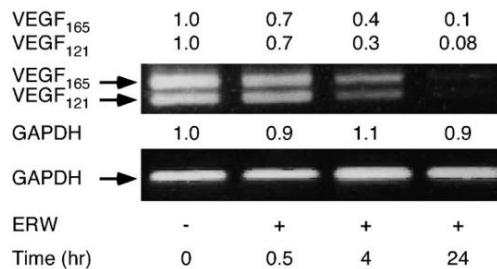
(A) Las células A549 cultivadas se pretrataron durante 30 min con FBS al 10 %/MEM/ERW, luego se incubaron con DCFH-DA 5 M durante 30 min a 37 °C. La intensidad de fluorescencia de DCFH se midió con un cítmetro de flujo. La intensidad de fluorescencia relativa a esa de las células de control se presenta como curvas. La curva designada como "Control" es la intensidad de fluorescencia obtenida de las células A549 de control. La curva designada como "ERW" es la intensidad de fluorescencia obtenida de las células A549 tratadas con ERW. Eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la actividad se consideró positiva, ya que la curva de tratamiento de ERW (ERW) se desplazó hacia la izquierda en comparación con la curva de control (Control). Mn X en los REG y paneles de control significa la media de la intensidad de fluorescencia. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes. (B) Se añadió ERW a las células A549 en cultivo, seguido de una incubación adicional de 24 h. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberado en los medios de cultivo se midió como se describe en Materiales y métodos. Las diferencias se analizaron mediante la prueba t de Student (los valores son los media D.E., n3). Un asterisco representa una diferencia significativa en comparación con los controles (p<0.05) y los valores de p de 0,05 se consideran estadísticamente significativos.

medir claramente los niveles endógenos y exógenos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> demostrado que los REG tienen el potencial de reducir y/o eliminar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

ERW inhibe tanto la expresión del gen VEGF como la secreción extracelular en las células A549 como habíamos confirmado que ERW reduce la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las células A549, investigamos usando un método RT-PCR para determinar si H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los niveles de VEGF están regulados coordinadamente por ERW en A549 células.

Los cebadores se diseñaron para amplificar un producto de 495 pb para la Transcripción de VEGF121 y un producto de 625 pb para VEGF165 transcripción. Se realizó electroforesis en gel de agarosa para des

A



B

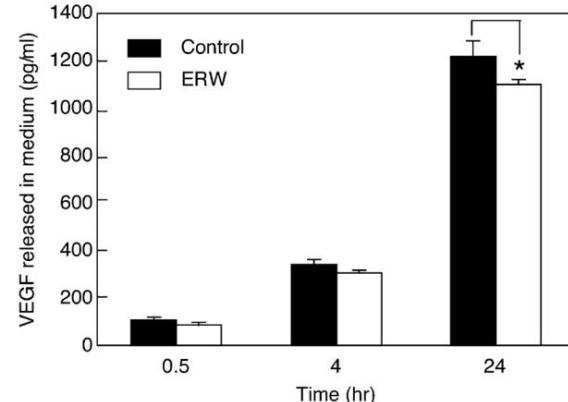


Fig. 2. ERW regula negativamente la transcripción y secreción de VEGF

(A) Se trataron cuatro conjuntos de células A549 con ERW durante 0,5, 4 y 24 h. Células A549 tratados durante períodos de tiempo designados se usaron para aislar los ARN totales. VEGF y las transcripciones de GAPDH se detectaron mediante RT-PCR con un conjunto apropiado de cebadores, como se muestra en Materiales y Métodos. Los valores por encima del panel se normalizaron arbitrariamente estableciendo la densitometría de las bandas VEGF165 y VEGF121 en el tiempo cero a 1,0. UN GAPDH La transcripción se usó como control interno para la actividad celular. (B) A549 (5105 células) las células/picillo se sembraron en placas de 24 picillos con FBS al 10 %/MEM durante 0,5, 4 y 24 h. El medio se reemplazó con MEM/ERW sin suero durante los períodos de tiempo indicados. El se recogió el medio para medir la cantidad de VEGF secretado por las células A549, como se describe en Materiales y Métodos. Columnas llenas ( ), controles cultivados en suero libre MEM/Mili Q; columnas abiertas ( ), pruebas cultivadas en MEM/ERW sin suero. Los resultados de 3 experimentos independientes fueron analizados por la prueba t de Student (los valores son los media D.E., n3). Un asterisco representa una diferencia significativa en comparación con el control (p<0.05) y los valores de p de 0,05 se consideran estadísticamente significativos.

resolver los productos de RT-PCR (Fig. 2A). Relaciones de intensidades de banda entre diferentes períodos de incubación para GAPDH y aquellos para los dos productos de isoforma de VEGF se usaron para comparar niveles de transcripción dependientes del tiempo (Fig. 2). Los resultados mostró que el tratamiento con REG regulaba a la baja las transcripciones de VEGF165 y VEGF121 de manera dependiente del tiempo. Notablemente, cuando las células se trataron con ERW durante 24 h, la transcripción de VEGF se suprimió significativamente, mientras que la de GAPDH cambiado poco; indicando que los resultados no se debieron a la efectos citotóxicos de ERW (Fig. 2A).

Se sabe que el VEGF se secreta fuera de las células tumorales para ejercer su efecto angiogénico al estimular la proliferación y migración de células endoteliales.<sup>18</sup> Por lo tanto, el efecto de ERW en se ensayó la secreción de VEGF en células A549. La secreción de VEGF de las células de control aumentó de manera dependiente del tiempo, mientras que ERW suprimió gradualmente el aumento. en la secreción de VEGF (Fig. 2B). Una diferencia significativa en las acumulaciones de VEGF secretado entre el control (1217,9461,83 pg/ml) y muestras tratadas (1095,53 pg/ml) solo se observó cuando las células A549 se

enero de 2008

23

tratados con ERW durante 24 h (p0,05, Fig. 2B). esto se retrasó respuesta de la secreción de proteína VEGF en comparación con VEGF nivel de transcripción génica, que después de 4 h de tratamiento se redujo a aproximadamente 30-40%, puede ser atribuible al punto de ensayo diferencias, es decir, la transcripción y los niveles de proteínas acumuladas porque la RT-PCR detecta transcripciones específicas directamente en puntos de tiempo específicos, mientras que el ensayo VEGF detecta el total acumulado proteína VEGF165 durante los períodos de incubación indicados.

ERW inactiva la transcripción del gen ERK1/2 VEGF se demostró que estaba regulado por REG, lo que sugiere que su punto de acción está en un nivel de transcripción de genes y/o en la señal niveles de vías de transducción río arriba de los complejos de iniciación de la transcripción. Como paso inicial, la transducción de señales vía implicada en la regulación de la expresión del gen VEGF fue investigado usando inhibidores específicos de MAPK, SB203580 (p38 inhibidor de MAPK), PD98059 (inhibidor de MEK que es una quinasa corriente arriba de la vía ERK) y JNKi (inhibidor de JNK). Para este propósito, el mismo sistema de ensayo RT-PCR y métodos de análisis, como en la Fig. 2A, se utilizaron para cuantificar Transcripciones de VEGF (Fig. 3A). Los resultados mostraron que sólo PD98059 bloqueó la expresión de VEGF, lo que sugiere un papel importante para la vía Ras-Raf-MEK-ERK, particularmente Factor ERK1/2, en la regulación de la expresión de VEGF en células A549 (Figura 3A). Otros inhibidores, SB203580 y JNKi, no muestran ningún efecto inhibitor significativo sobre la transcripción del gen VEGF, lo que indica que las vías de la proteína cinasa activada por estrés/JNK (SAPK) y p38 no estuvieron directamente involucradas en

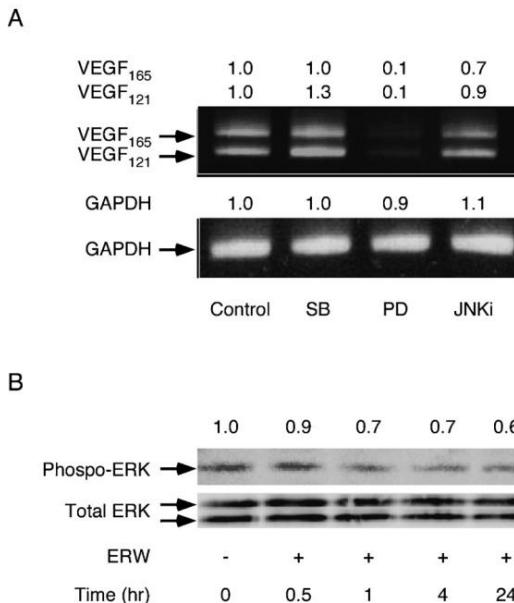


Fig. 3. La expresión de VEGF se regula a la baja a través de la inactivación de ERK

Ruta

(A) Las células A549 se trataron con MEM sin suero que contenía SB203580 (10 M), PD98059 (20 M) o inhibidor II de JNK (40 nM) durante 24 h y ARN total aislado. Total Los ARN se utilizaron para amplificar los transcritos de VEGF165 y VEGF121 mediante RT-PCR con conjuntos de cebadores respectivos. Los productos amplificados se resolvieron en una electroforesis en gel de agarosa y las bandas fueron fotografiadas y documentadas usando una cámara digital. Imágenes grabadas fueron analizados por un programa analizador de imágenes NIH (Imagen 1.62f) utilizando una computadora personal. Los valores por encima del panel se normalizaron configurando arbitrariamente la densitometría de Bandas de VEGF165 y VEGF121 en el tiempo cero a 1,0. Se usó una transcripción GAPDH como control interno de la actividad celular. Control: sin inhibidor, SB: SB203580 (p38 MAPK inhibidor), PD: PD98059 (inhibidor de MEK), JNKi: inhibidor de JNK. (B) Las células A549 fueron incubadas en MEM/ERW sin suero durante los períodos de tiempo indicados. Los lisados celulares fueron preparados y 30 g de proteínas de cada lisado se resolvieron mediante SDS-PAGE y se utilizaron para Análisis de transferencia Western como se describe en Materiales y Métodos. Total- y fosfo-ERK fueron detectados usando anticuerpos Total- y fosfo-ERK MAPK. Valores por encima de la panel se normalizaron estableciendo arbitrariamente la densitometría de la banda fosfo-ERK en 1,0. Se usó ERK total para monitorear la actividad celular.

#### Transcripción del gen VEGF.

Se realizaron más experimentos para determinar si La regulación a la baja de la expresión de VEGF inducida por ERW se debe a la supresión de la fosforilación de ERK1/2. mancha occidental Los análisis mostraron que la fosforilación de ERK disminuyó en un manera dependiente del tiempo de 0,5 a 4 h. Después de 4 h, el nivel de fosfo-ERK se mantuvo bajo hasta 24 h, incluso después del tratamiento prolongado con ERW. La cantidad total de ERK MAPK

la proteína no se vio afectada por el tratamiento con ERW (Fig. 3B). Estos Los resultados fortalecieron aún más los resultados que se muestran en la Fig. 3A. También sugirieron que MEK está involucrado en la regulación. de la transcripción de VEGF a través de la fosforilación de ERK.

Efecto de ERW en la formación de túbulos vasculares inducida por células A549 Se sabe que las ROS exógenas estimulan producción de VEGF18) y promover la morfogénesis tubular en células endoteliales.<sup>32</sup> Para evaluar el efecto de ERW en formación de túbulos, cuatro parámetros: área de túbulos, número de uniones, el número de túbulos y la longitud total del tubo, fueron Medido. Para ello, un co-cultivo de células HUVEC y TIG se incubó con mezclas de medio EGM-2 y MEM no acondicionado (Fig. 4A, Control), A549 acondicionado MEM (Fig. 4B, A549 CM) y MEM acondicionado con A549 tratado con ERW (Fig. 4C, ERW-A549 CM) en una proporción de 1:2, respectivamente. Co-cultivos tratados con el A549 acondicionado MEM aumentó significativamente la formación de vascular túbulos en todos los parámetros analizados en comparación con el control; es decir, un aumento del 76 % en las áreas totales de los túbulos, un aumento del 200 % en el número de uniones de los túbulos, un aumento del 179 % en las

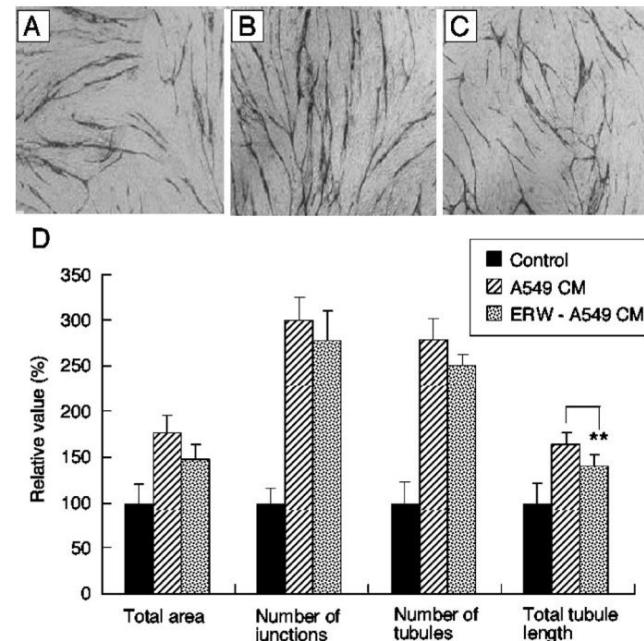


Fig. 4. Efectos de ERW en la formación de túbulos vasculares inducidos por el medio acondicionado por células A549

El cocultivo HUVEC/TIG-1 en una placa de 24 pocillos se desafió con mezclas de medio EGM 2 y MEM no acondicionado (A. Control), MEM acondicionado con células A549 (B. A549 CM) y MEM acondicionado con células A549 tratadas con ERW (C. ERW-A549 CM) mezclados en 1 : 2, respectivamente. Los medios se cambiaron cada 2 d. En el día 11, las formaciones de túbulos fueron detectados con un kit de tinción de túbulos y visualizado por microscopía de contraste de fase. Se usaron fotomicrografías de una cámara digital para caracterizar los túbulos. Las imágenes registradas se analizaron mediante software de cuantificación de angiogénesis (D). Doce campos aleatorios por pocillo se representaron para la evaluación de la formación de túbulos. Los datos se expresan en porcentaje del área total, el número de uniones, el número de túbulos y el total longitud del tubo en células de control no tratadas (media S.E.). Los asteriscos representan un significativo diferencia en comparación con los controles (p < 0,05). Los valores de p de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

el número de túbulos, y un aumento del 65% del túbulos total longitud, respectivamente (Fig. 4D: compara control y A549 CM). Teniendo en cuenta estos resultados, condicionado Se utilizó medio derivado de células A549 cultivadas con ERW (ERW A549 CM) para ver cómo ERW influye en el túbulos.

parámetros de formación. Los resultados mostraron que el tratamiento de ERW afectó solo la longitud total del túbulos, disminuyéndola en un nivel estadísticamente significativo en comparación con A549 CM tratado células ( $p<0.01$ , Fig. 4D: ver longitud total del túbulos). A pesar de, el parámetro de longitud total de túbulos se usa comúnmente para el análisis cuantitativo de la formación de túbulos, otros parámetros fueron también medido. Se demostró que ERW ejerce su influencia al suprimiendo marginalmente los otros tres parámetros, aunque no a un nivel estadísticamente significativo (Fig. 4D). Estos resultados sugirió fuertemente que ERW ejerce un efecto inhibidor sobre angiogénesis inducida por tumores mediante la regulación negativa de H2O2 liberación y secreción de VEGF de las células A549 (Fig. 4).

## DISCUSIÓN

Nuestros hallazgos sugieren que ERW reduce el H2O2 inducido expresión de VEGF en una línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano, A549. Como las células cancerosas producen ROS, incluido H2O2, la liberación de H2O2 podría desencadenar el proceso angiogénico en esas células cancerosas.<sup>9,11,12,14</sup> Además, también se ha demostrado que el H2O2 para inducir una expresión significativa de VEGF en varias células tipos.<sup>33-35</sup> Además, se ha demostrado que la vascularización del tumor es directamente correlacionado con la producción de VEGF por los tumores.<sup>36-41</sup> El bloqueo del VEGF secretado por el tumor por un anticuerpo anti-VEGF causó un daño significativo en las células endoteliales.<sup>42</sup> Estos resultados juntos apoyan fuertemente la hipótesis de que el bloqueo de la liberación de H2O2 y la secreción de VEGF del cáncer tiene valor terapéutico al conferir un efecto antiangiogénico efecto. En esta línea, antioxidantes como la N-acetilcisteína, vitamina E, catequinas y polifenoles naturales del vino tinto han sido evaluados por su eficacia, con resultados positivos.<sup>42-47</sup>

La vía de transducción de señales para la expresión de VEGF es muy divergente y depende del tipo de célula. Involucrado en tanto fosfatidilinositol 3-quinasa como MAPK/ERK quinasa 1/2 en la regulación de la expresión de VEGF se reporta en astrocitomas<sup>48</sup> y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello,<sup>49</sup> mientras que la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa, pero no ERK. La expresión de VEGF regulada por MAPK está involucrada en el carcinoma hepatocelular.<sup>50</sup> Además, se informa que p38 MAPK afecta expresión de VEGF en músculo liso vascular,<sup>43</sup> y mama cancer<sup>51</sup> células, mientras que ERK MAPK lo hace en fibroblastos,<sup>52</sup> y carcinoma de colon.<sup>53</sup> En el presente estudio, al menos ERK se demostró que participa en la regulación de la expresión de VEGF en células de adenocarcinoma de pulmón A549, porque solo PD98059 bloqueó la expresión de VEGF en las células (Fig. 3).

La activación de ERK es sensible al estrés redox.<sup>54-58</sup> Por lo tanto, el la reducción del estrés redox inducido en las células o la neutralización del estrés oxidativo exógeno pueden bloquear la activación de ERK MAPK, que puede dar lugar a una alteración del objetivo la expresión genética. Galato de epigalocatequina, un antioxidante contenido en el té verde, inhibió la expresión de VEGF a través de la supresión de la activación de ERK en el cáncer de colon humano HT29 células.<sup>59</sup> En el estudio actual, ERW inactivó ERK de manera dependiente del tiempo, dentro de las 4 h, después de lo cual ERW no mostró efecto adicional en la activación de ERK. Esto indicó que el effi

La eficacia de los REG en la activación de ERK es solo a corto plazo. La inhibición de la expresión constitutiva de VEGF en células A549 puede atribuirse parcialmente al bloqueo de la activación de ERK por ERW. Además, consideramos posibles factores de transcripción involucrados en la regulación de la transcripción del gen VEGF en relación con ROS. Estimulación exógena de células cultivadas por hidrógeno. Se demostró que el peróxido (H2O2) aumenta el ARNm de VEGF en un forma dependiente de la dosis y el tiempo. Activación del ARNm de VEGF también se demostró que se correlaciona con una unión mejorada de AP y NF-B residuo P60(NF- $\kappa$ B) complejoado con la proteína inhibidora IB enmascarando la señal de localización nuclear de NF-B. NF-B se activa mediante tratamiento con H2O2 a través de la fosforilación de IB para liberar NF-B para la energía nuclear translocación a través de la proteína quinasa activada por mitógeno Ras (MAPK) vía.<sup>61</sup> Nuestros resultados actuales con inhibidores específicos mostraron que la vía MAPK (p38 y JNK) no es involucrados (Fig. 3) y, por lo tanto, se excluye la activación del ARNm de VEGF por NF B. Por otro lado, AP-1 se considera como un factor de transcripción sensible a redox<sup>62</sup> y, por lo tanto, ARNm de VEGF Es probable que la regulación positiva por H2O2 involucre a AP-1. Otro el factor de transcripción, ETS-1, está regulado al alza por H2O2 a través HIF-11, que se estabiliza con H2O2. de HIF 63,64) El a (120kDa) forma un complejo con la subunidad HIF-1 (94 kDa) que forma el HIF-1 funcional (factor 1 inducible por hipoxia). HIF-1 es la tasa a subunidad limitante que determina la actividad del HIF-1 complex.<sup>65</sup> HIF-1 es una proteína de vida corta que se mantiene en niveles bajos y a menudo indetectables en normoxia, mientras que es fuertemente inducida en células hipoxicas.<sup>66</sup> Mostramos que ERW elimina H2O2 endógeno y exógeno (Fig. 1) lo que sugiere que la participación de ETS-1 regulada por HIF-1 es menos probable. Sin embargo, se ha demostrado que el promotor ETS-1 contiene varios sitios de unión a factores de transcripción, incluido AP 167, y AP-1 se considera un agente de transcripción sensible a redox.<sup>62</sup> Tomando toda esta información en consideración, deduje AP-1 como el principal candidato para regular al alta Transcripción de VEGF.

Los resultados actuales descubrieron que los niveles de ARNm se redujeron drásticamente en las células tratadas con ERW mientras se secretaba los niveles de proteína disminuyeron bastante lentamente. Disminución drástica del ARNm podría interpretarse como que la vida media del ARNm de VEGF es 42 min<sup>68</sup> y 436 min<sup>69</sup> en condiciones normoxicas, mientras que la vida media promedio del ARNm eucariótico es de 10 a 12 h.<sup>70</sup> Además, el ARNm de VEGF contiene elementos desestabilizadores en su 5UTR, región de codificación y 3UTR, y tres elementos actuar de forma aditiva para ejecutar una degradación rápida en condiciones normoxicas condiciones.<sup>71</sup> Nuestros experimentos se llevaron a cabo bajo ni condiciones móxicas y, por lo tanto, se considera que el ARNm es de corta duración Además, las actividades del peróxido de hidrógeno Los factores de transcripción regulados (H2O2) también disminuirían debido a la disminución de los niveles de H2O2 por la actividad depuradora de ERW. Considerando los tiempos de incubación (0.5, 4.0, 24 h) utilizados y La vida media corta del ARNm de VEGF, así como los factores de transcripción reducidos, en conjunto explicarían la disminución drástica de Niveles de ARNm de VEGF en las presentes condiciones experimentales (Figura 3A). La proteína VEGF secretada en el medio no disminuye drásticamente como lo hace el ARNm. Nuestra interpretación es que los niveles de proteína VEGF analizados son acumulativos en lugar de niveles de punto de tiempo. Por lo tanto, la cantidad de proteína se acumulará a medida que el tiempo de incubación se prolongue hasta 24 h. A las 24 horas punto, el medio de control contiene 1217.9461.83 pg/ml mientras que El medio tratado con ERW contiene 1095.5321.50 pg/ml y

enero de 2008

25

por lo tanto, el medio tratado con ERW todavía contiene ca. 85% de VEGF proteína (Fig. 2B). Entonces, uno esperaría que más VEGF Si existe proteína en el medio acondicionado, se producirá una mayor formación de túbulos. ERW podría haber reducido ca. 15% VEGF proteína en comparación con el control después de 24 h de incubación y, por lo tanto, la formación de túbulos es ejercida por ca. 85% proteína VEGF.

Tres criterios muestran las tendencias represivas aunque no niveles estadísticamente significativos, y mostró una reducción significativa en la longitud total del túbulos solamente (Fig. 4D). Por lo tanto, el ensayo de formación de túbulos vasculares está de acuerdo con los niveles de proteína detectados en la Fig. 2B (Fig. 4D).

El mecanismo subyacente a la forma en que los REG eliminan de forma eficaz el H2O2 intracelular aún no se ha aclarado con más detalle. ERW contiene una alta concentración de moléculas de hidrógeno, sin embargo, la molécula de hidrógeno es químicamente inerte a temperatura ambiente. temperatura. En un intento de superar este desafío problema, Shirahata et al. propuso una hipótesis de hidrógeno activo de agua reducida en la que el hidrógeno activo con un alto potencial reductor fue producido en ERW por electrólisis y desempeñó un papel clave en la eliminación de ROS.<sup>24,72</sup> El hidrógeno activo se puede producir a partir de una molécula de hidrógeno mediante catálisis acción de nanopartículas de metales nobles como nanopartículas de platino.<sup>73</sup> Nanopartículas de metales de transición como Pd, Pt, Ni y El Cu se produce durante el proceso de electrólisis.<sup>74</sup> También se ha demostrado que las nanopartículas de platino se adsorben hidrógeno activo.<sup>75</sup> Las nanopartículas de platino sintético fueron ha demostrado eliminar los radicales superóxido.<sup>76</sup> Existe la posibilidad de que las nanopartículas de platino derivadas de compuestos recubiertos de platino electrodo de titanio utilizado aquí durante la electrólisis y el metal Las nanopartículas de 1 a 10 nm de tamaño pueden existir de manera estable en solución para mucho tiempo.<sup>74</sup> Tomados en conjunto, aquí proponemos una nueva hipótesis de nanopartículas metálicas que contienen agua reducida y molécula de hidrógeno de la siguiente manera: (1) La electrólisis produce hidrógeno activo en el electrodo de platino catódico y una molécula de hidrógeno hipersaturada en ERW. (2) Iones metálicos en la solución se reducen a nanopartículas de metal en el electrodo o en ERW ricos en hidrógeno. (3) nanopartículas de metales de transición con tendencias iónicas bajas, el hidrógeno activo adsorbido o absorbido puede existir de manera estable en ERW, pero otras nanopartículas metálicas con altas tendencias iónicas como Na y K desaparecen en REG pronto. (4) La molécula de hidrógeno se convierte constantemente en hidrógeno activo, que puede eliminar ROS, mediante la catálisis de nanopartículas metálicas. Algunos tipos de nanopartículas metálicas como Las nanopartículas de platino también pueden eliminar directamente ROS sin una molécula de hidrógeno.

Por otro lado, Kikuchi et al. planteado la hipótesis, al intentar dilucidar la(s) sustancia(s) eliminadora(s) de ROS en los REG, que activó hidrógeno molecular o nanoburbujas de hidrógeno son responsables de la reducibilidad de ERW.<sup>77-81</sup> Recientemente, Se demostró que el hidrógeno molecular actúa como un selectivo antioxidante contra los radicales de oxígeno citotóxicos como el hidroxilo radical y peroxinitrito.<sup>82</sup> Hiraoka et al. informó que REG y varias aguas minerales naturales también poseen actividades reductoras y se planteó la hipótesis de que se debe al hidrógeno molecular y/o iones reductores de vanadio.<sup>83,84</sup> Hanaoka et al. sugirió que la mejora de la actividad de dismutación radical del anión superóxido puede explicarse por cambios en el iónico producto del agua en REG.<sup>85,86</sup>

Los principales inconvenientes de la quimioterapia contra el cáncer son los diversos efectos secundarios de los medicamentos utilizados y la resistencia que puede desarrollando a estos medicamentos. Para resolver estos problemas, una ONU

compreensión de las diferencias biológicas entre el cáncer y Se necesitan células normales. También será necesario buscar encontrar agentes terapéuticos apropiados que puedan bloquear los eventos biológicos críticos para las células cancerosas, pero no aquellos para las células normales. células. Las células cancerosas, en comparación con las normales, están expuestas a mayores tensiones oxidativas asociadas con la transformación oncogénica, alteraciones en la actividad metabólica y aumento generación de ROS. ERW posee una ventaja sobre muchos otros antioxidantes en las células cancerosas con mayor oxidación estrés son más propensos a verse afectados por ERW, mientras que normal las células no lo son.

En conjunto, demostramos aquí por primera vez que ERW puede suprimir la angiogénesis inducida por las células A549 mediante la regulación a la baja tanto de la liberación de H2O2 como de la expresión de VEGF. Además, nuestro estudio sugirió que ERK MAPK juega un papel crítico en la regulación de la expresión de VEGF en A549 células, y que la inhibición de VEGF por ERW se correlacionó parcialmente con la inactivación de ERK MAPK.

Si bien los presentes resultados han señalado el intracelular sitios objetivo regulados por REG, qué componente(s) en REG el H2O2 intracelular realmente eliminado queda por dilucidar. Las investigaciones futuras deben dirigirse a esclarecer el(es) agente(s) reductor(es) en los REG. Además, nuestros estudios futuros podrían ser dirigido a realizar experimentos similares bajo condiciones normóxicas y condiciones hipóxicas para conocer los efectos de ERW en los niveles de expresión génica que incluyen la confirmación de la participación de AP-1.

## REFERENCIAS

- 1) Hicklin DJ, Ellis LM, *J. Clin. Oncol.*, 23, 1011-1027 (2005).
- 2) Ferrara N., *Trends Cardiovasc. Med.*, 3, 244-250 (1993).
- 3) Senger DR, Perruzzi CA, Feder J., Dvorak HF, *Cancer Res.*, 46, 5629—5632 (1986).
- 4) Kunz M., Ibrahim SM, *Mol. Cáncer*, 2, 23—35 (2003).
- 5) Berse B., Brown LF, Van de Water L., Dvorak HF, Senger DR, *mol. Biol. Cell*, 3, 211-220 (1992).
- 6) Brown LF, Berse B., Jackman RW, Tognazzi K., Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ, Am. J. Pathol., 143, 1255—1262 (1993).
- 7) Sato K., Terada K., Sugiyama T., Takahashi S., Saito M., Moriyama M., Kakinuma H., Suzuki Y., Kato M., Kato T., *Tohoku J. Exp. Medicina.*, 173, 355—360 (1994).
- 8) Takahashi H., Shibuya M., *Clin. Sci.*, 109, 227—241 (2005).
- 9) Monte M., Davel LE, De Lustig S., *Eur. J. Cáncer*, 33, 676—682 (1997).
- 10) Nilanjan M., Dipak KD, *radicales libres. Biol. Med.*, 33, 1047-1060 (2002).
- 11) Stone JR, Collins T., *Endothelium*, 9, 231-238 (2002).
- 12) Qian Y., Luo J., Leonard SS, Harris GK, Millecchia L., Flynn D. C., Shi X., *J. Biol. Chem.*, 278, 16189-16197 (2003).
- 13) Ushio-Fuaki M., *Cardiovasc. Res.*, 71, 226—235 (2006).
- 14) Szatrowski TP, Nathan CF, *Cancer Res.*, 51, 794—798 (1991).
- 15) Yoshida T., Maulik N., Engelman RM, Ho Y.-S., Magnenat J.-L., Rousou JA, Flack JE, III, Deaton D., Das DK, *Circulación*, 96, 216—220 (1997).
- 16) Das DK, Engelman RM, Rousou JA, Breyer RH, Otani H., Lemeshow S., *Res. Básica. Cardiol.*, 81, 155-166 (1986).
- 17) Tosaki A., Droy-Lefai MT, Pali T., Das DK, *Free Radic. Biol. Med.*, 14, 361-370 (1993).
- 18) Chua CC, Handy RC, Chua BHL, *Radic Libre. Biol. Med.*, 25, 891—897 (1998).
- 19) Inoue M., Itoh H., Tanaka T., Chun T.-H., Doi K., Fukunaga Y., N. Sawada, J. Yamashita, K. Masatsugu, T. Saito, S. Sakaguchi, Sone M., Yamahara K., Yurugi T., Nakao K., *Arterioscler Thromb. vasco Biol.*, 21, 560—566 (2001).
- 20) Nakae H., Inaba H., *J. Trauma*, 49, 511—514 (2000).

- 21) Koseki S., Itoh K., *J. Food Prot.*, 64, 1935—1942 (2001).
- 22) Vorobjeva NV, Vorobjeva LI, Khodjaev EY, *Artif. Órganos*, 28, 590—592 (2004).
- 23) Fujiyama Y., Koyama S., Bamba T., Tashiro H., Ono H., Kitahora T., 7th Functional Water Symposium Abstract, 2000, pp. 74—75.
- 24) Shirahata S., Kabayama S., Nakano M., Miura T., Kusumoto K., Gotoh, M., Hayashi H., Otsubo K., Morisawa S., Kataura Y., *Biochem. Biografía. Res. Commun.*, 234, 269-274 (1997).
- 25) Li YP, Nishimura T., Teruya K., Tei M., Komatsu T., Hamasaki T., Kashiwagi T., Kabayama S., Shim S.-Y., Kataura Y., Osada K., Kawahara T., Otsubo K., Morisawa S., Ishii Y., Gadek Z., Shirahata S., *Cytotechnology*, 40, 139—140 (2002).
- 26) Huang K.-C., Yang C.-C., Lee K.-T., Chien C.-T., *Kidney Int.*, 64, 704—714 (2003).
- 27) Huang K.-C., Yang C.-C., Hsu S.-P., Lee K.-T., Kiu HW, Morisawa S., Otsubo K., Chen C.-T., *Kidney Int.*, 70, 391—398 (2006).
- 28) Kim M.-J., Kim HK, *Life Sci.*, 79, 2288—2292 (2006).
- 29) Ruch W., Cooper PH, Baggolini M., *J. Immunol. Methods*, 63, 347-357 (1983).
- 30) Tischer E., Mitchell R., Hartman T., Silva M., Gospodarowicz D., *Fid des JC, Abraham JA, J. Biol. Chem.*, 286, 11947-11954 (1991).
- 31) Ruef J., Hu ZY, Yin L.-Y., Wu Y., Hanson SR, Kelly AB, Harker LA, Rao GN, Runge MS, Patterson C., *Circ. Res.*, 81, 24-33 (1997).
- 32) Shono T., Ono M., Izumi H., Jimi S.-I., Matsushima K., Okamoto T., Kohno K., Kuwano M., *Mol. Cell Biol.*, 16, 4231-4239 (1996).
- 33) Brauchle M., Oliver FJ, Kind P., Werner S., *J. Biol. Química*, 271, 21793—21797 (1996).
- 34) Cho M., Hunt TK, Hussain MZ, *Am. J. Physiol. Circo del corazón. Physiol.*, 280, H2357—H2363 (2001).
- 35) Zhu J.-W., Yu B.-M., Ji Y.-B., Zheng M.-H., Li D.-H., *World J. Gastroenterol.*, 8, 153—157 (2002).
- 36) Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A., Clark WC, Robertson JT, Ali IU, Oldfield EH, *J. Clin. In vest.*, 91, 153—159 (1993).
- 37) Wizigmann-Voss S., Breier G., Risau W., *Cancer Res.*, 55, 1358—1364 (1994).
- 38) Guidi AJ, Abu-Jawdeh G., Berse B., Jackman RW, Tognazzi K., Dvorak HF, Brown LF, *J. Natl. Cancer Inst.*, 87, 12137-12145 (1995).
- 39) Mattern J., Koomagi R., Volm M., *Br. J. Cancer*, 73, 931-934 (1996).
- 40) Suzuki K., Hayashi N., Miyamoto Y., Yamamoto M., Ohkawa K., Ito Y., Sasaki Y., Yamaguchi Y., Nakase H., Noda K., Enomoto N., Arai K., Yamada Y., Yoshihara H., Tujimura T., Kawano K., Yoshikawa K., Kamada T., *Cancer Res.*, 56, 3004—3009 (1996).
- 41) Balsari A., Maier JA, Colnaghi MI, Menard S., *Lab. Invest.*, 79, 897-902 (1999).
- 42) Malafa MP, Fokum FD, Smith L., Louis A., *Ann. Cirugía oncol.*, 9, 1023—1032 (2002).
- 43) Oak M.-H., Chataigneau M., Keravis T., Chataigneau T., Beretz, A., Andriantsitohaina R., Stoclet J.-C., Chang S.-J., Schini-Kerth VB, *Arterioscler. trombo. vasco Biol.*, 23, 1001-1007 (2003).
- 44) Agarwal A., Munoz-Najar U., Klueh U., Shih S.-C., Claffey KP, *Am. J. Pathol.*, 164, 1683—1696 (2004).
- 45) Castilla MA, Neria F., Renedo G., Pereira DS, Gonzalez-Pacheco FR, Jimenez S., Tramon P., Deudero JJP, Arroyo MVA, Yaguee S., Caramelo C., *Am. J. Physiol. Celular. Physiol.*, 286, C1170—C1176 (2004).
- 46) Tang F.-Y., Chiang E.-Pi, Shih C.-J., *J. Nutr. Bioquímica*, 18, 391-399 (2007).
- 47) Sadowska AM, Manuel-y-Keenoy B., De Backer WA, *Pulm. Farmacol. Ther.*, 20, 9—22 (2007).
- 48) Woods SA, McGlade CJ, Guha A., *Neurooncología*, 4, 242—252 (2002).
- 49) Dong G., Chen Z., Li ZY, Yeh NT, Bancroft CC, Van Waes C., *Cancer Res.*, 61, 5911-5918 (2001).
- 50) Huang GW, Yang LY, Lu WQ, *World J. Gastroenterol.*, 10, 809—812 (2004).
- 51) Xiong S., Grjialva R., Zhang L., Nguyen NT, Pisters PW, Pollock RE, Yu D., *Cancer Res.*, 61, 1727—1732 (2001).
- 52) Milanini J., Vinals F., Pouyssegur J., Pages G., *J. Biol. Química*, 273, 18165-18172 (1998).
- 53) Jung YD, Nakano K., Liu W., Gallick GE, Ellis LM, *Cancer Res.*, 59, 4804—4807 (1999).
- 54) Guyton KZ, Liu Y., Gorospe M., Xu Q., Holbrook NJ, *J. Biol. Chem.*, 271, 4138-4142 (1996).
- 55) Aikawa R., Komuro I., Yamazaki T., Zou Y., Kudoh S., Tanaka M., Shi ojima I., Hiroi Y., Yazaki Y., *J. Clin. Invest.*, 100, 1813-1821 (1997).
- 56) Abe MK, Kartha S., Karpova AY, Li J., Liu PT, Kuo WL, Shenson MB, *Am. J. Respir. Celular. mol. Biol.*, 18, 562-569 (1998).
- 57) Wang X., Martindale JL, Liu Y., Holbrook NJ, *Biochem. J.*, 333, 291-300 (1998).
- 58) Gaitanaki C., Konstantina S., Chrysa S., Beis I., *J. Exp. Biol.*, 206, 2759—2769 (2003).
- 59) Jung YD, Kim MS, Shin BA, Chay KO, Ahn BW, Liu W., Bu cana CD, Gallick GE, Ellis LM, *Br. J. Cancer*, 84, 844—850 (2001).
- 60) Chua CC, Handy RC, Chua BHL, *Radic Libre. Biol. Med.*, 25, 891-897 (1998).
- 61) Eyries M., Collins T., Khachigian LM, *Endothelium*, 11, 133—139 (2004).
- 62) Ordway JM, Eberhart D., Curraqn T., *Mol. Celular. Biol.*, 23, 4257—4266 (2003).
- 63) Wilson LA, Gemin A., Espiritu R., Singh G., FASEB J., artículo expreso 10.1096/fj.05-4401fje (2005).
- 64) Oikawa M., Abe M., Kurosawa H., Hida W., *Biochem. Biografía. Res. Comun.*, 289, 39—43 (2001).
- 65) Huang LE, Arany Z., Livingston DM, Bunn HF, *J. Biol. Chem.*, 271, 32253-32259 (1996).
- 66) Berra E., Pages G., Pouyssegur J., *Cancer Metástasis Rev.*, 19, 139—145 (2000).
- 67) Chen JH, Wright CD, *Oncogene*, 8, 3375-3383 (1993).
- 68) Liu LX, Lu H., Luo Y., Date T., Belanger AJ, Vincent KA, Akita GY, Goldberg M., Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C., *Biochem. Biografía. Res. Comun.*, 291, 908—914 (2002).
- 69) Levy AP, Levy NS, Goldberg MA, *J. Biol. Chem.*, 271, 2746-2753 (1996).
- 70) Yoo PS, Mulkeen AL, Cha CH, *World J. Gastroenterol.*, 12, 4937—4942 (2006).
- 71) Dibbens JA, Miller DL, Damert A., Risau W., Vadas MA, Goodall GJ, *Mol. Biol. Cell.*, 10, 907-919 (1999).
- 72) Shirahata S., "Tecnología de células animales: aspectos básicos y aplicados", *Actas de la 13.ª reunión de JAACT*, 16—21 de noviembre de 2000, ed. por Shirahata S., Teruya K., Kataura Y., Kluwer, Fukuoka-Karatsu, Japón, 2002, págs. 25—30.
- 73) Minaev B., Ågren H., *J. Mol. Catal. A*, 149, 179-195 (1999).
- 74) Roucoux A., Schulz J., Patin H., *Chem. Rev.*, 102, 3757—3778 (2002).
- 75) Isobe Y., Yamauchi M., Ikeda R., Kitagawa H., *Synthetic Metals*, 135—136, 757—758 (2003).
- 76) Hamasaki T., Kashiwagi T., Aramaki S., Imada T., Komatsu T., Li Y., Teruya K., Kataura Y., Kabayama S., Otubo K., Morisawa S., Shira hata S., "Animal Cell Technology Meets Genomics", *Actas de la 18.ª reunión de ESACT*, 11—14 de mayo de 2003, ed. por Godia F., Fussenegger M., Springer, Granada, España, 2005, pp. 249—251.
- 77) Kikuchi K., Takeda H., Rabolt B., Okaya T., Ogumi Z., Saitohara Y., Noguchi H., *J. Electroanal. Chem.*, 506, 22-27 (2001).
- 78) Kikuchi K., Takeda H., Rabolt B., Okaya T., Ogumi Z., Saitohara Y., Noguchi H., *J. Appl. Electrochem.*, 31, 1301-1306 (2001).
- 79) Kikuchi K., Tanaka Y., Saitohara Y., Maeda M., Kawamura M., Ogumi Z., *J. Colloid Interface Sci.*, 298, 914—919 (2006).
- 80) Kikuchi K., Tanaka Y., Saitohara Y., Ogumi Z., *Electrochim. Acta*, 52, 904—913 (2006).
- 81) Kikuchi K., Nagata S., Tanaka Y., Saitohara Y., Ogumi Z., *J. Elec troanal Chem.*, 600, 303-310 (2007).
- 82) Ohsawa I., Ishikawa M., Takahashi K., Watanabe M., Nishimaki K., Yamagata K., Katsura K.-I., Katayama Y., Asoh S., Ohta S., *Nat. Med.*, 13, 688-694 (2007).
- 83) Hiraoka A., Takemoto M., Suzuki T., Shinohara A., Chiba M., Shirao M., Yoshimura Y., *J. Health Sci.*, 50, 456—465 (2004).
- 84) Hiraoka A., Sasaki S., Yamada T., Shinohara A., Chiba M., *J. Health Sci.*, 52, 817—820 (2006).
- 85) Hanaoka K., *J. Appl. Electrochem.*, 31, 1307-1313 (2001).
- 86) Hanaoka K., Sun D., Lawrence R., Kamitani Y., Fernandes G., *Bio phys. Chem.*, 107, 71—82 (2004).