



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE
CIENCIAS DE LA SALUD**

TESIS DOCTORAL

**EFFECTO DE LA INTERACCIÓN HORMONA
TIROIDEA-ÓXIDO NÍTRICO Y DEL ESTRÉS
OXIDATIVO SOBRE EL CRECIMIENTO
TUMORAL, LA ANGIOGÉNESIS Y LA
ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA EN
TUMORES DESARROLLADOS EN RATONES**

**PRESENTADA POR:
JAVIER CARMONA CORTÉS**

**DIRIGIDA POR:
DRA. DÑA. ROSEMARY WANGENSTEEN FUENTES
DR. D. JOSÉ FÉLIX VARGAS PALOMARES**

JAÉN, 24 DE ABRIL DE 2015

ISBN 978-84-8439-905-6

**UNIVERSIDAD DE JAÉN. FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES. DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD.**



**EFFECTO DE LA INTERACCIÓN HORMONA TIROIDEA-ÓXIDO
NÍTRICO Y DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE EL CRECIMIENTO
TUMORAL, LA ANGIOGÉNESIS Y LA ACTIVIDAD
AMINOPEPTIDÁSICA EN TUMORES DESARROLLADOS EN
RATONES**

TESIS DOCTORAL

**Javier Carmona Cortés
2015**

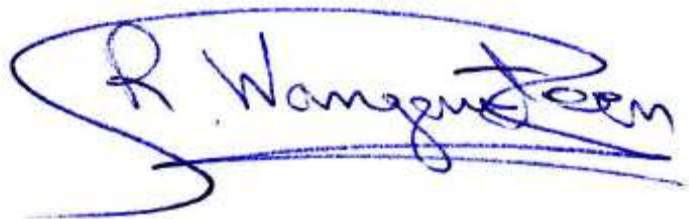
D^a ROSEMARY WANGENSTEEN FUENTES, DOCTORA EN FARMACIA Y PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE JAÉN

CERTIFICA:

Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: “Efecto de la interacción hormona tiroidea-óxido nítrico y del estrés oxidativo sobre el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la actividad aminopeptidásica en tumores desarrollados en ratones”, presentada por **Javier Carmona Cortés**, han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo la presente en

Jaén, a 24 de febrero de 2015

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'R. Wangenstein Fuentes', enclosed within a large, stylized blue oval flourish.

Fdo. Rosemary Wangenstein Fuentes

D. JOSÉ FÉLIX VARGAS PALOMARES, DOCTOR EN MEDICINA Y CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICA:

Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: “Efecto de la interacción hormona tiroidea-óxido nítrico y del estrés oxidativo sobre el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la actividad aminopeptidásica en tumores desarrollados en ratones”, presentada por **Javier Carmona Cortés**, han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo la presente en

Jaén, a 24 de febrero de 2015



Fdo. José Félix Vargas Palomares

Los resultados obtenidos durante la realización de la Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- ❖ **Carmona-Cortés J**, Rodríguez-Gómez I, Wangensteen R, Banegas I, García-Lora ÁM, Quesada A, Osuna A, Vargas F. Effect of thyroid hormone-nitric oxide interaction on tumor growth, angiogenesis, and aminopeptidase activity in mice. *Tumour Biology*. 2014; 35:5519-26

- ❖ Rodríguez-Gómez I, **Carmona-Cortés J**, Wangensteen R, Vargas-Tendero P, Banegas I, Quesada A, García-Lora AM, Vargas F. The pro-oxidant buthionine sulfoximine (BSO) reduces tumor growth of implanted Lewis lung carcinoma in mice associated with increased protein carbonyl, tubulin abundance, and aminopeptidase activity. *Tumour Biology*. 2014; 35:7799-805.

A mis padres, hermanos y abuela.

Agradecimientos

Me gustaría expresar todo mi agradecimiento a todas las personas que de algún modo han hecho posible la realización de esta tesis, sobre todo a los directores de la misma D. José Félix Vargas Palomares y, muy especialmente, D^a. Rosemary Wangenstein Fuentes, que me *“tendió su mano”* y me mostró su total apoyo desde el minuto uno, confiando en mis posibilidades y ayudándome y enseñándome todos sus conocimientos para estar conmigo trabajando en todos y cada uno de los momentos de la realización de este proyecto, y, sobre todo, transmitiéndome su pasión, sabiduría y dedicación por la investigación, haciendo que volviera a creer en mí cuando pensé que este campo me había cerrado completamente sus puertas. Sin duda, la mejor elección que pude hacer, es emprender este proyecto con ella. Nunca se lo podré agradecer lo suficiente.

Así mismo, a todas las personas con las cuales he desarrollado este proyecto en el seno del Departamento de Fisiología de la Universidad de Jaén:

A D. Manuel Ramírez y D^a Isabel Prieto, por trasladarme siempre positivismo y complicidad con su amabilidad y sonrisa.

A D^a. Inmaculada Banéguas y D^a. Isabel María Rodríguez Gómez (Universidad de Granada) porque sin la contribución de su excelente trabajo, esta tesis no hubiera sido posible llevarla a cabo.

Y en particular a mis *“compañeros de fatigas”* Sebastián Montoro y Andrés Quesada, que desde que llegué al departamento, me han acogido como uno más, enseñándome todo lo que sabían y creando un ambiente de trabajo donde trabajar es un lujo.

Por otro lado, darle la gracias a mi amiga Judit Contreras que siempre ha sabido arrancarme una sonrisa desde que empecé esta carrera allá por el 2003 y como no a Miguel Ángel Cano, mi fiel amigo que no sólo me animó a emprender este camino sino que ha sabido escucharme, apoyarme y animarme siempre que lo he necesitado sin pedir nada a cambio, estando conmigo en todo momento, tanto en lo bueno como en lo malo y levantándose con sólo una palabra cuando más hundido estaba. Gracias por estar siempre ahí.

Por último, mencionar a las personas más importantes en mi vida, mi familia, que gracias a ellos, a sus consejos y a los valores que me han inculcado desde pequeño, soy la

persona que soy, siendo los pilares fundamentales en mi vida y de los que siento un inmenso orgullo. A vosotros os dedico este gran logro en mi carrera porque cada uno de vosotros sois lo mejor que tengo, especialmente a mi preciosa madre Josefa Cortés, que es la persona que más me ha apoyado siempre para que luchara por alcanzar mis sueños y objetivos. Os quiero muchísimo.

ABREVIATURAS

- Abreviaturas -

❖ AG	Aminoguanidina
❖ AlaAp	Alanina aminopeptidasa
❖ ALD	Aldosterona
❖ ANG	Angiotensina
❖ ANG I	Angiotensina I
❖ ANG II	Angiotensina II
❖ ANG III	Angiotensina III
❖ ANG IV	Angiotensina IV
❖ Aps	Aminopeptidasas
❖ APR	Actividad plasmática de renina
❖ AT1	Receptor de angiotensina 1
❖ AT2	Receptor de angiotensina 2
❖ AVP	Vasopresina
❖ BH4	Tetrahidrobiopterina
❖ BSO	Butionina-sulfoximina
❖ CAGE	Enzima generadora de angiotensina II sensible a cimostatina

❖ CAT	Catalasa
❖ CEs	Células endoteliales
❖ cGPx	GPx citosólica
❖ CHC	Carcinoma hepatocelular
❖ CMI	Crecimiento microvascular por invaginación
❖ DII4	Ligando 4 delta-like
❖ ECA	Enzima convertidora de angiotensina
❖ eGPx	GPx extracelular
❖ eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
❖ FGF	Factor del crecimiento fibroblástico
❖ giGPx	GPx gastrointestinal
❖ GluAp	Glutamil aminopeptidasa
❖ Gpx	Glutation peroxidasa
❖ GR	Glutation reductasa
❖ GSH	Glutation reducido
❖ H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
❖ HIF-1	Factor inducible por hipoxia
❖ HUVECx	Células endoteliales de vena umbilical humana

❖ Id-1	Inhibidor de diferenciación
❖ IL-8	Interleucina 8
❖ iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
❖ L-NAME	N _ω -Nitro-L-arginina metil éster
❖ MAPK	Protein quinasa activada por mitógenos
❖ MDA	Malondialdihído
❖ MMP	Metaloproteinasa de la matriz
❖ MPO	Enzima mieloperoxidasa
❖ NAC	N-acetilcisteína
❖ NADPH oxidasa	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Oxidasa
❖ nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
❖ NO	Óxido Nítrico
❖ NOS	Óxido nítrico sintasa
❖ NOX	NADPH Oxidasa
❖ O ₂ ⁻	Anión superóxido
❖ PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
❖ PIGF	Factor de crecimiento placentario
❖ PLGPx	GPx fosfolipídica
❖ ROS	Especies de oxígeno reactivo

❖ RPT	Resistencia vascular periférica total
❖ SNC	Sistema nervioso central
❖ SOD	Superóxidodismutasa
❖ SRA	Sistema renina-angiotensina
❖ T ₃	Triyodotironina
❖ T ₄	Tiroxina
❖ Tetrac	Ácido tetrayodotiroacético
❖ TGF	Factor de crecimiento transformante
❖ TIMPs	Inhibidores tisulares de metaloproteasas
❖ TNF	Factor de necrosis tumoral
❖ tPA	Activador del plasminógeno tisular
❖ VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
❖ 7NI	7- Nitroindazol

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Angiogénesis

1.1.1. *Angiogénesis y vasculogénesis*.....1

1.1.2. *Mecanismos de angiogénesis*.....4

1.2. Angiogénesis y proliferación tumoral

1.2.1. *La angiogénesis como factor de proliferación tumoral*.....7

1.2.2. *Hipoxia y angiogénesis*.....9

1.2.3. *Aplicaciones clínicas de los bloqueantes angiogénicos*.....10

1.3. El sistema renina-angiotensina como regulador de la angiogénesis y vasculogénesis

1.3.1. *Angiotensinas*.....15

1.3.2. *El sistema renina-angiotensina como regulador de la angiogénesis y vasculogénesis*.....18

1.4. Hormonas tiroideas, sistema renina-angiotensina y angiogénesis

1.4.1. *Sistema renina-angiotensina y hormonas tiroideas*.....20

1.4.2. *Hormonas tiroideas y angiogénesis*.....22

1.5. El óxido nítrico como mediador de la angiogénesis

1.5.1. *Óxido nítrico: síntesis y funciones*.....25

1.5.2. *El óxido nítrico como factor angiogénico*.....28

1.5.3. *El óxido nítrico en la disfunción tiroidea*.....29

1.6. Estrés oxidativo y crecimiento tumoral

1.6.1. *Estrés oxidativo y radicales libres*

1.6.1.1. *Estrés oxidativo y radicales libres*.....31

1.6.1.2. *Especies reactivas del oxígeno (ROS)*.....32

1.6.2. Estrés oxidativo en el hipertiroidismo.....	37
1.6.3. Implicación del estrés oxidativo en la angiogénesis.....	39
2. OBJETIVOS.....	41
3. RESULTADOS.....	43
4. CONCLUSIONES.....	51
5. BIBLIOGRAFÍA.....	52
6. PUBLICACIONES QUE CONSTITUYEN LA TESIS.....	74

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 Angiogénesis

1.1.1. Angiogénesis y vasculogénesis

El término angiogénesis se refiere al proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente (*Fig. 1*) (Dvorak, 2005). El proceso de la angiogénesis incluye la migración y proliferación de células endoteliales (CEs), la formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares que eventualmente se unirán, para finalmente madurar en vasos sanguíneos estables (Zhu y Witte, 1999). La angiogénesis se lleva a cabo principalmente por los siguientes pasos (Carmeliet, 2005; Risau, 1997):

1. Las CEs precursoras dan origen a los vasos sanguíneos.
2. Las CEs se ensamblan formando un laberinto vascular primitivo de capilares pequeños (vasculogénesis).
3. El plexo vascular se expande de manera progresiva debido al nacimiento de los vasos.
4. Éste se remodela formando una red vascular altamente organizada de vasos grandes que se ramifican en vasos pequeños.
5. Los canales recién formados por CEs, son cubiertos por pericitos y células de músculo liso, las cuales regulan la contracción y dilatación de los vasos sanguíneos, proporcionando resistencia y permitiendo la regulación de la perfusión de los vasos.

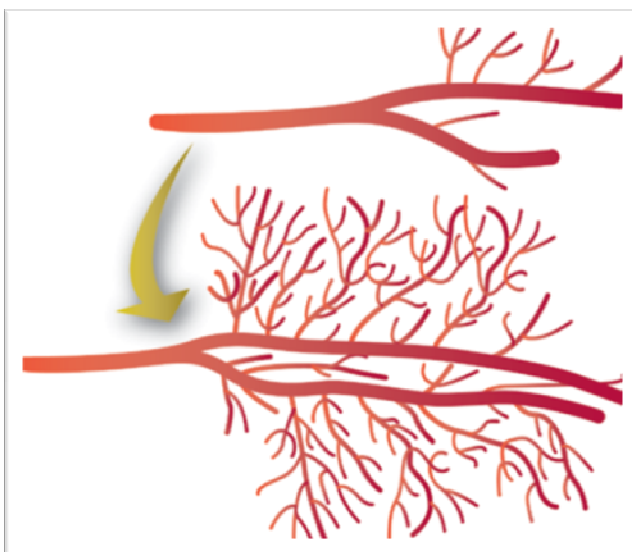


Fig. 1. Representación esquemática del proceso angiogénico. Extraído de Martínez-Ezquerro y Herrera, 2006.

Se pueden distinguir dos tipos de angiogénesis, la **angiogénesis fisiológica o normal** y la **angiogénesis patológica o anormal**. La primera, ocurre durante el crecimiento necesario de vasculatura que comienza en la embriogénesis y que continúa después del nacimiento en el desarrollo temprano postnatal. La segunda aparece cuando se alcanza y sobrepasa el umbral entre los estimuladores e inhibidores angiogénicos. Ésta, a su vez, se puede diferenciar en dos tipos de angiogénesis:

- **angiogénesis activada**
- **angiogénesis inhibida**

La diferencia entre estos 2 tipos de angiogénesis depende de cuáles sean los niveles dominantes de moléculas pro- o anti-angiogénicas, respectivamente (Ferrara, 2002). Existen diversas enfermedades asociadas a los distintos tipos de angiogénesis, una de las cuales (la proliferación de células tumorales), es de gran interés para nuestra investigación (ver *Tabla 1*).

ANGIOGÉNESIS	
ACTIVADA	INHIBIDA
<ul style="list-style-type: none"> • Hemangiomas • Psoriasis • Sarcoma de Kaposi • neovascularización ocular • Artritis reumatoide • Endometriosis • Aterosclerosis • Cáncer 	<ul style="list-style-type: none"> • Isquemia del miocardio • Isquemia periférica • Isquemia cerebral

Tabla 1. *Patologías que cursan con activación (columna izquierda) o con inhibición (columna derecha) de los procesos angiogénicos. Extraído de Martínez-Ezquerro y Herrera, 2006.*

Existen distintos procesos relacionados con la angiogénesis que implican el crecimiento endotelial vascular; uno de éstos es la **vasculogénesis** que generalmente hace referencia a la formación de nuevos vasos sanguíneos que ocurre en el desarrollo temprano del embrión a partir de células precursoras (Kelley y cols, 1997) (Ver *Fig. 2*).

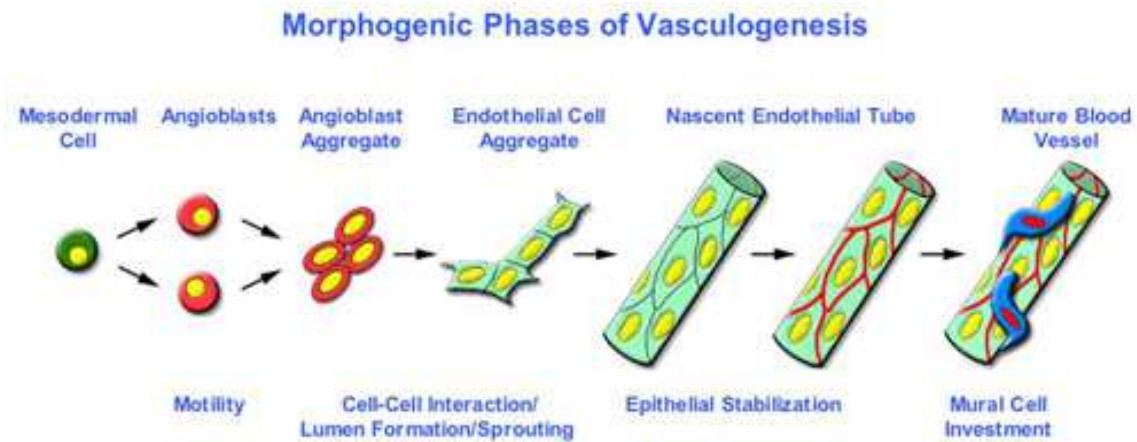


Fig. 2. Fases de la vasculogénesis.

➤ **Angiogénesis y vasculogénesis en el desarrollo embrionario:**

La **angiogénesis** y la **vasculogénesis** son dos mecanismos que dan lugar a la formación de la red vascular en el embrión.

La vasculogénesis da lugar al corazón y un primitivo plexo vascular dentro del embrión y de las membranas que lo rodean, como la circulación en el saco vitelino. La angiogénesis es la responsable de la remodelación y ampliación de esta red vascular. Mientras que la vasculogénesis se refiere a la diferenciación in situ y el crecimiento de vasos sanguíneos desde el mesodermo derivado de hemangioblastos, la angiogénesis está compuesta por dos mecanismos diferentes: la germinación endotelial y el crecimiento microvascular por invaginación (CMI).

- El proceso de germinación se basa en la migración de células endoteliales, la proliferación y la formación del tubo.
- El CMI divide el lumen de los vasos existentes mediante la formación y la inserción de pliegues de tejido y columnas de tejido intersticial en el lumen o luz del vaso (Patan, 2000) (*Fig. 3*).

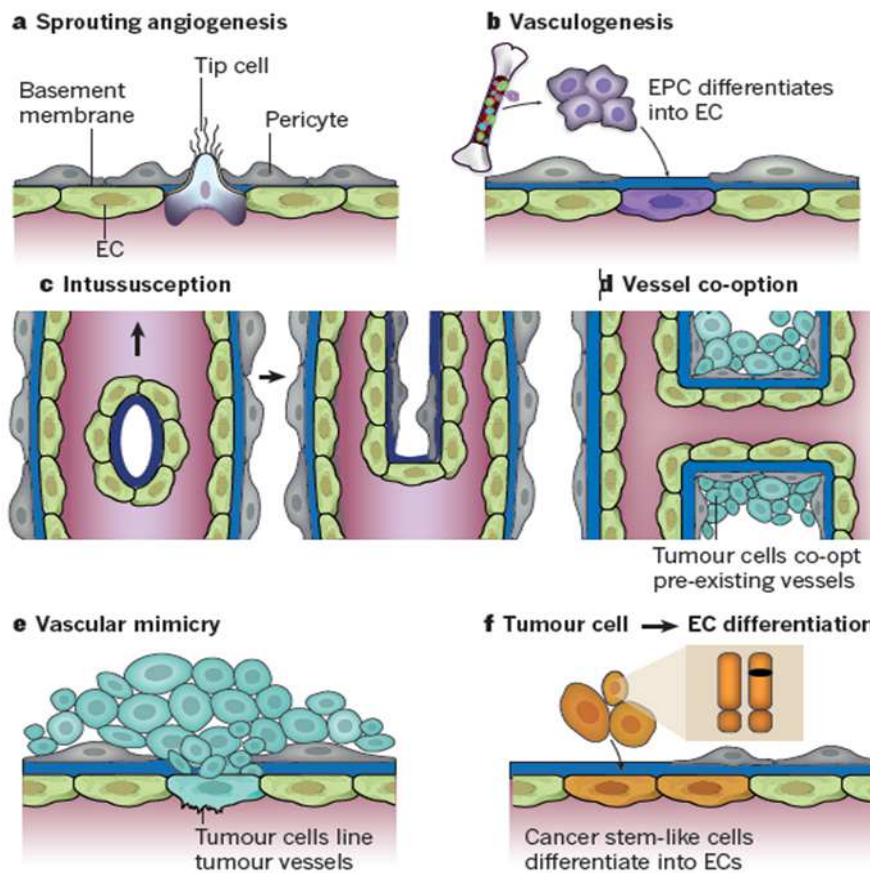


Fig. 3. Mecanismos de formación de los vasos sanguíneos. Extraído de Carmeliet y Jain, 2011.

1.1.2. Mecanismos de angiogénesis

Además del **VEGF** (*factor de crecimiento endotelial vascular*), existen distintas moléculas implicadas en la regulación positiva de la angiogénesis, incluyendo la **superfamilia FGF**, factor de crecimiento transformante alfa (**TGF- α**) y **TGF- β** , factor de necrosis tumoral alfa (**TNF- α**), angiogenina, interleucina 8 (IL-8), las **angiopoyetinas** (Ang-1 y -2) (Yancopoulos y cols, 2000) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (**PDGF**), entre otros. Aunque actualmente se reconoce al sistema que incluye al VEGF y sus receptores como el principal regulador de las CEs vasculares y de la formación de vasos sanguíneos (Ferrara, 2002; Carmeliet y Collen D, 2002). A continuación se expondrá un breve resumen de cada uno de ellos para poder apreciar, la importancia que tienen durante el proceso de la regulación de la angiogénesis.

- **El VEGF** es un factor de crecimiento con actividad mitogénica altamente específica para las CE; es miembro de la superfamilia de genes VEGF-PDGF que incluye al VEGF-A, -B, -C, -D y -E, así como al factor de crecimiento de placenta (PIGF) (Shibuya, 2001; Veikkola y cols, 2000).

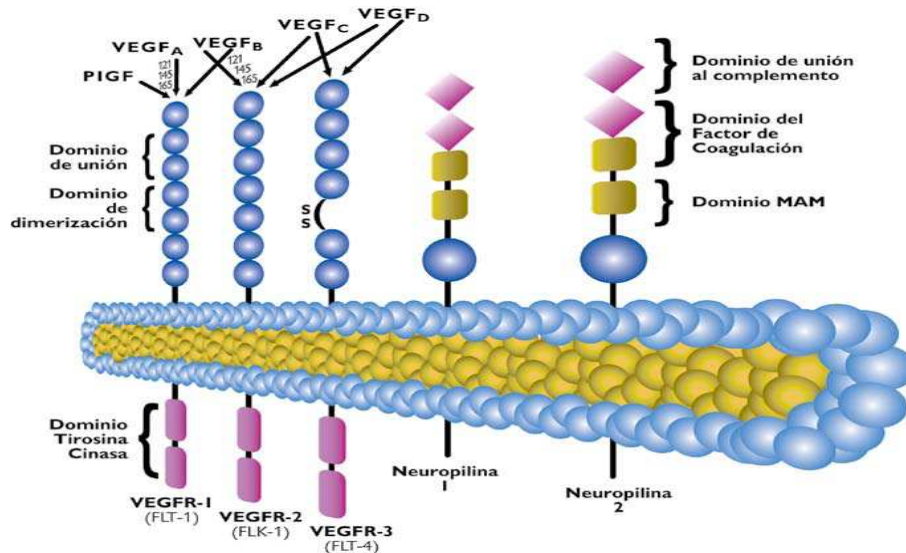


Fig. 4. Dominios que constituyen el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Extraído de Martínez-Ezquerro y Herrera, 2006.

El VEGF activo está compuesto por dos subunidades idénticas. La unión a su receptor es mediada por el homodímero. La modulación de la actividad del VEGF viene dada por la unión a heparina (ver Fig. 4).

El VEGF responde a varios estímulos tales como *hipoxia/isquemia* principalmente, a distintos factores de crecimiento, oncogenes activados así como a distintas citoquinas, estrógeno y óxido nítrico (NO). Mediante estos estímulos se aumenta la expresión del VEGF (Shibuya, 2001; Partanen, 2001) induciendo la proliferación de CE derivadas de las arterias, venas y vasos linfáticos (Ferrara, 2002) así como la proliferación de algunos tipos celulares no endoteliales (Matsumoto y cols, 2001).

Además es un hecho a resaltar, que el VEGF promueve la migración celular e inhibe la apoptosis (D'Arcangelo y cols, 2000), promueve la angiogénesis y la permeabilización de los vasos sanguíneos y participa en la vasculogénesis (Partanen, 2001) y en la linfangiogénesis (Nagy y cols, 2002).

Cuando su regulación es normal, el VEGF contribuye al remodelamiento vascular durante el ciclo ovárico y la implantación embrionaria, a la cicatrización y reparación, mientras que cuando es inadecuada, este factor contribuye al desarrollo de tumores sólidos al promover la angiogénesis.

- **Superfamilia FGF.** Pertenecen a esta familia, todos los factores del crecimiento fibroblástico (FGF) y entre sus miembros más importantes cabe mencionar: *FGF-1* (FGF ácido) y *FGF-2* (FGF básico), (Ornitz D.M e Itoh N, 2001). Los FGFs estimulan generalmente una variedad de funciones celulares uniéndose a los receptores de FGF de la superficie de la célula en presencia de proteoglicanos de la heparina.

FGF-1, es el único entre los 22 miembros de la familia de FGF que puede desencadenar una respuesta angiogénica en los tejidos dañados (hipoxia). FGF-1 estimula la proliferación y la diferenciación de todos los tipos celulares necesarios para construir un vaso arterial, incluyendo las células endoteliales y las células lisas del músculo; este hecho distingue a FGF-1 de otros factores de crecimiento angiogénico (Stegmann, 1998).

Además de FGF-1, **FGF-2** es un factor más angiogénico que VEGF pero menos potente que FGF-1. Resumiendo, FGF-1 y el FGF-2 estimulan la proliferación de los fibroblastos y de las células endoteliales que dan lugar a la angiogénesis.

- **Angiopoyetinas. ANG 1 y ANG 2**, se requieren para la formación de los vasos sanguíneos maduros (Thurston, 2003). ANG1 y ANG2 son factores de crecimiento proteicos que actúan ligándose a sus receptores de tipo 1 y de tipo 2; parece que las señales de la célula están transmitidas sobre todo mediante los receptores de tipo 2. Estos receptores son quinasas de la tirosina.

- **Familia PDGF.** La familia de **PDGF** consiste en PDGF-A, - B, - C y - D, que forman homo- o heterodímeros. Los cuatro PDGFs son inactivos en su forma monomérica.

El enlace de PDGFs se establece con los receptores de proteína quinasa de la tirosina (receptor- α de PDGF y β). La expresión de ambos receptores y de cada uno de los cuatro PDGFs está bajo control independiente, dando al sistema de PDGF/PDGFR una alta flexibilidad. Diversos estímulos externos como por ejemplo la inflamación y la angiogénesis, modulan la expresión celular del receptor permitiendo unirse a algunos PDGFs pero no a otros. Además, algunas células exhiben solamente una de las isoformas de PDGFR mientras que otras células expresan varias isoformas, simultáneamente.

- **TGF- β** . En ratones se ha estudiado que la pérdida de los receptores TGF- β ALK-1, TGFR-1 (ALK-5), TGFR-2 o ENG da como resultado malformaciones arteriovenosas (Pardali, 2010). Sin embargo, la comprensión de las bases moleculares de este estudio ha sido difícil debido a resultados incoherentes. Esto se debe en parte, a los efectos pro- y anti-angiogénicos de los miembros de la familia TGF- β .

Por otra parte, aunque TGF- β promueve la deficiencia de ENG o ALK-1 y deteriora el desarrollo celular, aún no está claro si otros componentes TGF- β median sus efectos vasculares in vivo por medio de las células endoteliales (Pardali, 2010). Estudios preclínicos han demostrado que los anticuerpos contra ENG o ALK-1 pueden inhibir la angiogénesis tumoral y el crecimiento. Varios bloqueantes de TGF-beta se encuentran en etapas tempranas de ensayo clínico.

- **Otros factores angiogénicos. MMP** (metaloproteinasa de la matriz) es otro factor que contribuye de forma importante en la angiogénesis. MMPs, ayuda a degradar a las proteínas que mantienen las paredes del vaso sólidas. Esta proteólisis permite a las células endoteliales poder escaparse hacia la matriz intersticial según lo visto en la angiogénesis. Por lo tanto, la inhibición de MMPs previene la formación de nuevo tubos capilares (Haas y cols, 2000).

- **DII4** (Delta-como el ligando 4), es una proteína recientemente descubierta como factor del crecimiento con unas características angiogénicas importantes similares a VEGF (Lobov y cols, 2007).

1.2 Angiogénesis y proliferación tumoral

1.2.1. La angiogénesis como factor de proliferación tumoral

Teniendo en cuenta que el oxígeno debe ser distribuido por la sangre a todas las células del cuerpo de un organismo, es necesario que las células estén localizadas (por lo menos en los vertebrados) entre 100 a 200 μm de un capilar para poder sobrevivir (Semenza, 2003; Carmeliet y Jain, 2000), por lo que si un grupo de células tumorales necesitan evadir la inanición, requieren promover el proceso normal de la angiogénesis para formar su propia fuente sanguínea mediante el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y así, superar la falta de distribución de oxígeno y nutrientes y evadir una muerte certera (Goodsell, 2003; Zetter, 1998).

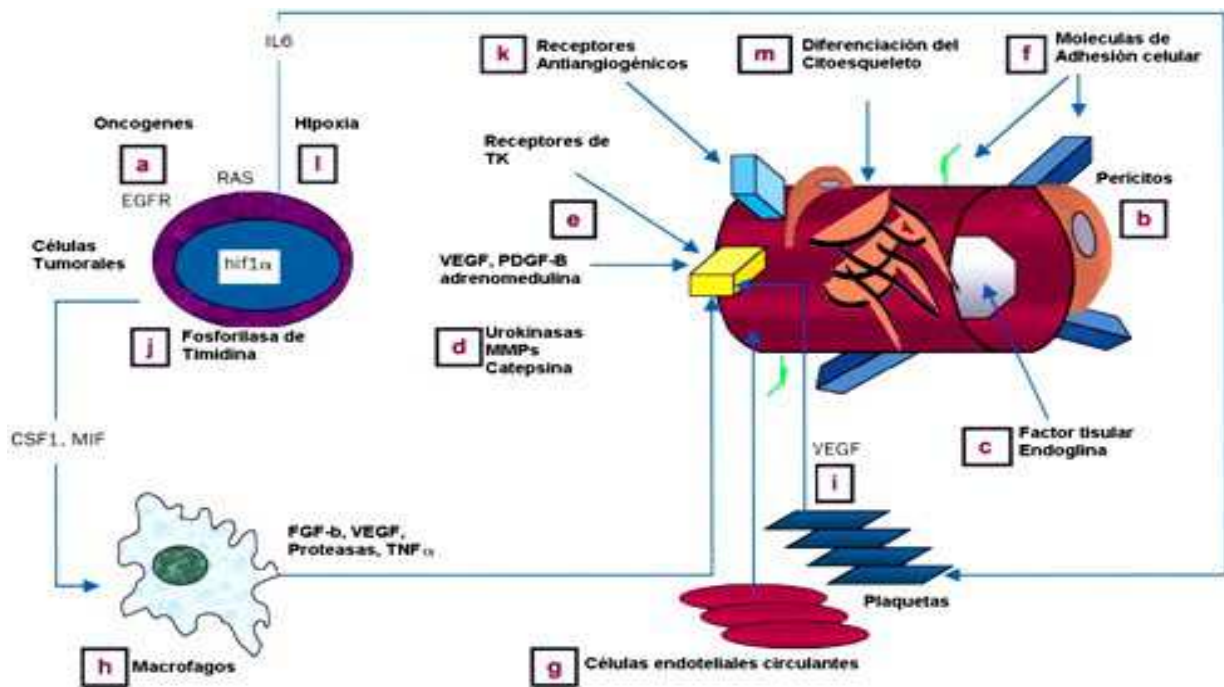


Fig. 5. Factores mediadores de la angiogénesis tumoral (Letelier, 2007).

Las células del tumor inducen angiogénesis en un proceso similar al de angiogénesis normal. La angiogénesis del tumor también es mediada por las moléculas generadas por las células del tumor y las células circundantes, tales como pericitos y monocitos (ver Fig.5) (Letelier, 2007).

El VEGF, Ang2, y FGF están implicados en la angiogénesis del tumor, pero en concentraciones más altas que en la angiogénesis de tejido normal. También actúan otros factores que normalmente no están implicados en la angiogénesis normal, como por ejemplo la interleuquina-8 (IL-8), que es más bien un factor de inflamación. La sobreexpresión de IL-8 en el tumor estimula la producción del metaloproteínasa de matriz 2 (MMP-2), que degrada la membrana basal, remodela la matriz extracelular y facilita la angiogénesis del tumor. Esta activación de la angiogénesis conduce a la **neovascularización** del tumor, dando como resultado su proliferación y crecimiento rápido (Nagy y cols, 2002). La angiogénesis no participa en la carcinogénesis pero si promueve la progresión tumoral (Carmeliet, 2005) y es un elemento esencial para la formación de metástasis al proveer un sitio de entrada a la circulación de los vasos sanguíneos, así como de oxígeno y nutrientes por la neoangiogénesis (Zetter, 1998).

Además, el tumor puede secretar factores que promueven reacciones linfáticas de manera similar a la producción de factores angiogénicos, influyendo en la ruta de diseminación metastásica dado que los vasos linfáticos pueden ser invadidos por las células tumorales.

Considerando lo anterior, queda claro que el bloqueo de la angiogénesis es actualmente considerado como una estrategia clave para atacar el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis, hecho que nuestro equipo de investigación desarrollará en esta tesis.

1.2.2. Hipoxia y angiogénesis

El carcinoma hepatocelular (CHC) es un tumor hipervascularizado y la angiogénesis juega un papel importante en su progresión (Sun y Tang, 2004). La **hipoxia** estimula a la angiogénesis ya que induce la expresión de factores de crecimiento angiogénicos tales como el VEGF (Kim y cols, 1998; Von Marschall y cols, 2001) provocando el crecimiento del tumor (Fig. 6). El factor inducible por hipoxia (HIF-1) da lugar a la expresión de VEGF, angiogénesis y crecimiento tumoral (Maxwell y cols, 1997). Además, la hipoxia induce la expresión de Rac, Id-1 (inhibidor de diferenciación) e incrementa la estabilización de HIF-1 α , resultando así una alta regulación de VEGF (Lee y cols, 2006). Además de la expresión de HIF-1 α y VEGF, la expresión de los supresores del tumor Hippeul-Lindau y p53 están regulados por la hipoxia (Xue y cols, 2006).

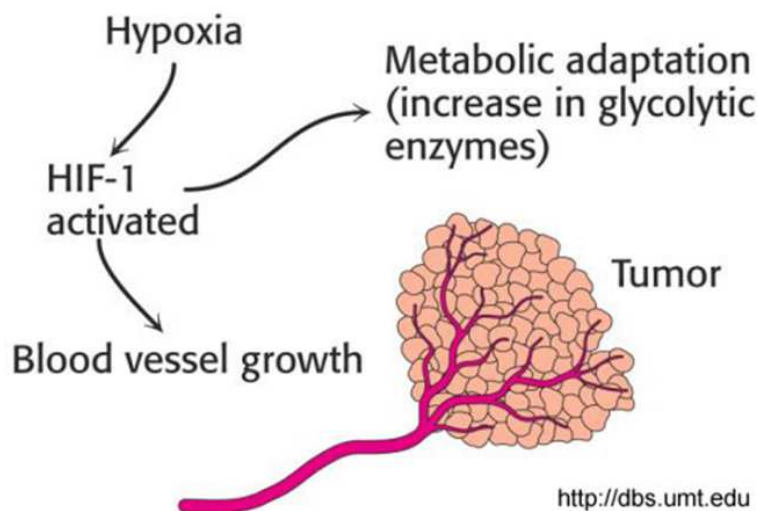


Fig. 6. Hipoxia y angiogénesis. Extraído de la página web <http://dbs.umt.edu>.

Recientemente, las drogas utilizadas para tratar la hipoxia han despertado mucho interés en la terapia contra el cáncer (Nagasawa y cols, 2006). Los inhibidores del HIF-1 α se utilizan como un nuevo tratamiento para la terapia anti-angiogénica contra el cáncer.

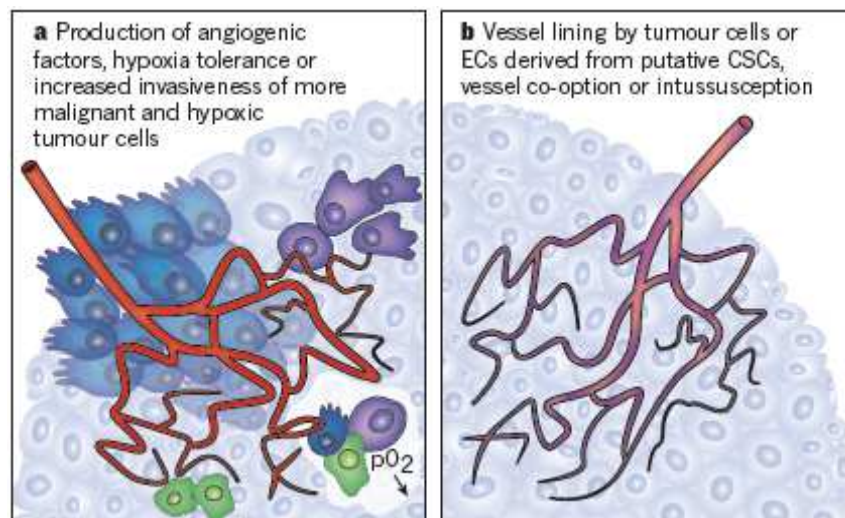
La curcumina, el extracto natural del té verde y sus principales componentes (epigallocatequina-3-galato y resveratrol), 3-(5'-hidroximetil-2'-furyl)-1-bencil indazol (YC-1), TX-402, vitexina, CK2 α siRNA, y rapamicina inhiben significativamente los factores de hipoxia, lo cual conlleva una disminución de angiogénesis debido a una baja expresión de HIF-1 y VEGF (Bae y cols, 2006).

1.2.3. Aplicaciones clínicas de los bloqueantes angiogénicos

En los años 70, Judah Folkman comenzó una nueva carrera en contra del cáncer, al hipotetizar que si el tumor requería de la neo-angiogénesis para poder crecer más allá de 1-2 mm entonces, al inhibir la angiogénesis, la expansión tumoral debería regresar por lo menos a un tamaño de 1-2 mm (Zetter, 1998; Ferrara y Kerbel, 2005).

Existen distintas situaciones patológicas que están caracterizadas por un aumento (cáncer, desórdenes oculares, articulares y de la piel) o una disminución de la angiogénesis (tejidos isquémicos) (Carmeliet, 2005), y este aumento o disminución es el resultado del sistema de activación/inactivación que involucra a los VEGFs/VEGFRs.

El desarrollo de agentes farmacológicos que inhiben o promueven la angiogénesis, hace a este sistema particularmente conveniente para su intervención en la búsqueda de resultados terapéuticos eficientes (*Fig. 7*).



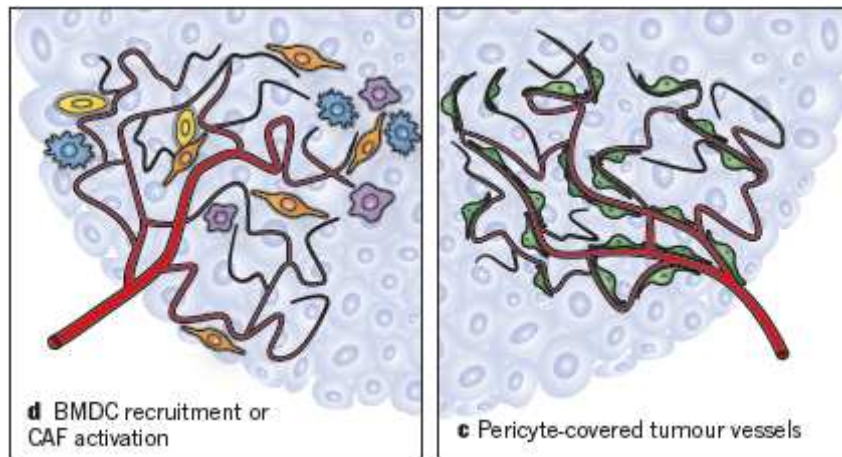


Fig. 7. Mecanismos de resistencia para VEGF en terapia contra el cáncer. Extraído de Carmeliet y Jain, 2011.

Es importante destacar que el **VEGF juega un papel fundamental en distintas condiciones, como el cáncer con metástasis**, por lo que su inactivación mediante la aplicación clínica de bloqueantes del mismo serviría como estrategia anti-angiogénica, y podría ser una solución ante la proliferación de células tumorales (Fig. 8) (Martínez-Ezquerro y Herrera, 2006).

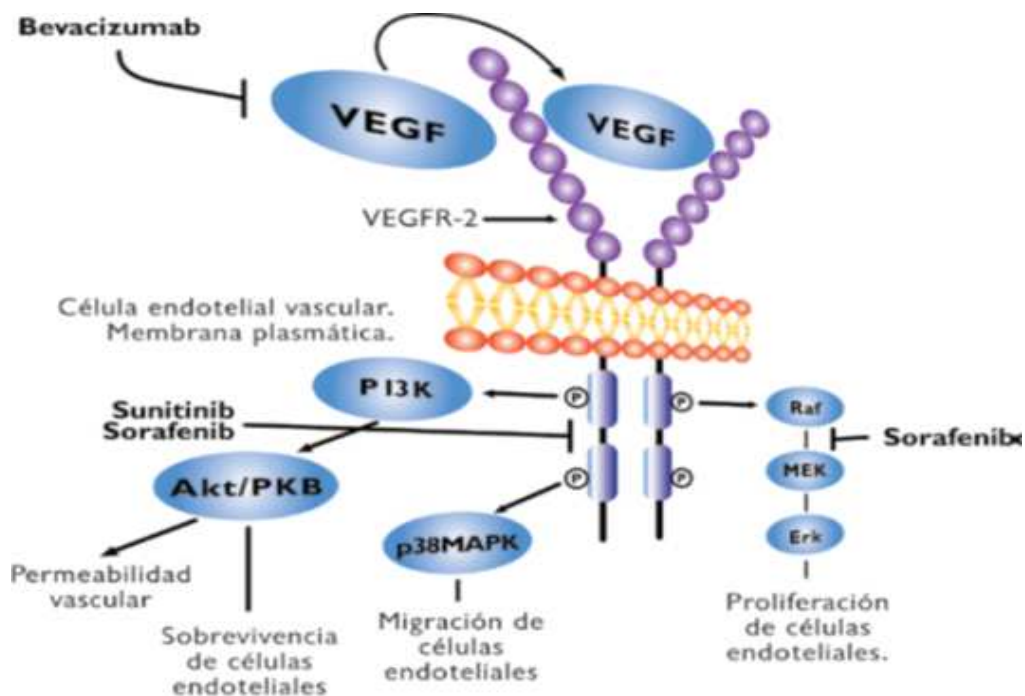


Fig. 8. Lugares donde actúan los bloqueantes de VEGF. Extraído de Martínez-Ezquerro y Herrera, 2006.

Las CEs son el principal blanco de esta estrategia porque, en teoría, su estabilidad genómica no les permitiría adquirir resistencia a las intervenciones antiangiogénicas.

Sin embargo, distintas estrategias adicionales se están enfocando en otros tipos celulares no endoteliales que afectan a la angiogénesis, por lo menos indirectamente (Carmeliet, 2005), para impedir la proliferación de las CEs, prevenir el crecimiento de los vasos e inducir la regresión de vasos pre-existentes. Procedo a una breve explicación de cada una de estas estrategias utilizadas en el ámbito clínico:

- **Anticuerpos para el VEGF o inhibidores del VEGF.** En virtud de que el VEGF es uno de los factores clave en la promoción de la angiogénesis, se han llevado a cabo distintos esfuerzos para inhibirlo mediante anticuerpos. En el 2004 se aprobaron los siguientes compuestos inhibidores del VEGF: el avastin (bevacizumab), que es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado contra el VEGFA165 (rhu Mab VEGF); así como el pegaptinib, un aptámero que bloquea al mismo factor, para el tratamiento de cáncer colorectal metastásico.

Sin embargo, se ha encontrado también que las estrategias que emplean anticuerpos anti-VEGF no siempre previenen el crecimiento de tumores sólidos (Partanen y Paavonen, 2001), probablemente debido a la dificultad para bloquear todos los VEGF circulantes (Zhu y Witte, 1999). Por otro lado, los VEGF-C y -D median la diseminación metastásica cuando son liberados por las células tumorales (Achen y cols, 1998), por lo que resulta importante analizar si la inhibición de estos factores tiene beneficios terapéuticos en pacientes con cáncer.

- **Anticuerpos contra VEGFRs.** La señalización del VEGFR-1 ha sido ligada a la inducción de MMP9 y a la facilitación de la metástasis por lo que es considerado como un blanco de inhibición en la terapéutica anti-tumoral (Ferrara y cols, 2003). De hecho, se ha observado que los anticuerpos monoclonales anti-VEGFR-2 como el DC101 pueden inhibir la angiogénesis. Debido a que el VEGFR-3 se encuentra expresado ampliamente en la mayoría de los tumores vasculares humanos benignos y malignos, y es frecuentemente sobre-expresado durante la transformación tumoral, esto hace de este receptor un candidato importante como un potencial blanco terapéutico anti-angiogénesis/ linfangiogénesis contra el desarrollo tumoral.

Esta propuesta se sustenta por estudios en los que la inactivación del VEGFR-3 mediante el bloqueo por anticuerpos monoclonales, suprime el crecimiento tumoral al inhibir la neo-angiogénesis en tejidos con tumor (Partanen y Paavonen, 2001).

- **Señuelos solubles.** Aprovechando la actividad de unión del VEGF y PlGF al sFlt₁, se han diseñado estrategias que emplean VEGFRs solubles que secuestran a sus ligandos evitando la unión a sus receptores de membrana, demostrando que son capaces de suprimir el crecimiento tumoral y la vascularización (Holash y cols, 2002).

- **Moléculas pequeñas inhibitoras de VEGFRs.** Se han desarrollado distintas moléculas con la finalidad de detener el crecimiento tumoral, al bloquear la cascada de señalización de los VEGFRs. Algunas de estas moléculas inhibitoras que han sido analizadas en protocolos clínicos fase II/III (Ferrara y Kerbel, 2005), incluyen al SU6668 que bloquea tanto al VEGFR-2 como al PDGFR- β (Shibuya, 2001; Bikfalvi y Bicknell, 2002), Bay 43-9006 o sorafenib, que bloquea al VEGFR- 2 y -3 (Ferrara y Kerbel, 2005) o vatalanib (Wood y cols, 2000) que bloquean a los VEGFR-1 y -2.

En ensayos clínicos de fase I la angiozima ha demostrado ser bien tolerada sin conocerse aun sus beneficios terapéuticos (Zhu y Witte, 1999).

- **Esteroides angiostáticos.** Algunos esteroides incluyendo a la progestina, acetato de medroxiprogesterona (único evaluado en estudios clínicos) y glucocorticoides como la dexametasona y cortisona fueron las primeras moléculas reconocidas en contar con actividad anti-angiogénica (Pietras y Weinberg, 2005). Sin embargo, otro esteroide, la escualamina, interrumpe significativamente la proliferación y progresión tumoral en estudios in vitro, mientras que en estudios pre-clínicos, ha mostrado beneficios aditivos en el retraso del crecimiento tumoral.

- **Inhibidores endógenos.** Consisten en fragmentos de proteínas grandes, que pueden actuar como inhibidores endógenos de la angiogénesis a razón de precursores latentes activados por la proteólisis.

- **Inhibidores de metaloproteinasas.** Todos los miembros de la familia de los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) inhiben la angiogénesis, así como el crecimiento tumoral y la metástasis.

- **Modificadores de la respuesta biológica.** Son sustancias sintéticas como el interferon- α (citosina) que se han utilizado para tratar distintos tumores, empleando su capacidad para estimular al sistema inmune y afectar el suministro sanguíneo (Folkman, 2003).

- **Péptidos anti-adhesivos.** Anticuerpos que reconocen a la integrina así como péptidos antagonistas, han mostrado la capacidad de bloquear la interacción de las integrinas con sus activadores, y actualmente se están realizando estudios clínicos de fase II para evaluar su utilidad en el tratamiento de distintos tumores sólidos (Zhu y Witte, 1999).

- **Otros agentes.** Los oligonucleótidos antisentido (Ferrara, 2002), así como anticuerpos de fragmento variable de una sola cadena (scFv), inmunotoxinas, inmunoliposomas (Zhu y Witte, 1999), anticuerpos e inhibidores de canales de calcio que bloquean la proliferación y migración de las células tumorales han sido utilizados exitosamente contra el crecimiento tumoral, principalmente al inhibir la actividad angiogénica por lo que disponen de un gran futuro en ensayos clínicos.

- **Estrategias combinatorias.** Como ya hemos revisado, el dirigir las estrategias contra el VEGF, aunque es el principal factor angiogénico, por sí solo no es suficiente para erradicar tumores malignos debido a que hay muchos factores angiogénicos además de éste. Para atacar este problema, se ha de combinar estrategias, obteniendo así efectos anti-tumorales mayores como por ejemplo al combinar la terapia anti-angiogénica particularmente contra el VEGFR y VEGFR-2 con la radioterapia así como quimioterapia, respectivamente (Ferrara, 2002).

1.3 El sistema renina-angiotensina como regulador de la angiogénesis y vasculogénesis

Diferentes líneas de investigación demuestran que la hipertensión y la angiogénesis son fenómenos funcionales asociados. El sistema renina-angiotensina (SRA) juega un papel central en la hipertensión arterial y se ha propuesto que regula la formación de los vasos sanguíneos durante el desarrollo normal y en el cáncer. Esta hipótesis se basa en diversos resultados bioquímicos, genéticos, clínicos y epidemiológicos, que guardan diferencias entre especies y pueden tener implicaciones relacionadas con la cardiología, oncología y neonatología.

1.3.1. Angiotensinas (ANG)

Las angiotensinas pertenecen a una familia de péptidos involucrados en la respuesta vascular.

El primero de estos agentes es el **angiotensinógeno** hepático sobre el cual actúa la renina, secretada por el aparato yuxtaglomerular (a nivel del riñón), transformándolo en **angiotensina I** (ANG I) que prácticamente carece de acción vascular (Donoghue, 2000; Brown, 2005) (Fig. 9). Por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), la ANG I es transformada en **angiotensina II** (ANG II), que es un potente vasoconstrictor que ejerce sus efectos fisiológicos a través de la interacción con dos tipos de receptores denominados AT1 y AT2:

- El **receptor AT1** está ampliamente distribuido en tejidos adultos. La interacción de la ANG II con el receptor AT1 produce un efecto vasoconstrictor, y un aumento en la contractibilidad cardíaca (De la Serna, 2004). Además, tiene acciones proangiogénicas y participa en diversas patologías renales y vasculares (Kim, 2000; Turner, 2002). Diversos estudios señalan la existencia de este receptor en el corazón (Sibinga, 2000) y en los vasos sanguíneos (Murphey, 2000).

- El **receptor AT2** tiene una distribución más limitada. Los receptores AT2 ejercen un efecto antagónico dando lugar a vasodilatación y actividad antiproliferativa (Brown, 2005; Baudin, 2002).

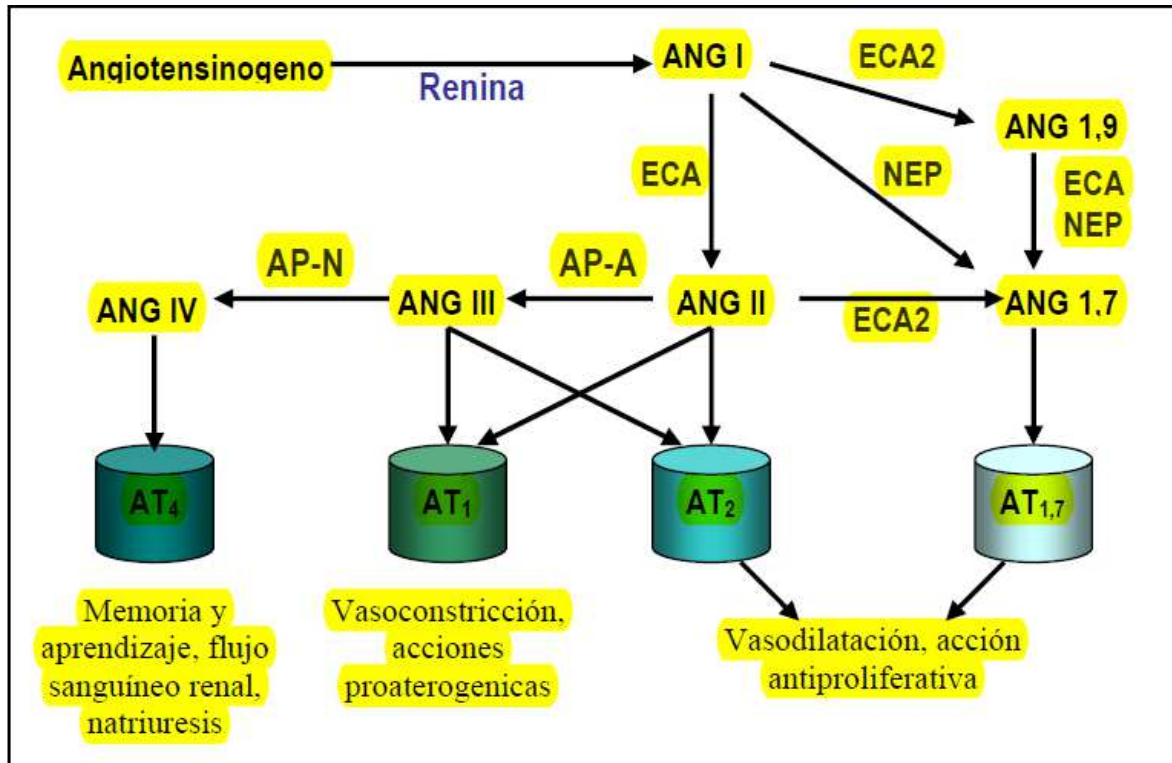


Fig. 9. Acciones inducidas por las diferentes angiotensinas a través de sus receptores. A través de diversas rutas metabólicas, la ANG I da origen a los distintos péptidos vasoactivos del SRA. Éstos a su vez, interaccionan con receptores específicos para generar las diferentes respuestas fisiológicas en el organismo. Extraído de Pennanen, 2005.

Existen algunas vías alternativas para la formación de ANG II independientes de ECA. En dichas vías es indispensable la participación de enzimas como la **CAGE** (Chymostatin-sensitive Ang II Generating Enzyme), **la quimasa** y la **catepsina G**, de las cuales la más predominante es la *quimasa* la cual desempeña un papel importante en corazones isquémicos o hipóxicos (Turner, 2002; De la Serna, 2004 y Ferreira, 2005).

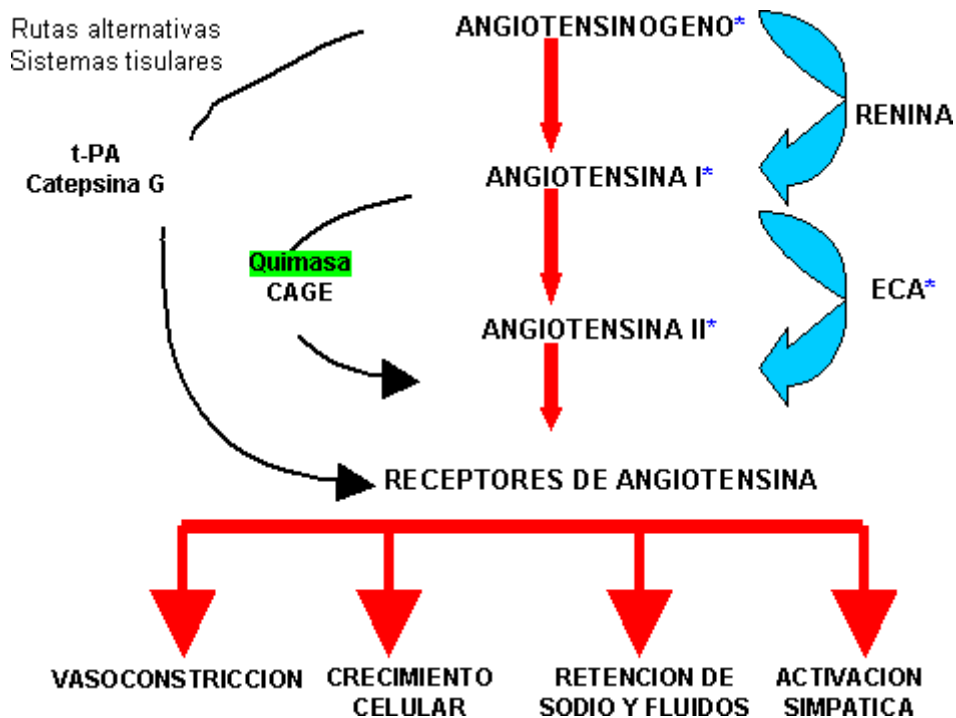


Fig. 10. Vías alternativas para la formación de ANG II. Extraído de Waisman y Morales, 2005.

Como consecuencia de la interacción con sus distintos receptores, las acciones de las angiotensinas se pueden concretar en:

* **ANG I.** Decapéptido separado del angiotensinógeno por acción de la renina. Débil vasoconstrictor y precursor de ANG II.

* **ANG II.** Octapéptido con potentes propiedades vasoconstrictoras. Tiene otras acciones como:

- a) Liberación de aldosterona (de la corteza de las glándulas suprarrenales), promoviendo la retención de agua y sal.
- b) Liberación de catecolaminas de la médula suprarrenal y de neuronas simpáticas.
- c) Crecimiento celular en el tejido vascular y miocárdico.

Además de las diferentes especies de ANG ya mencionadas, hay que destacar la presencia de dos péptidos más:

- La **ANG III**, asociada al control central de la presión sanguínea y la liberación de vasopresina.
- La **ANG IV** que, periféricamente, incrementa el flujo sanguíneo renal y la natriuresis, y, a nivel del sistema nervioso central (SNC) facilita la retención y recuperación de la memoria.

Ambas son producidas por la acción de aminopeptidasas (APs) sobre la ANG II y III (De la Serna, 2004; Turner, 2002 y Ferreira, 2005).

1.3.2. El sistema renina-angiotensina como regulador de la angiogénesis y vasculogénesis

El SRA es uno de los reguladores más importantes en los procesos de angiogénesis y vasculogénesis. Este hecho parece ser que se debe en gran parte a los efectos angiogénicos de las peptidasas que metabolizan la angiotensina. Se ha estudiado el SRA como regulador tanto de la angiogénesis que se produce durante el desarrollo fetal, como de la angiogénesis patológica.

En los últimos años se ha intentado analizar el papel de las peptidasas proangiogénicas responsables de metabolizar la ANG II. La proteasa asociada a membrana aminopeptidasa A o también conocida como **glutamil aminopeptidasa** (GluAp), se expresa en las células endoteliales vasculares del cuerpo. Esta enzima rompe el extremo NH₂-terminal de aspartato de la molécula de ANG II (8 aminoácidos) y la transforma en ANG III, de 7 aminoácidos (*Fig. 11*) (Jackson y cols, 2001), la cual tiene una alta afinidad por los receptores de ANG: AT1 y AT2. Tanto la ANG III como la ANG II, promueven en el sistema cardiovascular la producción de citoquinas y factores de crecimiento (Ruiz-Ortega y cols, 2001), y se ha demostrado un aumento de la actividad enzimática de la GluAp en el endotelio vascular de los tumores humanos y que los ratones que carecen de GluAp no manifiestan respuestas angiogénicas frente a la hipoxia o a factores de crecimiento (Marchio y cols, 2004). Estos hallazgos indican que, además de la ANG II, la ANG III también posee actividad proangiogénica.

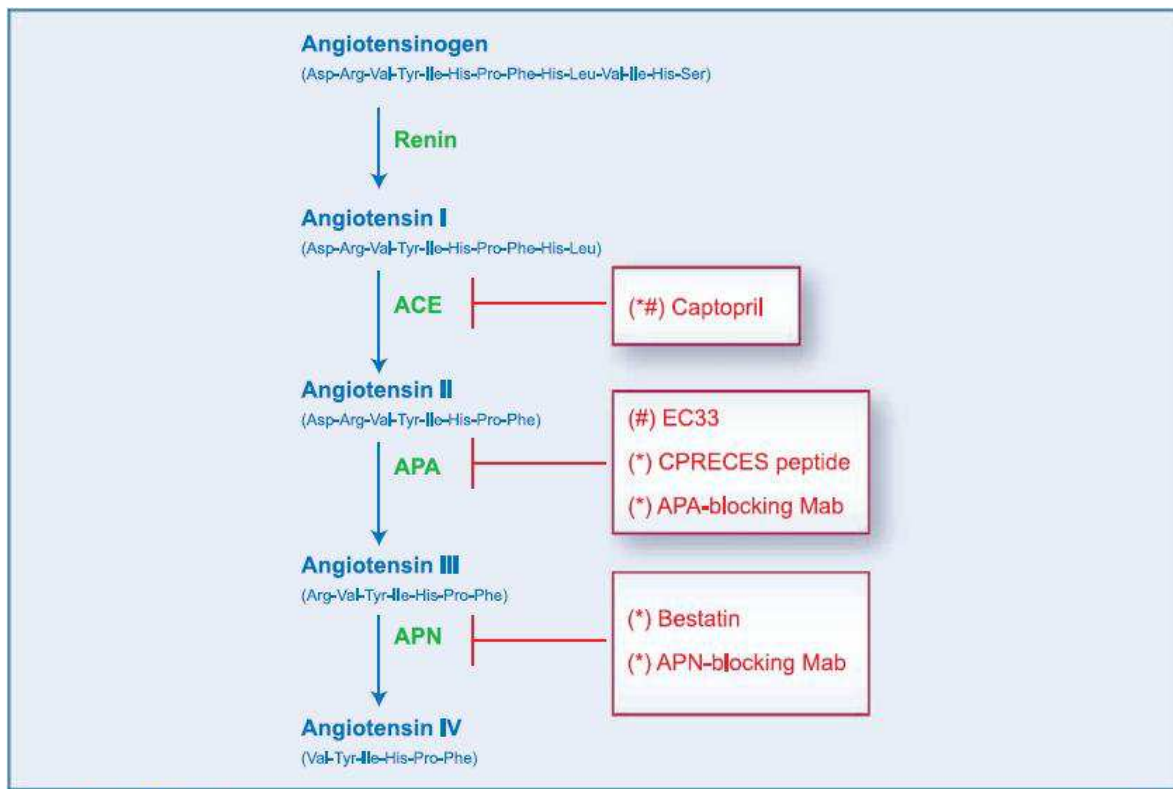


Fig. 11. Papel del SRA en la angiogénesis. *, agente antiangiogénico; #, agente antihipertensor. Extraído de Khakoo y cols, 2008.

La aminopeptidasa N o también conocida como **alanina aminopeptidasa** (AlaAp) retira el extremo arginina-NH₂ terminal de la ANG III para formar la ANG IV, de 6 aminoácidos (Fig.11) que también tiene actividad proangiogénica a través de la activación de los receptores AT₄. La AlaAp se expresa en vasos sanguíneos de tumores y otros vasos donde existe angiogénesis patológica, y se ha demostrado que los fármacos antagonistas de la AlaAp tienen efectos anti-angiogénicos in vivo (Pasqualini y cols, 2000).

Además, los activadores de los receptores de ANG II inducen al desarrollo de factores de crecimiento endoteliales, como, por ejemplo, el VEGF (Advani, 2007; Egami, 2003; Deshayes y Nahmias, 2005). Estos juegan un papel central en la vasculogénesis y en el desarrollo embrionario.

Por otra parte, diversos estudios demuestran que el captopril y otros inhibidores de la ECA, disminuyen el crecimiento de los tumores y que bloquean la angiogénesis (Volpert y cols, 1996; Yoshiji y cols, 2001). Así, la administración de un inhibidor de la ECA disminuye los niveles circulatorios de VEGF en estudios in vivo (Fujita y cols, 2002; Uemura y cols,

2008). Otros estudios en pacientes hipertensos revelan una menor incidencia de cáncer cuando se les suministran drogas inhibidoras de la ECA (Lever y cols, 1998).

1.4 Hormonas tiroideas, sistema renina-angiotensina y angiogénesis

1.4.1. Sistema renina-angiotensina y hormonas tiroideas

El hipertiroidismo se acompaña por una hiperactividad del SRA (Ganong y cols, 1982; García del Río y cols, 1997; Vargas y cols, 2012b). De este modo, la actividad de la renina a nivel plasmático y los niveles de aldosterona están directamente relacionados con los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas (Ganong y cols, 1982; Jiménez y cols, 1982).

Se ha podido demostrar que el bloqueo agudo del SRA descende la presión arterial en ratas hipertensas hipertiroides (García-Estañ y cols, 1995) y que, a largo plazo, la administración de captopril (que ya hemos mencionado anteriormente como inhibidor de la ECA), previene la hipertensión inducida por tiroxina (T4) (García del Río y cols, 1997). Por lo tanto, estos estudios indican que el SRA juega un papel importante en el incremento de la presión sanguínea del hipertiroidismo. La T4 acelera el curso de la hipertensión Goldblatt 2K-1C (modelo renina-dependiente) mientras que la producción simultánea (inducida experimentalmente) de un estado hipotiroideo, previene esta hipertensión (Vargas y cols, 1988). Esos datos sugieren que la hormona tiroidea modula el efecto presor del SRA. Sin embargo, la supresión de los niveles de hormona tiroidea no previenen la hipertensión 2K-1C en su fase establecida. Los efectos contradictorios del hipertiroidismo en la hipertensión establecida no se han explicado, aunque puede que involucren cambios morfológicos irreversibles en la pared vascular (Folkow, 1990).

Varios autores han descrito una estrecha relación entre los niveles de hormona tiroidea y el SRA en el desarrollo de hipertrofia cardíaca en el hipertiroidismo (Diniz y cols, 2007,2009; Kobori y cols, 1997,1999). Así, Kobori y cols, (1997, 1999) demostraron que la renina cardíaca, su ARNm y los niveles de ANG II, estaban todos incrementados en ratas tratadas con tiroxina de una manera independiente al sistema nervioso simpático y al SRA circulante, y que esos incrementos contribuían al desarrollo de la hipertrofia cardíaca. Además, la hipertrofia cardíaca inducida por la tiroxina es reducida por el bloqueo del receptor AT1 con losartan (Kobori y cols, 1997,1999). Sin embargo el inhibidor captopril, que es efectivo clínicamente para reducir la hipertrofia cardíaca en la hipertensión arterial esencial (Dunn y cols, 1984), inhibió el SRA circulante y redujo la presión sanguínea, pero

no impidió la hipertrofia cardíaca en ratas hipertiroideas tratadas con T4 (García del Río y cols, 1997).

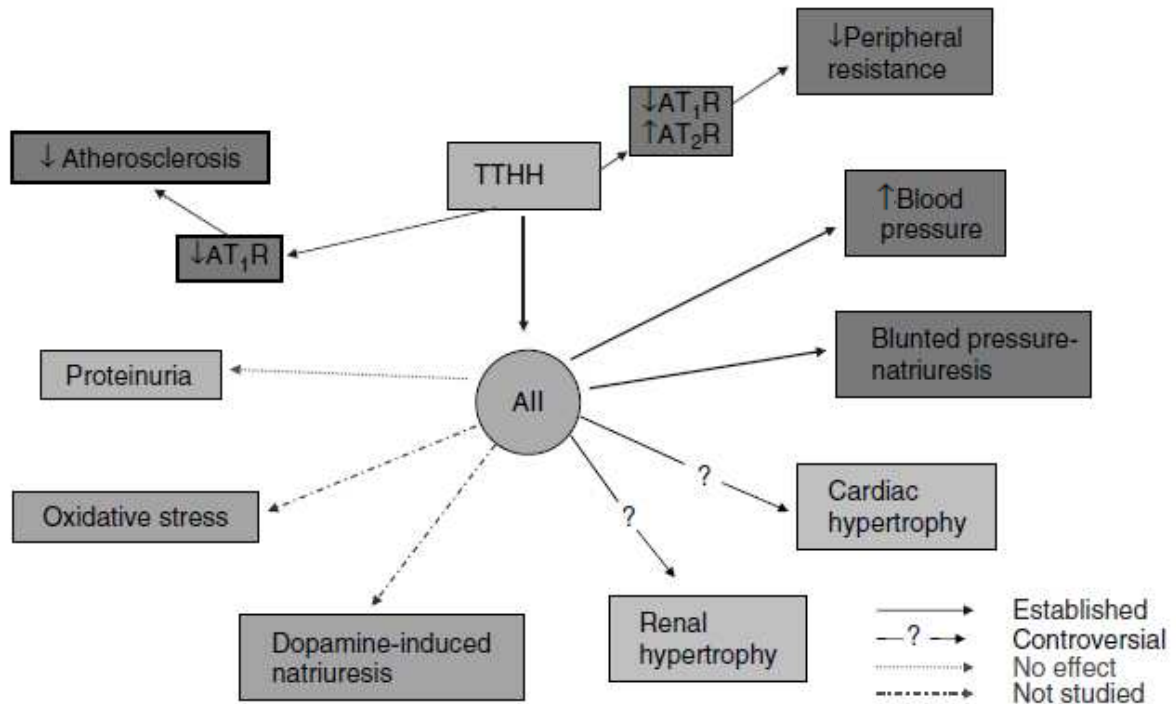


Fig. 12. Papel de las hormonas tiroideas y del SRA en las manifestaciones renales y cardiovasculares del exceso de hormona tiroidea. La figura resume la participación de ANG II en los efectos de la hormona tiroidea. Figura extraída de Vargas y cols, 2012b.

La mayoría de los síntomas y signos característicos de la enfermedad tiroidea resultan de los efectos de las hormonas tiroideas sobre el corazón y el sistema cardiovascular como ya hemos mencionado anteriormente. Las hormonas tiroideas interactúan con los sistemas involucrados en la regulación cardiovascular, como son:

- ✓ La actividad nerviosa simpática
- ✓ El sistema-renina-angiotensina
- ✓ La secreción de péptidos natriuréticos, vasopresina y la homeostasis renal.

Tanto el hipertiroidismo como el hipotiroidismo producen cambios en la contractilidad cardíaca, el consumo de oxígeno, el gasto cardíaco, la presión arterial y la resistencia vascular sistémica (Klein y cols, 2007; Klein y cols, 2001). Se ha podido demostrar que la hormona tiroidea induce a la aparición de hipertrofia cardíaca, la cual, está asociada con el sistema nervioso simpático y el SRA (Hu y cols, 2003). Es muy frecuente el hallazgo de la

hipertensión arterial tanto en el hipotiroidismo como en el hipertiroidismo, lo que sugiere la existencia de mecanismos diferentes en ambas condiciones (Fommei y cols, 2000; Marcisz y cols, 2001).

Por tanto, el SRA tiene gran importancia en el control de la presión arterial en interacción con las hormonas tiroideas (Vargas y cols, 2012b; Feldt-Rasmussen y cols, 2007). Además, se ha observado una relación directa entre los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas y los niveles de actividad plasmática de renina (APR), angiotensinógeno, ANG II y aldosterona (Ald) (Dzau y cols, 1982). También se ha podido comprobar que la terapia con L-tiroxina (T4) normaliza los niveles de APR, Ald y la función cardíaca en hipotiroideos (Ventura y cols, 2001). Los cambios en la actividad del SRA en presencia de disfunción tiroidea pueden ser mediados en parte por cambios producidos en la actividad adrenérgica en la corteza renal, ya que las hormonas tiroideas incrementan el número de receptores adrenérgicos (Vargas y cols, 1992). Si bien en el hipertiroidismo existe un efecto estimulador y en el hipotiroidismo un efecto inhibitorio sobre los componentes del SRA, no siempre las variaciones en los niveles de renina, angiotensinógeno y Ald ocurren en el mismo sentido (Jiménez y cols, 1988; Asmah y cols, 1997; Koukolis y cols, 2002; Marcisz y cols, 2011).

1.4.2. Hormonas tiroideas y angiogénesis

Las alteraciones del estado eutiroideo afectan a todos los sistemas fisiológicos, pero sus efectos sobre el sistema cardiovascular son especialmente pronunciados. Dichas alteraciones se acompañan de importantes cambios hemodinámicos y en la función cardíaca. Tanto en el ser humano como en modelos animales se observan disfunciones en la regulación de la presión arterial sistémica en el hiper- e hipotiroidismo. Normalmente, los cambios fisiopatológicos del hipertiroidismo son los opuestos a los que suceden en el hipotiroidismo. Así, el hipertiroidismo muestra una circulación hiperdinámica con mayor gasto cardíaco, frecuencia cardíaca, presión de pulso, y presión arterial, y disminuciones en la resistencia vascular periférica, mientras que en los estados hipotiroideos se observan disminuciones en el gasto cardíaco, en la frecuencia cardíaca, en la presión de pulso y en la presión arterial, y una resistencia periférica vascular aumentada (Vargas y cols, 2006; Larsen y cols, 1998; Klein y Ojamaa, 2001). Además, el hipertiroidismo acelera (Vargas y cols, 1988), mientras que el hipotiroidismo previene y revierte algunos modelos de hipertensión experimental, (Vargas y cols, 1988; Andrade y cols, 1992). El hipertiroidismo también está

asociado con aumentos en el volumen sanguíneo central, y lo contrario ocurre en el hipotiroidismo (Graettinger y cols, 1957; Graettinger y cols, 1959).

Una de las respuestas cardiovasculares más tempranas a la administración de hormonas tiroideas es la disminución en la resistencia vascular periférica (Vargas y cols, 2006; Larsen y cols, 1998; Klein y Ojamaa, 2001). Ésta ha sido observada en pacientes hipotiroideos y en animales eutiroideos tras la administración aguda de hormona tiroidea.

El hipertiroidismo puede acompañarse de una disminución de hasta un 50 % en la resistencia vascular sistémica (Celsing y cols, 1986). La resistencia vascular reducida podría ser secundaria a un incremento de la red vascular y/o a alteraciones en los mecanismos de control vascular, que favorecerían una mayor vasodilatación. Se ha visto que el hipertiroidismo está asociado con un gran número de capilares en los músculos de humanos (Celsing y cols, 1986) y de ratas (Capo y Sillau, 1983). Este aumento en la densidad capilar puede estar acompañado por un mayor número de vasos arteriales de resistencia, lo que daría lugar a la resistencia vascular reducida.

Por otra parte, las compensaciones en la función ventricular del hipertiroidismo pueden estar relacionadas con el crecimiento sustancial de microvasos coronarios que ha sido documentado en diversos estudios (Klein y Ojamaa, 2001; Vargas y cols, 1988; Andrade y cols, 1992; Graettinger y cols, 1957; Graettinger y cols, 1959). Según Zsotér y cols, 1994, la hipertrofia cardíaca inducida por la hormona tiroidea está asociada con un crecimiento proporcional de capilares y arteriolas, que da lugar al mantenimiento de la perfusión miocárdica máxima.

En resumen, diversos estudios han demostrado que la hipertrofia cardíaca inducida por T4 está acompañada de proliferación capilar que compensa totalmente e incluso excede la magnitud del engrosamiento ventricular y, por otra parte, las hormonas tiroideas producen aumentos en la red vascular periférica y en la densidad capilar, demostrando que estas hormonas pueden jugar un papel fundamental en los procesos angiogénicos. Gran parte de estas acciones angiogénicas de la hormona tiroidea parecen deberse a acciones no genómicas de la misma. El receptor de membrana para la T4 ha sido localizado en la integrina $\alpha_v\beta_3$ (Davis y cols, 2008), y la señal hormonal es transducida a través de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK; ERK 1/2), produciendo diversos eventos celulares, entre los cuales se encuentran la angiogénesis y la proliferación de células tumorales (Bergh y cols, 2005; Davis y cols, 2008).

También se ha demostrado que esta acción proangiogénica está mediada por FGF2 y que se bloquea cuando se administra un inhibidor de la vía MAPK, PD98059 (Davis y cols, 2004).

Diversos estudios epidemiológicos han sugerido que la hormona tiroidea promueve la aparición de varios tipos de cáncer. Por lo tanto, altos niveles de hormona tiroidea han sido asociados a un alto riesgo de cáncer de colon, pulmón, próstata y mama, además de estar también relacionados con el crecimiento del tumor (Hellevik y cols, 2009). Algunos estudios experimentales han demostrado que la hormona tiroidea puede estimular la proliferación celular en líneas celulares procedentes de cáncer de glándula pituitaria (Barrera-Hernández y cols, 1999), de mama (Hall y cols, 2008) y de próstata (Tsui y cols, 2008). En otro estudio, también se pudo comprobar que la hormona tiroidea ayudaba al desarrollo del cáncer en modelos implantados de tumores en ratones (Kumar y cols, 1979), mientras que en los ratones hipotiroideos se observó el efecto contrario. Además, el estado hipotiroideo incrementó la supervivencia de los ratones después de la implantación de células de adenocarcinoma mamario murino (Shoemaker y cols, 1976) e inhibió el crecimiento local y las metástasis de hepatomas en ratas (Mishkin y cols, 1981).

Theodossiou y cols (2000) también observaron que los ratones tratados con propiltiouracilo presentaban unos tumores significativamente más pequeños que los no tratados con dicho fármaco.

Asimismo, han sido demostradas anomalías en la producción de NO en los trastornos tiroideos (Vargas y cols, 2006; Carrillo-Sepúlveda y cols, 2010) y se ha comprobado que el NO es producido por las células tumorales y los tumores sólidos (Lind, 2004).

Aún no se conoce bien el papel que tiene el NO en el cáncer pero puede que influya en los procesos de iniciación del tumor, de aumento, de progresión, de adhesión células-tumor, de diferenciación, de inmunosupresión y/o de angiogénesis (Lind, 2004). La angiogénesis es un requerimiento esencial para el crecimiento del tumor. El NO promueve el crecimiento de nuevos vasos, ya que, por una parte, puede regular a diversos factores angiogénicos (Cianchi y cols, 2004) y, por otra parte, puede promover la proliferación de células vasculares (Schlossmann y cols, 2003). El efecto preventivo del bloqueo del NO ha sido demostrado en modelos de cáncer esofágico (Chen y cols, 2004) y mamario (Jadeski y

cols, 2003) en ratones. En cambio, se ha mostrado que el L-NAME promueve cambios preneoplásicos en el colon de ratas (Schleiffer y cols, 2000).

La actividad o expresión de las aminopeptidasas responsables del metabolismo de la ANG II (Ardaillou y Chansel, 1997), incluyendo la aminopeptidasa A (GluAp) (Nanus y cols, 1998) y la aminopeptidasa N (AlaAp) (Gullbo y cols, 2011), ha sido implicada en el desarrollo y vasculogénesis tumorales (Khakoo y cols, 2008). Esas aminopeptidasas son diferentes en varios tejidos de ratas con disfunción tiroidea (Segarra y cols, 2006) pero el papel modulador de la hormona tiroidea sobre la actividad aminopeptidásica en el desarrollo tumoral no se conoce aún.

En la presente tesis doctoral se pretende analizar la influencia del estado tiroideo y la interacción hormona tiroidea-NO sobre el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la actividad aminopeptidásica en un modelo de células de carcinoma de Lewis 3LL implantadas en ratones. Además, también examinamos los efectos sobre esas variables del tratamiento con tetrac (antagonista del receptor $\alpha\beta_3$ integrina) (Mousa y cols, 2008) y con aminoguanidina, un inhibidor in vitro (Griffiths y cols, 1993; Misko y cols, 1993) e in vivo (Ortiz y cols, 1996; Tan y cols, 2000) de la NOS inducible (iNOS).

1.5. El óxido nítrico como mediador de la angiogénesis

1.5.1. Óxido nítrico: síntesis y funciones

El óxido nítrico (NO) se sintetiza de forma enzimática por un grupo de enzimas denominadas **óxido nítrico sintasas (NOS)**. La NOS cataliza el paso de L-arginina a L-citrulina mediante un proceso oxidativo de la terminal nitrógeno-guanidín de la L-arginina, para el cual utiliza oxígeno molecular y NADPH, y en el que se libera NO (Fig. 13) (Ignarro, 2002).

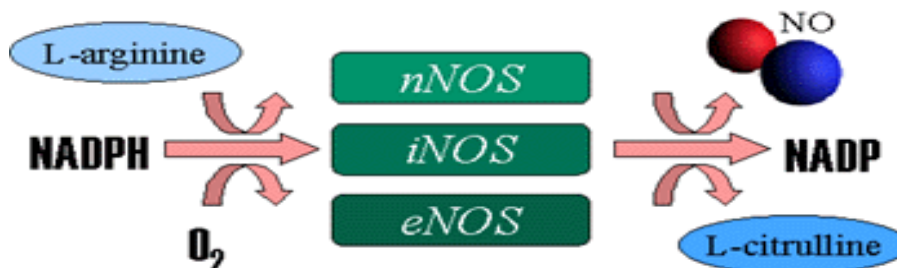


Fig. 13. Proceso de síntesis del óxido nítrico a través de sus 3 isoformas de óxido nítrico sintasa.

Extraído de la web www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/no/nos.html

Existen tres isoformas de NOS:

- **Neuronal (nNOS)**
- **Endotelial (eNOS)**,
- **Inducible (iNOS).**

Todas son flavoproteínas que contienen tetrahidrobiopterina (BH4) como cofactor, y un grupo hemo (Michel y Feron, 1997). En ausencia de BH4 o de sustrato, además de NO, producen anión superóxido, sobre todo la eNOS. El anión superóxido es generado por el dominio oxigenasa del enzima a través de la disociación de un complejo dioxígeno-ferroso que en condiciones normales es estabilizado por la BH4 (Vasquez-Vivar y cols, 1998). Sus distintas funciones son:

- El NO producido por la **eNOS** produce disminución de tono vascular y previene que leucocitos y plaquetas se adhieran a la pared vascular (Ignarro, 2002). Además, también se puede localizar en las células mesangiales.
- La **nNOS** se encarga de la producción de NO que actúa como neuromodulador o neuromediador en algunas neuronas centrales y en terminaciones nerviosas periféricas no colinérgicas.
- La isoforma **iNOS** da lugar a NO que participa en gran cantidad de fenómenos de la respuesta inflamatoria, tanto en macrófagos como en otras células (Michel y Feron, 1997).

Tanto la actividad de la nNOS como la actividad de la eNOS están controladas por los niveles intracelulares de calcio/calmodulina. Sin embargo, la producción de NO dependiente de iNOS es distinta de las otras dos isoformas, ya que produce de forma sostenida grandes cantidades de NO tóxico, mientras nNOS y eNOS dan lugar a NO en segundos con una actividad directa y corta.

Ante el estímulo que provoca una reacción inflamatoria, la cantidad de producción de NO aumenta a expensas de la iNOS, sobrepasando los niveles fisiológicos, derivados normalmente de la nNOS y la eNOS (Xie y Nathan, 1994). El NO se oxida a nitratos y nitritos. Por otra parte, el NO derivado de las células mieloides se une al anión superóxido, generado al mismo tiempo y por las mismas células, dando lugar a peroxinitritos (Channon y Guzik, 2002; Guzik y cols, 2002), oxidantes que median efectos tóxicos como daño al ADN, oxidación de LDL o formación de nitrotirosina (Ischiropoulos y Mehdi, 1995). La acción

fisiológica del NO producido por la iNOS, va encaminada al ataque y destrucción de agentes microbianos.

Las células productoras de cantidades tóxicas de NO no sufren sus efectos de degradación, pues parece ser que presentan mecanismos específicos de protección ante la formación de dicho NO tóxico. Esto es debido a que los macrófagos protegerían a las células del NO procedente de la iNOS, gracias al sistema del glutatión (GSH-GSSG) (Coleman, 2001) (Fig. 14).

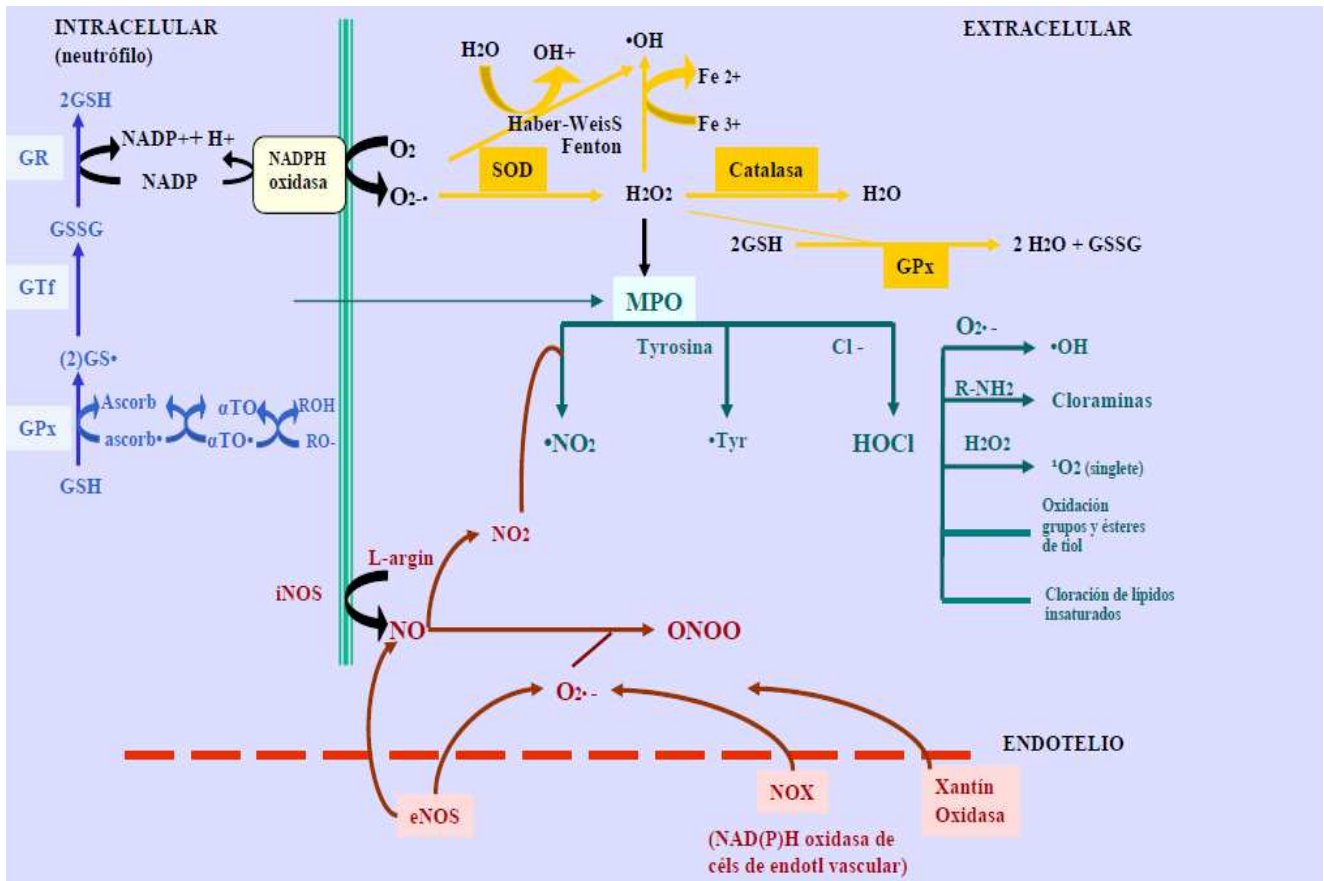


Fig. 14. Principales reacciones oxidativas tanto a nivel intracelular como a nivel extracelular. Esquema extraído de tesis doctoral titulada "Parámetros de estrés oxidativo en trasplante renal y efecto modulador de atorvastatina y n-acetilcisteína" realizada por M^a Carmen Ruiz Fuentes.

1.5.2. El óxido nítrico como factor angiogénico

Existen pruebas considerables de que una angiogénesis eficaz requiere la síntesis del NO derivado del endotelio.

En primer lugar, un gran número de factores angiogénicos inducen la expresión de eNOS y estimulan la liberación del NO a partir del endotelio. El VEGF incrementa la expresión de eNOS y estimula la biosíntesis del NO en células endoteliales venosas umbilicales humanas cultivadas (HUVECs) (Hood y cols, 1998; Van der Zee y cols 1997). Observaciones similares se han hecho en segmentos vasculares de la aorta torácica en conejo, donde el VEGF estimula la producción del NO. En este modelo, la pre-incubación con L-arginina incrementa dos veces la liberación basal de NO y la estimulada por VEGF (Simon y cols, 1990). De igual manera, las células endoteliales también producen más NO cuando el estímulo angiogénico es el factor de crecimiento TGF β o el factor de crecimiento fibroblástico (bFGF), (Inoue y cols, 1995; Tiefenbacher y cols, 1997).

La liberación de NO por factores angiogénicos parece jugar un papel esencial en sus efectos. Las células endoteliales venosas umbilicales humanas en un gel tridimensional producen NO y forman estructuras similares a los capilares cuando son estimuladas por bFGF o TGF β . La formación de capilares inducida por esos factores de crecimiento se ve bloqueada por inhibidores de la NOS, como el L-NAME (Babaei y cols, 1998; Papapetropoulos y cols, 1997). De igual modo, la inhibición de la NOS suprime los efectos angiogénicos del TGF β in vitro (Papapetropoulos y cols, 1997; Ziche y cols, 1994). En un modelo angiogénico de córnea de conejo, la angiogénesis inducida por VEGF es bloqueada por L-NAME (Ziche y cols, 1997).

Estos estudios indican que el NO es un mediador fundamental de la angiogénesis. Parece que el NO tiene múltiples efectos sobre los procesos angiogénicos. El NO es un factor de supervivencia endotelial, inhibiendo la apoptosis (Dimmeler y cols, 1999; Rossing y cols, 1999) e incrementando la proliferación de células endoteliales (Morbidei y cols, 1996; Ziche y cols, 1997). Además, el NO mejora la migración endotelial (Ziche y cols, 1994; Murohara y cols, 1998). El efecto del NO para estimular la migración de las células endoteliales puede que sea debido a la activación de la podoquinesis (Noiri y cols, 1998). Por otra parte, el NO mejora la interacción matriz-célula endotelial induciendo la expresión

de $\alpha_v\beta_3$ (Murohara y cols, 1998) (el ligando para la proteína Del-1 de la matriz extracelular, el cual es conocido por inducir la angiogénesis) y/o incrementando la descomposición de la matriz extracelular a través del aumento de bFGF inducido por un activador del plasminógeno tipo uroquinasa (Ziche y cols, 1997).

Además, los efectos vasodilatadores del NO puede que juegen un papel en sus efectos angiogénicos. Se ha observado que el incremento en el flujo sanguíneo inducido por prazosín en la microcirculación esquelética incrementa la proliferación de las células endoteliales como indica la absorción de bromodeoxiuridina por células endoteliales capilares (Hudlicka, 1998). Es por lo tanto posible que además de sus efectos directos sobre la proliferación de las células endoteliales, el NO pueda influenciar el crecimiento endotelial indirectamente incrementando el flujo local de sangre.

Por último, debería ser mencionado que el NO puede inducir la síntesis y liberación de VEGF de las células vasculares (Dulak y cols, 2000) en un mecanismo de retroalimentación positiva que puede aumentar la respuesta angiogénica.

1.5.3. Óxido nítrico en la disfunción tiroidea

Se han demostrado aumentos en la actividad de la NOS en tejidos relacionados con el control de la presión sanguínea en la rata hipertiroidea (Quesada y cols., 2002).

El mecanismo responsable del aumento de la actividad de la NOS en ratas hipertiroideas no se conoce y varios factores podrían participar:

- a) En primer lugar, este hecho podría deberse a un efecto directo de las hormonas tiroideas como se ha podido comprobar en un estudio en el que se observó una estimulación de la actividad NOS en sinaptosomas preparados a partir de la corteza cerebral de ratas (Chakrabarti y Ray, 2000).
- b) La actividad de la NOS también puede estar aumentada en respuesta a la elevada presión sanguínea en estos animales (Vaziri y cols, 1998), o a la liberación aumentada de sustancias vasoactivas como la ANG II (Henington y cols, 1998) o la endotelina (Hirata y cols, 1995), que incrementan la producción de NO y están aumentadas en ratas hipertiroideas.

- c) Por último, también puede participar el mecanismo del estrés de rozamiento inducido por la circulación hiperdinámica. El estrés de rozamiento regula la expresión de la NOS (Xiao y cols, 1997).

La actividad de la NOS en los tejidos de ratas hipotiroideas muestra un patrón heterogéneo, lo cual es difícil de conciliar con una explicación común, aunque puede ser el resultado de cambios en la expresión de las diferentes isoformas de la NOS (Quesada y cols, 2002). De hecho, se ha demostrado que la NOS mitocondrial del músculo esquelético y del hígado está aumentada, mientras que en los tejidos neuronales, el hipotiroidismo se asocia a una reducción de la actividad de la NOS (Ueta y cols, 1995).

Debido a la importancia del NO en el control del tono vascular (Moncada y cols, 1991), el aumento y la disminución de la actividad de la NOS en la aorta de ratas hiper e hipotiroideas respectivamente, puede jugar un papel en los cambios en la resistencia vascular periférica total (RPT). Se sabe que la administración aguda o crónica de inhibidores de la NOS aumenta la presión arterial sistémica. Muchos estudios (Fernández y cols, 1997) proporcionan evidencia de que en ratas hipertiroideas, existe un aumento en la producción de NO. La respuesta presora que tiene un bloqueante de la NOS (el L-NAME) en ratas hipertiroideas puede ser secundaria a una producción aumentada de NO, que puede tener un importante papel homeostático en estos animales (Rodríguez-Gómez y cols., 2005).

Como el NO puede ser generado por la actividad neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS) y estas isoformas de la NOS están ampliamente distribuidas en los órganos relacionados con el control de la presión arterial, nuestro grupo de investigación ha estudiado los efectos de la inhibición crónica de las isoenzimas de NOS a largo plazo en ratas eutiroideas, hipertiroideas e hipotiroideas.

Para ello, se utilizó **aminoguanidina** (AG). La AG es un inhibidor selectivo de la iNOS (*Fig. 15*) in vitro (Griffiths y cols, 1993) e in vivo (Mattson y cols, 1998). Los niveles plasmáticos elevados de nitratos y nitritos (índice de la producción de NO) en los animales con hipertiroidismo disminuyen con la administración de la droga, lo que indica que su efecto presor se relaciona con la inhibición de la producción de NO. Debido a que se ha demostrado que la AG inhibe la iNOS (Griffiths y cols, 1993; Mattson y cols, 1998), estos resultados indican que la isoforma inducible se activa en los animales con hipertiroidismo.

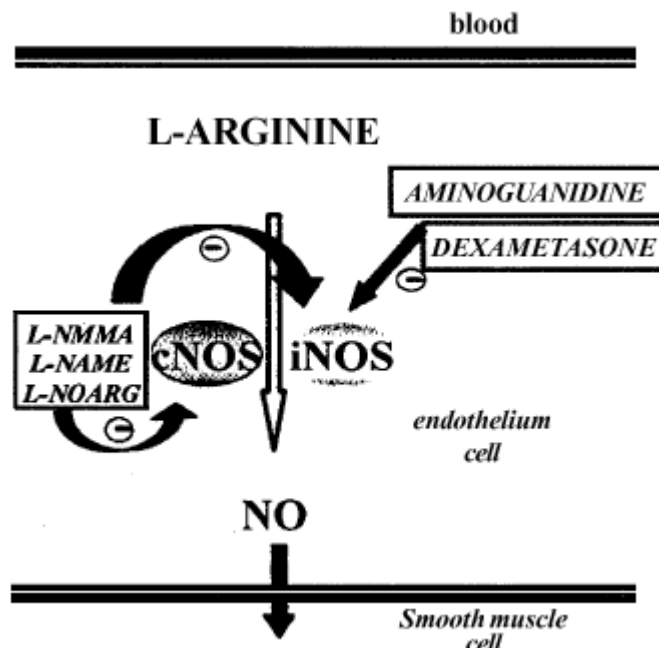


Fig. 15. Inhibidores de la óxido nítrico sintetasa (NOS).

1.6. Estrés oxidativo y crecimiento tumoral

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. En términos químicos, el estrés oxidativo es un gran aumento del potencial de oxidación-reducción (potencial redox) celular o una gran disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares como el glutatión. El estrés oxidativo severo puede causar la muerte celular y aún una oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis, mientras que si es muy intensa puede provocar la necrosis.

1.6.1. Estrés oxidativo y radicales libres

1.6.1.1. Estrés oxidativo y radicales libres

Los principales agentes oxidantes son los radicales libres, generados en las células por la utilización del oxígeno. Se puede definir un **radical libre** como cualquier molécula o átomo que contenga uno o más electrones desapareados en su orbital más externo, derivados del oxígeno molecular o también conocidos como ROS.

El oxígeno en su estado basal es un birradical con dos electrones en su órbita externa (estado triplete). Debido a que los dos electrones tienen el mismo espín, el oxígeno solo puede reaccionar con un electrón, y esto lo hace poco reactivo. Sin embargo si uno de los dos electrones desapareados se estimula y cambia de espín, la molécula que resulta es el oxígeno singlete, que es un potente oxidante, y los dos electrones con espines antiparalelos pueden reaccionar con otros pares de electrones, aunque esta molécula no se considera importante como iniciadora de daño oxidativo.

En condiciones fisiológicas existe un balance entre la formación de ROS y antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. El **estrés oxidativo** es un conjunto de procesos derivados del desequilibrio entre la formación aumentada de ROS y/o una capacidad antioxidante disminuida (Turrens, 2003). Niveles bajos de ROS pueden ser necesarios en gran cantidad de procesos, entre los que encontramos mecanismos de señalización intracelular, inmunitarios, defensa antimicrobiana, proliferación o apoptosis.

1.6.1.2. Especies reactivas del oxígeno (ROS)

A continuación, se detallará cada una de las ROS:

➤ **Anión superóxido**

Una gran parte de los radicales libres van a derivar del **anión superóxido** (O_2^-). Este anión es producido de forma fisiológica en pequeña cantidad en la mitocondria, pero ante determinados estímulos, la producción puede aumentar a expensas de la enzima Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Oxidasa (NADPH oxidasa; NOX), principal fuente de producción del O_2^- en fagocitos y tejido vascular.

Existe otro tipo de NADPH oxidasa no fagocítica, o constitutiva, como es el caso de la NOX del endotelio vascular, en la que estímulos como la ANG II o hiperglucemia produzcan el aumento de expresión de la enzima y determinen el aumento de producción de ROS.

Las fuentes principales de anión superóxido son:

No Enzimáticas	Enzimáticas
Mitocondrias	Fagocitos del sistema inmune
	Endotelio vascular
	Oxigenasas citocromo P450
	Xantin deshidrogenasa

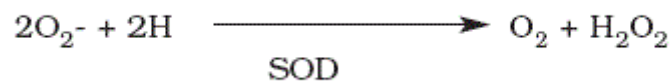
Tabla 2. Clasificación de las principales fuentes de anión superóxido.

- **Mitocondrias:** son las responsables de más del 90% del consumo de oxígeno en la célula, y en ellas encontramos la vía monovalente de reducción del oxígeno. Las zonas donde se forma el O_2^- son: la membrana externa de la mitocondria, en la matriz y en ambos lados de la membrana mitocondrial interna (Turrens, 2003).
- **Fagocitos del sistema inmune:** aumentan el consumo de oxígeno frente a un estímulo, principalmente en la membrana plasmática, donde la enzima NADPH oxidasa (Babior y cols, 2002) produce, a expensas de electrones de la vía de las pentosas y oxígeno basal, radicales libres de oxígeno.
- **Endotelio vascular:** mediante la NADPH oxidasa del endotelio (Babior, 2000).
- **Oxigenasas citocromo P450** dependientes (Coon y cols, 1992).
- La conversión proteolítica de la **xantin deshidrogenasa** a xantin oxidasa genera cantidades notables de O_2^- y peróxido de hidrógeno (Yokohama y cols, 1990).

Las ROS van a actuar sobre macromoléculas, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, provocando una reacción en cadena en la que especies intermedias pueden actuar a su vez como agentes oxidantes.

➤ **Enzima superóxidodismutasa**

El O_2^- es transformado rápidamente en **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2) mediante la enzima superóxidodismutasa (SOD). Las SOD constituyen la primera línea de defensa contra el daño oxidativo.



Se han podido describir tres isoformas diferentes, pertenecientes a de dicha enzima:

1) *Cobre-Zinc SOD* (Cu-Zn SOD), presente en el citoplasma, dimérica y peso molecular 30 kDa.

2) *Manganeso-SOD* (Mn SOD) presente en la mitocondria, producida en la matriz y en la cara interna de la membrana interna mitocondrial, tetramérica y pm 80kDa (Fridovich, 1995).

3) *SOD Extracelular* (ECSOD) que se encuentra en el intersticio, plasma, linfa y líquido sinovial, dimérica (Vaziri y cols, 2003).

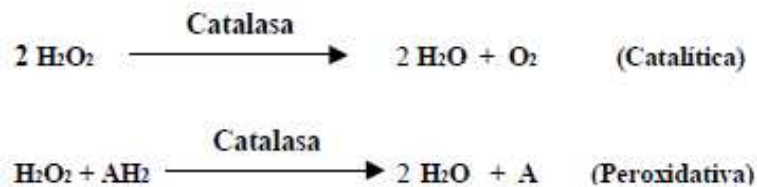
En la reacción, una molécula de superóxido se oxida dando lugar a O_2 molecular, mientras que otra se reduce para dar lugar a H_2O_2 .

➤ **Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)**

Una vez formado el H_2O_2 , gracias a la SOD, esta molécula oxidante (que no radical libre) puede tener 4 destinos diferentes:

1. Metabolización a oxígeno y agua. Esta reacción está catalizada por la enzima **catalasa**, la cual es una hemoenzima tetramérica con 4 grupos ferroporfirínicos por molécula, que realizan el intercambio redox (Matés y cols, 1999). Se encuentra en los peroxisomas y está presente también en la mitocondria cardíaca (Turrens, 2003). Es la enzima más detoxificante para la eliminación de H_2O_2 cuando la concentración está aumentada.

Interviene en dos tipos de reacciones: una *catalítica*, en la que una molécula de H₂O₂ se oxida a oxígeno, y la otra se reduce a dos moléculas de agua; y otra *peroxidativa*, en la que una molécula de H₂O₂ se convierte en agua valiéndose de un sustrato no específico portador de hidrógeno como reductor (metanol, etanol, ácido fórmico,...) (Matés y cols, 1999).



2. Vía Glutacion. **Glutacion** es un tripéptido de ácido glutámico, cisteína y glicocola (Barja de Quiroga, 1998) el cual participa en una gran cantidad de procesos metabólicos, de transporte y detoxificación. Podemos encontrarla en forma oxidada (GSSG) y reducida (GSH), y sus acciones forman parte de la protección del organismo frente al daño oxidativo.

Una de las enzimas peroxidasa más importantes en este punto, es la **glutacion peroxidasa** (GPx), la cual cataliza la reducción de gran cantidad de hidroperóxidos (ROOH) y H₂O₂ usando glutacion reducido (GSH) (Matés y cols 1999).

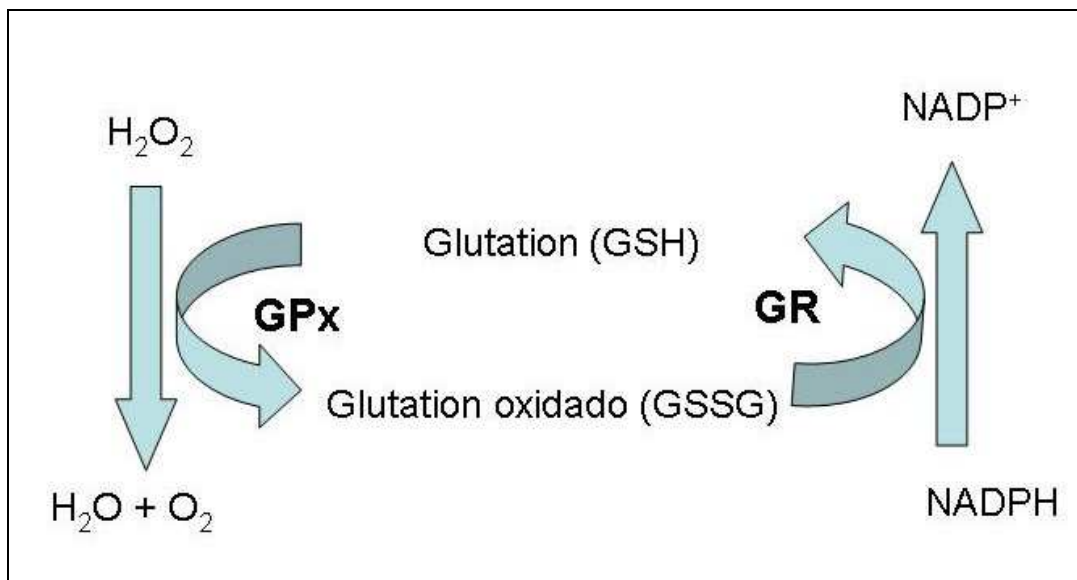


Fig. 16. Sistema antioxidante GPx/GR. GPx: Glutacion peroxidasa. GR: Glutacion reductasa. (Figura extraída de la tesis doctoral titulada: Mecanismos implicados en la hipertensión arterial inducida por estrés oxidativo: interacciones con otros factores patogénicos. Yolanda Baca Morilla.

Se describen cuatro isoenzimas de GPx que son:

- *GPx citosólica y mitocondrial* (cGPx) que reduce peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos (Matés y cols, 1999).
- *GPx fosfolipídica* (PLGPx): capaz de reducir hidroperóxidos fosfolipídicos (Ursini y cols, 1985, 1999).
- *GPx extracelular* (eGPx): Reduce hidroperóxidos orgánicos, hidroperóxidos fosfolipídicos y peróxido de hidrógeno (Matés y cols, 1999).
- *GPx gastrointestinal* (giGPx): se encuentra en células epiteliales del tracto gastrointestinal, con propiedades similares a cGPx (Chu y Esworthy, 1995).

Todas ellas comparten como características comunes tal como describe Rotruck y cols, 1973:

- Actividad enzimática dependiente de selenio.
- Residuo de selenocisteína que se inserta durante la traslación proteica y que da lugar a la actividad enzimática.
- Reacción enzimática en la que el selenio (que compone la selenocisteina) reduce los peróxidos.
- Oxidación de selenio seguida de una reducción mediada por el glutatión.

El ciclo del glutatión es una gran fuente de protección contra bajos niveles de estrés oxidativo, mientras la catalasa protege en mayor grado frente a daño oxidativo severo (Yan y Harding, 1997). La enzima catalasa tiene mucha menor afinidad por el peróxido de hidrógeno que la GPx (Izawa y cols, 1996), por lo que son adecuadas para eliminar concentraciones pequeñas de esta molécula.

3. A Través de la reacción de Fenton-Haber Weiss, en presencia de hierro, da lugar a una molécula de radical hidroxilo.

4. Mieloperoxidasa leucocitaria. La enzima mieloperoxidasa (MPO) es una hemoproteína compuesta por dos protómeros, cada uno de los cuales posee una subunidad pesada protoporfirínica de 59-64 kDa, y otra ligera de 14 kDa (Nauseef y Malech, 1986). Está presente en neutrófilos y monocitos. La activación fagocitaria y la secreción de MPO se acompaña de un aumento en la formación de O_2^- , a partir de la NADPH oxidasa, y en el siguiente paso, del H_2O_2 .

La MPO amplifica el potencial oxidante del H₂O₂ y lo utiliza como co-sustrato en la formación de oxidantes a través de un ciclo peroxidasa (Babior, 1978).

La actividad de la MPO está regulada por:

- ✓ La producción de O₂⁻.
- ✓ La disponibilidad de H₂O₂ y otros co-sustratos (Klebanoff y Clark, 1978; Kettle y Winterbourn, 1997).
- ✓ La concentración de antioxidantes (Kettle y Winterbourn, 1997; Márquez y cols, 1990).
- ✓ La presencia de NO (Abu-Soud y Hazen, 2000), participante en la cadena de procesos inflamatorios y en proceso de angiogénesis tumoral.

1.6.2. Estrés oxidativo en el hipertiroidismo

Algunos estudios, muestran evidencias de que el hipertiroidismo tanto en humanos como en animales, cursa con un incremento del estrés oxidativo (Venditti y cols, 1997; Tapia y cols, 1999; Sewerynek y cols, 2000; Fernández y cols, 2002; Moreno y cols, 2005; Moreno y cols, 2008).

Las hormonas tiroideas desempeñan un papel esencial en el metabolismo energético del organismo. El desarrollo de un estado hipertiroideo en mamíferos conduce a un aumento significativo de su metabolismo basal lo que lleva a un aumento en el consumo total de oxígeno de los tejidos, efecto conocido como calorigénesis tiroidea.

La inducción del hipertiroidismo experimental en la rata produce incrementos en la actividad de enzimas hepáticas involucradas en procesos de oxidación-reducción. A nivel mitocondrial, microsomal y peroxisomal, aumenta la generación de ROS, como el O₂⁻ y/o el H₂O₂, y a nivel citoplasmático aumenta la generación de NO, favoreciendo así el proceso de angiogénesis y proliferación tumoral (Fernández y cols, 1997; Tapia y cols, 1999).

Además, en el hipertiroidismo se produce un descenso en la actividad hepática de la SOD, CAT (catalasa) y GSH (Fernández y cols, 2002). El desequilibrio entre los factores pro-oxidantes y antioxidantes es lo que realmente da lugar al estrés oxidativo en el hígado (Venditti y cols, 1997).

Por otra parte, se ha demostrado recientemente que las ROS participan en la hemodinámica renal y en la excreción de sodio (Zhou y cols, 2002), y que la administración de T3 (triyodotironina) aumenta la concentración intracelular de superóxido a nivel medular renal y en el asa gruesa en las ratas Sprague-Dawley (Mori y cols, 2004). Las ratas tratadas con T4, tienen una reducción significativa de la actividad de la SOD en el cortex renal y en los ventrículos cardíacos (Moreno y cols, 2005). Estos hallazgos indican que la deficiencia cuantitativa de SOD intracelular en ratas hipertiroideas podría producir un aumento del estrés oxidativo renal y cardiovascular. En este contexto, Gredilla y cols, (2001) demostraron que la administración crónica de T4 durante 5 semanas induce daño oxidativo lipídico, del glutathion y en el DNA en el corazón del ratón.

Se ha demostrado una reducción de la actividad del CAT en el hígado (Giavarotti y cols, 1998), músculo cardíaco (Asayama y cols, 1989), en el riñón (Sawant y cols, 2003) y en el ventrículo izquierdo de ratas hipertiroideas, pero se encontró elevada en la corteza y en la médula renal (Moreno y cols, 2005). La actividad de GPX y de GR (glutathion reductasa) está reducida por la administración de T4 excepto en la médula renal. También se ha demostrado una reducción en la actividad de GPX en el hígado (Seymen y cols, 2004), corazón (Asayama y cols, 1989), y musculo esquelético (Seymen y cols, 1999) de ratas tratadas con T4. Por otro lado, Sawant y cols (2003) demostraron un aumento de la actividad de GPX en el riñón de ratas hipertiroideas. En general, estas observaciones sugieren que el estrés oxidativo en el hipertiroidismo podría ser debido a la regulación a la baja de enzimas antioxidantes y este descenso podría determinar una reducida inactivación del radical superóxido, como se indica por el aumento de la excreción urinaria de isoprostanos F2 α en orina de 24 horas y en los niveles plasmáticos de malondialdehído (MDA) en pacientes y en ratas tratadas con T4 (Moreno y cols, 2005; Kim y cols, 2004; Sewerynek y cols, 2000; Venditti y cols, 1997). La administración crónica de tempol atenúa el desarrollo de hipertensión en ratas hipertiroideas (Moreno y cols, 2005), y reduce en plasma el MDA y la excreción total urinaria de isoprostanos F2 α . Estos resultados indican que el hipertiroidismo está asociado con reducción de la actividad enzimática antioxidante en tejidos renales y cardíacos y sugiere que el estrés oxidativo participa en la hipertensión inducida por T4.

1.6.3. Estrés oxidativo, angiogénesis y crecimiento tumoral

En determinadas circunstancias patológicas, el proceso de angiogénesis no es beneficioso para el organismo. Esta situación se presenta en la proliferación tumoral.

Los tumores de rápido crecimiento (tumores malignos), requieren de un aporte sanguíneo de mayor régimen que el tejido normal. Por estas razones el proceso de neovascularización o angiogénesis es un fenómeno hallado en estos procesos. Dentro de los mecanismos de señales que inducen angiogénesis, podrían incluirse **los radicales libres del oxígeno**. Así, se ha comprobado que mediante la administración de un antioxidante vegetal a ratones con adenocarcinoma mamario de alta tendencia metastásica, se logró reducir en un 50% la presencia de nódulos pulmonares (Monte y cols, 1995). Además, se observó una franca reducción de la angiogénesis en el tejido tumoral de los animales tratados, y se comprobó que el aumento de radicales libres promovía el desarrollo de la angiogénesis in vitro (Monte y cols, 1994). En otros estudios (Safford y cols, 1994), habiéndose observado que ciertas células tumorales poseen una baja actividad de la SOD, transfectaron células de un fibrosarcoma (que expresaba bajos niveles de esta enzima) con el gen de Mn-SOD expresándose en forma activa. El resultado fue una total supresión de la incidencia metastásica con respecto a las células del fibrosarcoma sin el tratamiento.

Los antioxidantes son ampliamente usados para proteger a las células del daño por estrés oxidativo inducido. La creencia de que los antioxidantes protegen contra el desarrollo del cáncer, está sostenida y ha sido apoyada por estudios celulares y preclínicos (Irani y cols, 1997; Sablina y cols, 2005; Vafa y cols, 2002). Sin embargo, existen datos experimentales y ensayos clínicos que sugieren que los antioxidantes, incluso no estando relacionados estructuralmente, como es el caso de las isoflavonas, los carotenos, las vitaminas y la NAC (N-acetilcisteína) no deberían ser recomendados para la prevención del cáncer de pulmón y pueden incluso incrementar el riesgo de cáncer y promover el crecimiento tumoral (Watson, 2013; Allred y cols, 2001; Cortés-Jofré y cols, 2012; Robinson y cols, 2012). Otro ensayo más reciente sobre la utilización de la vitamina E y del selenio para la prevención de cáncer de próstata fue detenido cuando se encontró que el cáncer de próstata era más frecuente en los grupos de ratones tratados con vitamina E que en los grupos control (Klein y cols, 2011). Además, en un reciente estudio llevado a cabo por Sayin y cols (Sayin y cols, 2014) se encontró que existía una asociación entre la suplementación dietética con los antioxidantes NAC y vitamina E y la aparición de mutaciones, junto con un aumento en el riesgo de cáncer de pulmón y del crecimiento tumoral en ratones. Además, la

suplementación dietética con antioxidantes indujo el desarrollo de tumores de pulmón más numerosos y agresivos que redujeron la supervivencia de los animales a la mitad.

La proteína supresora de tumores p53 está inactivada a menudo en el cáncer (Sablina y cols, 2005) y se ha encontrado que los antioxidantes aceleran el crecimiento tumoral porque alteran la unión entre las especies de oxígeno reactivo y la proteína p53 (Sayin y cols, 2014). Otros estudios han demostrado que los oncogenes como K-RAS y B´RAF, promueven el crecimiento tumoral por estimular la transcripción mediada por NRF2 de genes antioxidantes endógenos (Singh y cols, 2008; DeNicola y cols, 2011).

La administración oral del pro-oxidante butionina-sulfoximina (BSO), inhibe selectivamente a la γ -glutamylcisteína sintasa, una enzima del metabolismo biosintético del glutatión, produciendo la depleción del glutatión e incrementando el estrés oxidativo (Vaziri y cols, 2000; Rodríguez-Gómez, 2010). La administración de BSO a los ratones les produce hipertensión (Vaziri y cols, 2000; Rodríguez-Gómez, 2010) junto con anormalidades en la reactividad vascular, en la actividad del sistema renina-angiotensina y en la actividad simpática (Vargas F y cols, 2012a). No obstante, los efectos potenciales del BSO sobre el crecimiento tumoral, aún no han sido estudiados en profundidad.

El ácido tetrayodotiroacético (tetrac) es una hormona tiroidea análoga que inhibe al receptor $\alpha\beta 3$ integrina el cual posee un dominio para las yodotironinas. Este receptor también está conectado con los receptores de los agentes proangiogénicos que promueven el crecimiento del tumor (Masson-Gadais y cols, 2003; Sahni y cols, 2004), cuya actividad es bloqueada por el tetrac (Mousa y cols, 2008). El tratamiento diario con tetrac reduce el crecimiento del tumor en modelos murinos (Yalcin y cols, 2010), y se asocia con una reducción de la neovascularización medida a través del contenido de Hb tisular del tumor.

En base a estos antecedentes, en esta tesis también se tratará de analizar la influencia del pro-oxidante BSO sobre el crecimiento de tumores inducidos en ratones mediante la administración subcutánea de células de carcinoma de Lewis 3LL, así como los efectos de la interacción entre el BSO y el tetrac, con el objetivo de comprobar si la administración simultánea de ambas sustancias reduce marcadamente el crecimiento del tumor y la angiogénesis en este modelo.

OBJETIVOS

2. Objetivos

El estudio de los procesos de angiogénesis está siendo de gran importancia en la actualidad, especialmente en el campo de la oncología y la terapia antitumoral.

De los antecedentes expuestos en el apartado anterior podemos deducir que las hormonas tiroideas cumplen un importante papel en el control de los procesos angiogénicos, estimulando la proliferación capilar y la producción de diversos factores implicados en la angiogénesis. Por otra parte, el NO juega un papel primordial como promotor de la angiogénesis y puede modificar las acciones de los factores angiogénicos.

Aunque se han realizado trabajos en los que se describe una activación de diversas isoenzimas de la NOS por parte de la hormona tiroidea, no existen estudios previos sobre la posible interacción entre las hormonas tiroideas y el NO en los procesos angiogénicos, y del papel que puedan jugar ambos a la hora de modular la acción de los distintos factores de angiogénesis.

La hipótesis principal de la que parte nuestra investigación es que el NO podría participar como mediador de la acción angiogénica de la hormona tiroidea, facilitando la permeabilidad vascular y la vasodilatación, y modulando la actividad de los mediadores angiogénicos.

También pretendemos analizar si la administración de fármacos inhibidores del NO o bloqueantes de la acción hormonal pueden frenar el desarrollo de tumores en modelos animales y cuál es el efecto del estrés oxidativo sobre el crecimiento tumoral.

Por tanto, el objetivo general de esta tesis es analizar el papel que juega tanto el NO como el estrés oxidativo en el proceso angiogénico inducido por la hormona tiroidea. Dentro de este objetivo general se pueden distinguir los siguientes objetivos concretos:

- 1) Estudiar el efecto de la administración de hormona tiroidea y de su disminución sobre el crecimiento de tumores inducidos en ratones mediante la administración subcutánea de células de carcinoma de Lewis 3LL, analizando la cantidad de hemoglobina presente en el tumor, la actividad tisular de enzimas aminopeptidásicas y otros factores angiogénicos, y su relación con el tamaño del tumor.

- 2) Analizar si la administración crónica de bloqueantes de la señal hormonal y/o inhibidores de la producción de NO provoca disminuciones en la proliferación y desarrollo de dichos tumores, así como en los índices de angiogénesis descritos en el objetivo anterior.
- 3) Investigar el efecto de la administración de butionina-sulfoximina (BSO), sustancia prooxidante que disminuye la disponibilidad de glutathione, sobre el crecimiento y desarrollo tumoral, y dilucidar cuáles son los mecanismos que pueden estar implicados en dicho efecto.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Efecto de la interacción hormona tiroidea-óxido nítrico sobre el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la actividad aminopeptidásica en ratones

3.1.1. Efecto de la hormona tiroidea sobre el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la actividad aminopeptidásica en ratones

En el grupo de ratones tratado con T_4 se observó un aumento significativo en el peso del tumor que no iba acompañado de alteraciones en la concentración de hemoglobina, ni en la cantidad de hemoglobina total del tumor, la cual se encontraba ligeramente aumentada sin que este cambio fuera significativo estadísticamente.

Por el contrario, se encontraron disminuciones que no fueron estadísticamente significativas con respecto al grupo control en el peso del tumor, la concentración de hemoglobina y la cantidad de hemoglobina total en los ratones hipotiroideos tratados con metimazol. Por otro lado, los tumores de los ratones hipertiroideos tratados con T_4 , mostraron una tendencia a la reducción de la actividad aminopeptidásica, mientras que los tumores de ratones hipotiroideos mostraron un incremento significativo en las tres actividades aminopeptidásicas analizadas. Este incremento de la actividad aminopeptidásica podría jugar un importante papel contra el desarrollo del tumor.

La expresión de VEGF en el tumor se encontraba aumentada en los ratones tratados con T_4 en comparación con los ratones del grupo control, pero no se encontraron diferencias significativas en el grupo de ratones hipotiroideos con respecto al grupo control. Esto sugiere que la T_4 promueve el desarrollo del tumor junto con un incremento proporcional en la neovascularización del mismo y en la expresión del factor angiogénico VEGF. Hay poca evidencia de que la hormona tiroidea sea oncogénica, pero podría potenciar a otros factores como la angiotensina II (Deshayes y Nahmias, 2005) o el NO (Frank y cols, 1999), que se encuentran aumentados en el estado hipertiroideo (Vargas y cols, 2006), y que podrían contribuir al incremento en los niveles de VEGF en los ratones tratados con T_4 .

3.1.2. Efecto del bloqueo de la NOS sobre el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la actividad aminopeptidásica en ratones

En el grupo de ratones control, el tratamiento con L-NAME produjo una reducción tanto en el peso del tumor como en el contenido de hemoglobina total, pero no se observó ningún cambio significativo en la concentración de hemoglobina y hubo una ligera reducción de la actividad aminopeptidásica que no llegó a ser significativa estadísticamente. Esto sugiere que la inhibición del NO afecta al crecimiento y a la vascularización del tumor de una manera similar.

Por otro lado, en el grupo de ratones tratados con T₄+L-NAME se observó una reducción en el peso del tumor con respecto a los ratones hipertiroideos que no fueron tratados con L-NAME, sin ninguna variación de importancia en la concentración de hemoglobina ni en el contenido total de ésta, y además se encontró un marcado incremento de la actividad aminopeptidásica en dichos tumores. Estos resultados indican que la inhibición del NO también afecta proporcionalmente al peso y a la neovascularización del tumor en los ratones tratados con T₄, lo cual concuerda con otros estudios ya realizados donde queda reflejado que el NO promueve el crecimiento tumoral a través de la estimulación de la angiogénesis tumoral y que el L-NAME inhibe la angiogénesis inducida por el tumor (Jadeski y cols, 2000).

Sin embargo, los animales tratados con metimazol+L-NAME mostraron una reducción similar en el peso del tumor a la observada en el grupo tratado con L-NAME y una reducción en la hemoglobina total sin ningún cambio de importancia en la concentración de hemoglobina. Además, las actividades de la GluAp y de la AspAp estaban aumentadas pero no se encontraron cambios significativos en la actividad de la AlaAp.

Por último, la expresión de la proteína VEGF, estaba incrementada de manera significativa en el grupo de ratones tratados con T₄+L-NAME frente al grupo control, de manera que el L-NAME reduce el peso del tumor pero no reduce los niveles del VEGF en los tumores tanto de ratones hipertiroideos como de ratones hipotiroideos. Esto puede que sea porque el L-NAME bloquea el NO, que a su vez es un mediador de la angiogénesis inducida por el factor VEGF.

3.1.3. Efecto del bloqueo de la NOS inducible sobre el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la actividad aminopeptidásica en ratones

La administración de AG al grupo de ratones control y al grupo tratado con T₄, no produjo ningún cambio ni en el peso del tumor ni en la concentración de hemoglobina ni tampoco en el contenido de hemoglobina con respecto a sus respectivos controles no tratados, sugiriendo que la iNOS puede que no juegue un papel en el peso del tumor ni la angiogénesis, al menos en el modelo estudiado. Sin embargo, pero sí redujo de manera muy marcada la actividad de las tres aminopeptidasas, sugiriendo que la iNOS modula positivamente la actividad de estas enzimas. Además, incrementó la expresión de VEGF en ambos grupos.

3.1.4. Efecto del bloqueo de las acciones extracelulares de la hormona tiroidea sobre el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la actividad aminopeptidásica en ratones

El grupo de ratones tratado con tetrac fue el grupo que mostró las disminuciones más importantes en cuanto a peso del tumor, concentración de hemoglobina y hemoglobina total, acompañadas por aumentos en la actividad de las tres aminopeptidasas estudiadas. Por otra parte, en el grupo de ratones tratados con T₄, la administración de tetrac produjo una reducción en el peso tumoral con respecto al grupo control, y un descenso en la hemoglobina total pero no se observó ningún cambio importante en la concentración de hemoglobina. Por otra parte, la administración de tetrac incrementó la actividad de la GluAp y de la AspAp, pero no se observaron cambios en la actividad de la AlaAp. De este modo, la reducción en el peso del tumor inducida por el tetrac estaba asociada con el incremento de la actividad aminopeptidásica. Por último, la expresión de VEGF estaba disminuida en los grupos tratados con tetrac y con T₄+Tetrac, indicando que la activación de la integrina $\alpha\beta_3$ de la membrana plasmática es un mecanismo esencial para que la hormona tiroidea promueva la carcinogénesis.

3.1.5. Estudios de correlación

Se encontraron correlaciones negativas entre el peso del tumor y la actividad de todas las aminopeptidasas cuando los datos se analizaron mediante un análisis de regresión lineal sin diferenciarlos según el tratamiento recibido por el animal (ver *Tabla 3*).

	P	R
Peso Tumor - GluAp	0.023	- 0.705
Peso Tumor - AlaAp	0.116	- 0.529
Peso Tumor - AspAp	0.049	- 0.634

Tabla 3. Tabla que muestra la relación entre el peso del tumor y la actividad aminopeptidásica al analizar todos los datos sin diferenciarlos según el tratamiento recibido.

De igual modo, la hemoglobina total mostró una correlación negativa similar con respecto a la actividad aminopeptidásica. Por el contrario, se encontró una correlación bastante fuerte entre el peso tumoral y el contenido de hemoglobina total del tumor ($r=0.800$; $p<0.0001$). La actividad aminopeptidásica y el peso del tumor presentaron una correlación negativa muy fuerte cuando se analizaron los tumores de los ratones control, hipotiroideos e hipertiroideos (ver *Tabla 4*), y el tratamiento con L-NAME modificó la relación entre el peso del tumor y la actividad aminopeptidásica (ver *Tabla 5*), de manera que los tumores de los grupos tratados con L-NAME no presentaron actividades aminopeptidásicas elevadas como era de esperar en función de su peso.

No Admin. L-NAME	P	R
1/Peso Tumor - GluAp	<0.0001	0.492
1/Peso Tumor - AlaAp	<0.0001	0.512
1/Peso Tumor - AspAp	0.0733	0.222

Tabla 4. Tabla que muestra la relación inversa entre el peso del tumor y la actividad aminopeptidásica de ratones control, tratados con T_4 y con Methimazol.

Tto. L-NAME	P	R
1/Peso Tumor - GluAp	0.0001	0.713
1/Peso Tumor - AlaAp	0.0114	0.507
1/Peso Tumor - AspAp	0.0001	0.730

Tabla 5. Tabla que muestra la relación inversa entre el peso del tumor y la actividad aminopeptidásica de ratones control, tratados con T₄ y con Methimazol y también tratados con L-NAME.

Además, se observó una correlación negativa entre la expresión de VEGF y la actividad de las tres aminopeptidasas estudiadas cuando se analizaron todos los datos sin tener en cuenta el tratamiento recibido por el animal (ver *Tabla 6*).

	P	R
VEGF - GluAp	0.079	- 0.613
VEGF - AlaAp	0.005	- 0.838
VEGF - AspAp	0.014	- 0.776

Tabla 6. Relación entre el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y la actividad aminopeptidásica al analizar todos los datos sin diferenciarlos según el tratamiento recibido.

3.2. Efectos de la disminución en la disponibilidad de glutatión sobre el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la actividad aminopeptidásica en ratones

3.2.1. Efecto de la disminución en la disponibilidad de glutatión con butionina-sulfoximina (BSO) sobre el peso tumoral de ratones control y de ratones tratados con ácido tetrayodotiroacético (tetrac)

En comparación con los grupos control, el grupo de ratones tratados con BSO mostró reducciones marcadas en el peso tumoral, en el contenido de hemoglobina total y en la concentración de hemoglobina, sugiriendo que el BSO reduce tanto el peso del tumor como la angiogénesis. En cuanto a las actividades de la GluAp y de la AlaAp, éstas estaban incrementadas de manera significativa pero no hubo ninguna diferencia en la actividad de la AspAp. La cantidad de VEGF estaba ligeramente reducida pero esta reducción no fue estadísticamente significativa. Por otra parte, el grupo de ratones tratados con tetrac mostró también una reducción marcada en el peso tumoral, en la concentración de hemoglobina y en la hemoglobina total con respecto a los controles, lo cual estaba asociado a un incremento de la actividad de las tres aminopeptidasas, mientras que la cantidad de VEGF en los tumores estaba disminuida. Así, estos descensos en la cantidad de VEGF junto con las reducciones encontradas en el peso del tumor (tanto en el grupo de ratones tratados con BSO, como en el grupo tratado con tetrac) sugerirían la participación del VEGF en la progresión del mismo.

El grupo de ratones tratado con BSO+Tetrac mostró una reducción aún mayor en el peso tumoral que resultó ser significativa al comparar los resultados con los grupos control pero no fue significativa con respecto al grupo tratado sólo con tetrac. Además, se produjo un descenso significativo en el contenido de hemoglobina, y un incremento en la concentración de la misma lo que sugiere que el BSO interfiere con la actividad anti-angiogénica del tetrac. De igual manera, se apreció un mayor incremento en la actividad de GluAp, AlaAp and AspAp. Sin embargo, la cantidad de VEGF no fue diferente entre el grupo de animales tratado con BSO+Tetrac y los grupos control.

3.2.2. Correlación entre el peso tumoral y las actividades aminopeptidásicas

Cuando todos los datos fueron analizados mediante estudios de regresión lineal, el peso tumoral mostró una fuerte correlación negativa con la actividad de todas las aminopeptidasas sugiriendo un posible papel de estas enzimas en la progresión del tumor. (ver *Tabla 7*). En análisis realizados por separado de cada uno de los grupos, también se observaron unos coeficientes de correlación negativa muy altos. Por último, la hemoglobina total mostró una correlación negativa similar con la actividad de todas las aminopeptidasas.

	P	R
Peso Tumor – 1/GluAp	0.018	0.982
Peso Tumor – 1/AlaAp	0.070	0.930
Peso Tumor – 1/AspAp	0.076	0.924

Tabla 7. Tabla que muestra la relación entre el peso del tumor y la actividad aminopeptidásica al analizar todos los datos sin diferenciarlos según el tratamiento recibido.

3.2.3. Efecto del BSO sobre diversas variables de estrés oxidativo y sobre la expresión de α -tubulina

En este estudio, se pudo apreciar un incremento sobre diversas variables de estrés oxidativo en aquellos grupos de ratones tratados con BSO. El contenido total de glutatión en tejido hepático estaba reducido en los grupos de ratones tratados con BSO con respecto a sus controles. En cuanto a la excreción urinaria total de F2-isoprostano, se encontró un incremento significativo en los grupos de animales tratados con BSO al comparar los datos con sus controles. Estos datos indican que la administración de BSO a la dosis usada en nuestro estudio produce un estado de estrés oxidativo y confirma las observaciones previas descritas en la bibliografía para este modelo (Rodríguez-Gómez y cols, 2010). El tratamiento con BSO indujo un incremento en el contenido de la proteína carbonilada en el tejido tumoral, que correlacionaba de manera negativa con el peso del tumor ($r = - 0.8739$; $p < 0.0001$). Además, la correlación inversa entre el contenido de proteína carbonilada y el peso tumoral fue más elevada en el grupo tratado con BSO ($r = 0.8996$; $p = 0.0146$) que en el grupo control ($r = 0.7131$; $p = 0.0471$).

El BSO también indujo un incremento en la expresión de α -tubulina que, a su vez, correlacionaba positivamente con el contenido de proteína carbonilada de cada tumor ($r=0.6111$; $p= 0.0203$). Además, se encontró una fuerte correlación inversa con el peso tumoral en el grupo de ratones tratado con BSO ($r=0.8200$; $p=0.0457$) pero no había ninguna correlación entre la expresión de α -tubulina y el peso del tumor en los ratones control ($r=0.136$; $p=0.7482$).

CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

1. La vasculogénesis y el crecimiento tumoral inducido por la T₄ están mediados en parte por el NO y dependen de la activación de la integrina $\alpha_v\beta_3$.
2. El bloqueo del NO reduce el crecimiento tumoral independientemente del *status* tiroideo.
3. Las actividades aminopeptidásicas correlacionan negativamente con el peso tumoral y con factores de angiogénesis y vasculogénesis, como la hemoglobina y el VEGF, y esta relación es alterada por el bloqueo del NO.
4. La disminución en la disponibilidad de glutatión produce una reducción en el peso tumoral que se relaciona con la oxidación de las proteínas del citoesqueleto.
5. La correlación negativa entre el peso tumoral y las actividades aminopeptidásicas abre nuevas perspectivas para el estudio de las aminopeptidasas tanto como moduladoras del crecimiento tumoral como biomarcadores del mismo.

BIBLIOGRAFÍA

5. Bibliografía

1. Abu-Soud HM, Hazen SL: Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2000; 275: 5425-5430.
2. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA: Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor-3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 548-553.
3. Advani A, Kelly DJ, Advani SL, Cox AJ, Thai K, Zhang Y, White KE, Gow RM, Marshall SM, Steer BM, Marsden PA, Rakoczy PE, Gilbert RE. Role of VEGF in maintaining renal structure and function under normotensive and hypertensive conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104: 14448–53.
4. Allred CD, Allred KF, Ju YH, Virant SM, Helferich WG. Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dosedependent manner. *Cancer Res*. 2001; 61: 5045–5050.
5. Andrade J, Haro JM, Jódar E, Luna JD, Vargas F. Effects of methimazole on low renal mass hypertension: changes in blood pressure and pressor responsiveness to vasoconstrictors. *Pharmacology* 1992; 44: 315-323.
6. Ardaillou R, Chansel D. Synthesis and effects of active fragments of angiotensin II. *Kidney Int* 1997; 52: 1458-1468.
7. Asayama K, Dobashi K, Hayashibe H, and Kato K. Effects of betaadrenergic blockers with different ancillary properties on lipid peroxidation in hyperthyroid rat cardiac muscle. *Endocrinol*. 1989; 36:687-694.
8. Asmah BJ, Wan Nazaimoon WM, Norazmi K, Tan TT, Khalid BA. Plasma renin and aldosterone in thyroid diseases. *Horm Metab Res* 1997; 29: 580-3.

9. Babaei S, Teichert-Kuliszewska K, Monge JC, Mohamed F, Bendeck MP, Stewart DJ. Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor. *Circ Res* 1998; 82: 1007–15.
10. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W: The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002; 397: 342-366.
11. Babior BM: Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N England J Med* 1978; 298: 659-668.
12. Babior BM: The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB Life* 2000; 50: 267-269.
13. Bae MK, Kim SH, Jeong JW, Lee YM, Kim HS, Kim SR, Yun I, Bae SK, Kim KW. Curcumin inhibits hypoxia-induced angiogenesis via down-regulation of HIF-1. *Oncol Rep* 2006 Jun; 15: 1557-62.
14. Barja de Quiroga: Radicales libres y antioxidantes. Departamento de Biología animal II. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid, 1998.
15. Barrera-Hernandez G, Park KS, Dace A, Zhan Q, Cheng SY. Thyroid hormone-induced cell proliferation in GC cells is mediated by changes in G1 cyclin/cyclin-dependent kinase levels and activity. *Endocrinology* 1999; 140: 5267–5274.
16. Baudin B. Angiotensin II receptor polymorphisms in hypertension. Pharmacogenomic considerations. *Pharmacogenomics* 2002; 3: 65-73.
17. Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, Davis PJ. Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 2005; 146: 2864-2871.
18. Bikfalvi A, Bicknell R: Recent advances in angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 576-582.
19. Brown B, May A. Renin-Angiotensin System Modulation: The Weight of Evidence. *AJH*. 2005; 18: 127S–133S.
20. Capo LA, Sillau AH. The effects of hyperthyroidism on capillarity and oxidative capacity in rat soleus and gastrocnemius muscles. *J Physiol* 1983; 342: 1-14.

21. Carmeliet P: Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438: 932-936.
22. Carmeliet P, Collen D: Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999, 237: 133-158.
23. Carmeliet P, Jain R: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-25.
24. Carmeliet, Jain R: Molecular mechanism and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; 473: 298-307.
25. Carrillo-Sepúlveda MA, Ceravolo GS, Bruno-Fortes Z, Carvalho MH, Tostes RC, Laurindo FR, Webb RC, Barreto-Chaves ML. Thyroid hormone stimulates NO production via activation of the PI3K/Akt pathway in vascular myocytes. *Cardiovasc Res* 2010; 85: 560–570.
26. Celsing F, Blomstrand E, Melichna J, Terrados N, Clausen N, Lins PE, Jansson E. Effect of hyperthyroidism on fibre-type composition, fibre area, glycogen content, and enzyme activity in human skeletal muscle. *Clin Physiol* 1986; 6: 171-181.
27. Cianchi F, Cortesini C, Fantappie O, Messerini L, Sardi I, Lasagna N. Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2694–2704.
28. Coleman JW: Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 1397-1406.
29. Cortés-Jofré M, Rueda JR, Corsini-Muñoz G, Fonseca-Cortés C, Caraballoso M, Bonfill Cosp X. Drugs for preventing lung cancer in healthy people. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2012; 10: CD002141.
30. Coon MJ, Ding X, Pernecky SJ, Vaz AND: Cytochrome P450: Progress and predictions. *FASEB J* 1992; 6: 669-673.
31. Chakrabarti N, Ray AK. Rise of intrasynaptosomal Ca²⁺ level and activation of nitric oxide synthase in adult rat cerebral cortex pretreated with 3-5-3'-L-triiodothyronine. *Neuropsychopharmacology* 2000; 22: 36-41.

32. Channon KM, Guzik TJ: Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J Physiol Pharmacol.* 2002; 53: 515-524.
33. Chen T, Nines RG, Peschke SM, Kresty LA, Stoner GD. Chemopreventive effects of a selective nitric oxide synthase inhibitor on carcinogen-induced rat esophageal tumorigenesis. *Cancer Res* 2004; 64: 3714–3724.
34. Chu FF, Esworthy RS. The expression of an intestinal form of glutathione peroxidase (GSHPx-GI) in rat intestinal epithelium. *Arch Biochem Biophys* 1995; 323: 288-294.
35. D’Arcangelo D, Facchiano F, Barlucchi LM, Melillo G, Illi B, Testolin L, Gaetano C, Capogrossi MC. Acidosis inhibits endothelial cell apoptosis and function and induces basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression. *Circ Res* 2000, 86: 312-318.
36. Davis FB, Mousa SA, O’Connor L, Mohamed S, Lin HY, Cao HJ, Davis PJ. Proangiogenic action of thyroid hormone is fibroblast growth factor-dependent and is initiated at the cell surface. *Circ Res* 2004; 94: 1500-1506.
37. Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol* 2008; 29: 211-218.
38. DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K, Mangal D, Yu KH, Yeo CJ, Calhoun ES, Scrimieri F, Winter JM, Hruban RH, Iacobuzio-Donahue C, Kern SE, Blair IA, Tuveson DA. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 2011; 475: 106–109.
39. De la Serna F. Insuficiencia cardiaca crónica. Cap 4: Sistema renina-angiotensina. Actualización 2004; pp: 29-43.
40. Deshayes F, Nahmias C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 293–9.
41. Dimmeler S, Hermann C, Galle J, Zeiher AM. Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:656–64.

42. Diniz GP, Carneiro-Ramos MS & Barreto-Chaves ML 2007 Angiotensin type 1 (AT1) and type 2 (AT2) receptors mediate the increase in TGFbeta1 in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. *Pflügers Archiv* 2007; 454: 75–81.
43. Diniz GP, Carneiro-Ramos MS & Barreto-Chaves ML 2009 Angiotensin type 1 receptor mediates thyroid hormone-induced cardiomyocyte hypertrophy through the AKT/GSK-3b/mTOR signaling pathway. *Basic Research in Cardiology* 2009;104: 653–667.
44. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme–Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000; 87: e1-e9.
45. Dulak J, Jozkowicz A, Dembinska-Kiec A, Guevara I, Zdzienicka A, Zmudzinska-Grochot D, Florek I, Wójtowicz A, Szuba A, Cooke JP. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:659–66.
46. Dunn FG, Oigman W, Ventura HO, Messerli FH, Kobrin I, Frohlich ED. Enalapril improves systemic and renal hemodynamics and allows regression of left ventricular mass in essential hypertension. *American Journal of Cardiology* 1984; 53: 105–108.
47. Dvorak HF: Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost* 2005, 3: 1835-1842.
48. Dzau VJ, Herrmann HC. Hormonal control of angiotensinogen production. *Life Sci* 1982; 30:577-84.
49. Egami K, Murohara T, Shimada T, Sasaki K, Shintani S, Sugaya T, Ishii M, Akagi T, Ikeda H, Matsuishi T, Imaizumi T. Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *J Clin Invest* 2003; 112:67–75.
50. Feldt-Rasmussen U. Treatment of hypothyroidism in elderly patients and in patients with cardiac disease. *Thyroid* 2007; 17:619-24.
51. Fernández V, Cornejo P, Tapia G, Videla LA. Influence of hyperthyroidism on the activity of liver nitric oxide synthase in the rat. *Nitric Oxide* 1997; 1: 463-468.
52. Fernández V, Videla LA, Tapia G, Israel Y. Increases in tumor necrosis factor-alfa in response to thyroid hormone-induced liver oxidative stress in the rat. *Free Radic Res* .2002; 36: 719-725.

-
53. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676.
 54. Ferrara N, Kerbel R: Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005; 438: 967-974.
 55. Ferrara N: Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 2002; 29: 10-14.
 56. Ferreira A, Santos R. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Brazilian J Med Biol Res.* 2005; 38: 499-507.
 57. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenesis process. *Curr Mol Med* 2003; 3: 643-651.
 58. Folkow B. Structural factor in primary and secondary hypertension. *Hypertension* 1990; 16 89–101.
 59. Fommei E, Iervasi G. The role of thyroid hormone in blood pressure homeostasis: evidence from short-term hypothyroidism in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1996-2000.
 60. Frank S, Stallmeyer B, Kampfer H, Schaffner C, Pfeilschifter J. Differential regulation of vascular endothelial growth factor and its receptor fms-like tyrosine kinase is mediated by nitric oxide in rat renal mesangial cells. *Biochem J* 1999; 338: 367–374.
 61. Fridovich I: Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 97-112.
 62. Fujita M, Hayashi I, Yamashina S, Itoman M, Majima M. Blockade of angiotensin AT1a receptor signaling reduces tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294:441–7.
 63. Ganong WF. Thyroid hormones and renin secretion. *Life Sci* 1982; 30: 577-584.
 64. García-Estañ J, Atucha N, Quesada T, Vargas F. Involvement of the reninangiotensin in the reduced pressure-natriuresis response of hyperthyroid rats. *Am J Physiol* 1995; 268:E897–E901.

-
65. García del Río C, Moreno MRR, Osuna A, Luna JD, García-Estañ J, Vargas F. Role of the renin-angiotensin system in the development of thyroxine-induced hypertension. *Eur J Endocrinol.* 1997; 136: 656–660.
66. Giavarotti S, Rodrigues L, Rodrigues T, Junqueira VB & Videla LA. Liver microsomal parameters related to oxidative stress and antioxidant systems in hyperthyroid rats subjected to acute lindane treatment. *Free Radic Res* 1998; 29: 35-42.
67. Goodsell D: The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Stem Cells* 2003, 21: 118-119.
68. Graettinger JS, Muenster JJ, Checchia CS, Grissom RL, Campbell JA. A correlation of clinical and hemodynamic studies in patients with hypothyroidism. *J Clin Invest* 1957; 37: 501-510.
69. Graettinger JS, Muenster JJ, Silverstone LA, Campbell JA. A correlation of clinical and hemodynamic studies of patients with hyperthyroidism and with congestive heart failure. *J Clin Invest* 1959; 40: 1316-1329.
70. Gredilla R, Barja G, Lopez-Torres M. Thyroid hormone-induced oxidative damage on lipids, glutathione and DNA in the mouse heart. *Free Radic Res* .2001; 35: 417-425.
71. Griffiths MJ, Messent M, MacAllister RJ, Evans TW. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 1993; 110:963-968.
72. Gullbo J, Wickstrom M, Larsson R, Nygren P. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Sci* 2001; 102: 501-508.
73. Haas TL, Milkiewicz M, Davis SJ, Zhou AL, Egginton S, Brown MD, Madri JA, Hudlicka O. Matrix metalloproteinase activity is required for activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H1540-H1547.
74. Hall LC, Salazar EP, Kane SR, Liu N. Effects of thyroid hormones on human breast cancer cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 109: 57–66.

-
75. Hellevik AI, Asvold BO, Bjoro T, Romundstad PR, Nilsen TIL, Vatten LJ. Thyroid function and cancer risk: a prospective population study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 570–574.
76. Hennington BS, Zhang H, Miller MT, JP Granger, Reckelhoff JF. Angiotensin II stimulates synthesis of endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension* 1998; 31: 283-288.
77. Hirata Y, Hayakawa H, Suzuki E, Kimura K, Kikuchi K, Nagano T, Hirobe M, Omata M. Direct measurement of endothelium-derived nitric oxide release by stimulation of endothelin receptors in rat kidney and its alterations in salt induced hypertension. *Circulation* 1995; 91: 1229-1235.
78. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, Boland P, Leidich R, Hylton D, Burova E, Ioffe E, Huang T, Radziejewski C, Bailey K, Fandl JP, Daly T, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Rudge JS. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 11393–11398.
79. Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1998; 274: H1054–8.
80. Hu LW, Benvenuti LA, Liberti EA, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves ML. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285:1473-80.
81. Hudlicka O. Is physiological angiogenesis in skeletal muscle regulated by changes in microcirculation? *Microcirculation* 1998; 5:7–23.
82. Ignarro LJ: Nitric oxide as a unique signalling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53: 503-514.
83. Inoue N, Venema RC, Sayegh HS, Ohara Y, Murphy TJ, Harrison DG. Molecular regulation of the bovine endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor-beta 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1255–61.
84. Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science*. 1997; 275: 1649–1652.
85. Ischiropoulos H, al-Mehdi AB: Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett* 1995; 364: 279-282.

-
86. Izawa S, Inoue Y, Kimura A: Importance of catalase in the adaptative response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 1996; 320: 61-67.
87. Jackson EK. Renin and angiotensin. In: Hardman JG, Limbird LE, Goodman-Gilman A, editors. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2001. p. 809–41.
88. Jadeski LC, Chakraborty C, Lala PK. Nitric oxide mediated promotion of mammary tumour cell migration requires sequential activation of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and mitogen-activated protein kinase. *Int J Cancer* 2003; 106: 496–504.
89. Jadeski LC, Hum KO, Chakraborty C, Lala PK. Nitric oxide promotes murine mammary tumour growth and metastasis by stimulating tumour cell migration, invasiveness and angiogenesis. *Int J Cancer* 2000;86: 30–39.
90. Jiménez E, Montiel M, Narváez JA, Morel M. Effects of hyper and hypothyroidism on the basal levels of angiotensin I and kinetic parameters of renin angiotensin system in male rats. *Rev Exp Fisiol*. 1982; 38: 149–154.
91. Jiménez E, Ruiz M, Montiel M, Reyes A, Morell M. Postnatal development of the renin-angiotensin system in thyroidectomized rats. *J Endocrinol Invest* 1988; 11:567-70.
92. Khakoo AY, Sidman R, Pasqualini R, Arap W. Does the Renin-Angiotensin System Participate in Regulation of Human Vasculogenesis and Angiogenesis?. *Cancer Research* 2008; 68: 9112-9115.
93. Kelley Argraves and her thesis mentor, Dr. Dudley Strickland, at the J. H. Holland Laboratory, American Red Cross, Rockville, MD, 1997.
94. Kim KW, Bae SK, Lee OH, Bae MH, Lee MJ, Park BC. Insulin-like growth factor II induced by hypoxia may contribute to angiogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 1998; 58: 348-51.
95. Kim S, Hiwao H. Molecular and cellular mechanisms of Angiotensin II – mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol rev*. 2000; 52: 11-34.

96. Kim KM, Paeng KJ, Hahm JR, Kim DR & Chung BC. Elevated urinary 8-isoprostaglandin F₂á in females with Graves' hyperthyroidism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* .2004; 71: 143-147.
97. Kjos T, Gotoh E, Tkacs N, Shackelford R, Ganong WF. Neuroendocrine regulation of plasma angiotensinogen. *Endocrinology* 1991; 129:901-6.
98. Klebanoff SJ, Clark RA: The neutrophil: functions and clinical disorders. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Co: 1978.
99. Klein EA, Thompson Jr. IM, Tangen CM, Crowley JJ, Lucia MS, Goodman PJ, Minasian LM, Ford LG, Parnes HL, Gaziano JM, Karp DD, Lieber MM, Walther PJ, Klotz L, Parsons JK, Chin JL, Darke AK, Lippman SM, Goodman GE, Meyskens FL, Baker Jr LH. Vitamin E and the risk of prostate cancer: The selenium and vitamin E cancer prevention trial (SELECT). *JAMA*. 2011; 306: 1549–1556.
100. Klein I, Danzi S. Thyroid disease and the heart. *Circulation* 2007; 116:1725-35.
101. Klein, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *New Eng J Med* 2001; 344: 501-509.
102. Kettle AJ, Winterbourn CC: Myeloperoxidase: A key regulator of neutrophil oxidant production. *Redox. Rep.* 1997; 3: 3-15, 1997.
103. Kobori H, Ichihara A, Suzuki H, Takenaka T, Miyashita Y, Hayashi M, Saruta T. Role of the renin–angiotensin system in cardiac hypertrophy induced in rats by hyperthyroidism. *American Journal of Physiology* 1997; 273: H593–H599.
104. Kobori H, Ichihara A, Suzuki H, Miyashita Y, Hayashi M & Saruta T. Thyroid hormone stimulates renin synthesis in rats without involving the sympathetic nervous system. *American Journal of Physiology* 1997; 272: E227–E232.
105. Kobori H, Ichihara A, Miyashita Y, Hayashi M, Saruta T. Local renin–angiotensin system contributes to hyperthyroidism-induced cardiac hypertrophy. *Journal of Endocrinology* 1999; 160: 43–47.

106. Koukolis G, Polymeris A, Tzavara I, Pappas D, Thalassinou N. Normalization of thyroid hormone levels in patients with either hyper- or hypothyroidism results in a profound change of atrial natriuretic peptide (ANP) levels. *Hormones* 2002; 1: 104-12.
107. Kumar MS, Chiang T, Deodhar SD. Enhancing effect of thyroxine on tumor growth and metastases in syngeneic mouse tumor systems. *Cancer Res* 1979; 39: 3515–3518.
108. Lahera V, Salazar J, Salom MG, Romero JC. Deficient production of nitric oxide induces volume-dependent hypertension. *J Hypertens* 10 (suppl) 1992; S173-S177.
109. Larsen PR, Davis TF, Hay ID. The thyroid gland. En *Williams Textbook of endocrinology*. 6ª ed. 389-515. Eds. JD Wilson, DW Foster, HK Kronenberg, PR Larsen. London. WB Saunders & Company, 1998.
110. Lee TK, Poon RT, Yuen AP, Man K, Yang ZF, Guan XY, Fan ST. Rac activation is associated with hepatocellular carcinoma metastasis by up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 5082-9.
111. Lee TK, Poon RT, Yuen AP, Ling MT, Wang XH, Wong YC, Guan XY, Man K, Tang ZY, Fan ST. Regulation of angiogenesis by Id-1 through hypoxia-inducible factor-1alpha-mediated vascular endothelial growth factor up-regulation in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 6910-19.
112. Letelier R. Angiogenesis and a cancer. *Medwave* 2007; 7: e3546 doi:10.5867/medwave.2007.03.3546.
113. Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, McCallum IR, McInnes GT, MacKinnon PL, Meredith PA, Murray LS, Reid JL, Robertson JW. Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet* 1998; 352:179–84.
114. Lind DS. Arginine and Cancer. *J Nutr* 2004; 134: 2837S–2841S.
115. Lobov IB, RA de Renard, Papadopoulos N, vendaval nanovatio, Thurston G, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. (2007) *Proc Acad nacional Sci los E.E.U.U.* 2007 104: 3219-24. Epub el 12 Feb 2007.
116. Marchio S, Lahdenranta J, Schlingemann RO, Valdembri D, Wesseling P, Arap MA, Hajitou A, Ozawa MG, Trepel M, Giordano RJ, Nanus DM, Dijkman HB, Oosterwijk E, Sidman RL, Cooper MD, Bussolino F, Pasqualini R, Arap W. Aminopeptidase A is a functional target in angiogenic blood vessels. *Cancer Cell* 2004; 5:151–62.

117. Marcisz C, Jonderko G, Kucharz EJ. Influence of short-time application of a low sodium diet on blood pressure in patients with hyperthyroidism or hypothyroidism during therapy. *Am J Hypertens* 2001; 14: 995-1002.
118. Marcisz C, Kucharz EJ, Marcisz-Orzel M, Poręba R, Orzel A, Sioma-Markowska U. Changes of poststimulatory plasma renin activity in women with hyperthyroidism or hypothyroidism in relation to therapy. *Neuro Endocrinol Lett* 2011; 32: 301-7.
119. Marquez LA, Dunford HB, Van Wart H. Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. *J Biol Chem* 1990; 265: 5666-5670.
120. Martínez-Ezquerro y Herrera: Anti-angiogenic therapy. *Cancerology* 1, 2006; 83-96.
121. Masson-Gadais B, Houle F, Laferrière J, Huot J. Integrin $\alpha\beta 3$ requirement for VEGFR2-mediated activation of SAPK2/p38 and Hsp90-dependent phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells activated by VEGF. *Cell Stress Chaperones*. 2003;8:37–52.
122. Matés JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front in Biosci* 1999; 4: d335-345.
123. Matsumoto T, Claesson-Welsh L: VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE* 2001, 112: 1-17.
124. Mattson DL, Maeda CY, Bachman TD, Cowley AW.Jr. Inducible nitric oxide synthase and blood pressure. *Hypertension* 1998; 31:15-20.
125. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 8104-9.
126. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how and why?. *J Clin Invest* 1997; 100: 2146-2152.
127. Mishkin SY, Pollack R, Yalovsky MA, Morris HP, Mishkin S. Inhibition of local and metastatic hepatoma growth and prolongation of survival after induction of hypothyroidism. *Cancer Res* 1981; 41: 3040–3045.

128. Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Milton RG, McDaniel ML, Williamson JR, Currie MG. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 1993; 233: 119–125.
129. Moeller LC, Führer D. Thyroid hormone, thyroid hormone receptors, and cancer: a clinical perspective. *Endocr Relat Cancer* 2013; 20: R19–R29.
130. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmac Rev* 1991; 43:109-142.
131. Monte M, Davel L, Sacerdote de Lustig E. Inhibition of lymphocyte induced angiogenesis by free radical scavengers. *Free Radic Biol Med* 1994; 17:259-266.
132. Monte M, Giri J, Sacerdote de Lustig E. Oxidación y antioxidación en la carcinogénesis y el desarrollo tumoral. *Antioxidantes y calidad de vida* 1995; 2: 4-11.
133. Moreno JM, Rodríguez Gómez I, Wangenstein R, Alvarez-Guerra M, de Dios Luna J, García-Estañ J, Vargas F. Tempol improves renal hemodynamics and pressure natriuresis in hyperthyroid rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Mar; 294: R867-73.
134. Moreno JM, Rodríguez Gómez I, Wangenstein R, Osuna A, Bueno P, Vargas F. Cardiac and renal antioxidant enzymes and effects of tempol in hyperthyroid rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 Nov; 289: E776-83.
135. Morbidelli L, Donnini S, Ziche M. Role of nitric oxide in tumor angiogenesis. *Cancer Treat Res* 2004; 117: 155–167.
136. Morbidelli L, Chang CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol* 1996; 270: H411–5.
137. Mori T, Cowley AW Jr. Renal oxidative stress in medullary thick ascending limbs produced by elevated NaCl and glucose. *Hypertension*. 2004; 43 :341-346.
138. Mousa SA, Bergh JJ, Dier E, Rebbaa A, O'Connor LJ, Yalcin M, Aljada A, Dyskin E, Davis FB, Lin HY, Davis PJ. Tetraiodothyroacetic acid, a small molecule integrin ligand, blocks angiogenesis

induced by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Angiogenesis*. 2008; 11:183–190.

139. Murohara T, Asahara T, Takahashi T. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration: endogenous nitric oxide maintains integrin $\alpha_v\beta_3$ expression in endothelial cells. *Circulation (Suppl)* 1998; I-730.

140. Murphey L, Hachey D, Oates J, Morrow JD, Brown NJ. Metabolism of bradykinin in vivo in humans: identification of BK 1-5 as a stable plasma peptide metabolite. *J pharm exp therap*. 2000; 294: 263-269.

141. Nagasawa H, Uto Y, Kirk KL, Hori H. Design of hypoxia-targeting drugs as new cancer chemotherapeutics. *Biol. Pharm. Bull.* 2006; 29: 2335-42.

142. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 2002, 196: 1497-1506.

143. Nanus DM, Bogenrieder T, Papandreou CN, Finstad CL, Lee A, Vlamis V, Motzer RJ, Bander NH, Albino AP, Reuter VE. Aminopeptidase A expression and enzymatic activity in primary human renal cancers. *Int J Oncol* 1998; 13: 261–267.

144. Nauseef WM, Malech HL. Analysis of the peptide subunits of human neutrophil myeloperoxidase. *Blood* 1986; 67: 1504-1507.

145. Noiri E, Lee E, Testa J, Quigley J, Colflesh D, Keese CR, Giaever I, Goligorsky MS. Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide. *Am J Physiol* 1998; 274: C236–44.

146. Ornitz, DM, Itoh N. Fibroblas growth factors *Genome Biology* 2001; 2: REVIEWS3005.

147. Ortiz MC, Fortepiani LA, Martínez C, Atucha NM, García-Estañ J. Renal and pressor effects of aminoguanidine in cirrhotic rats with ascites. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 2694–2699.

148. Pardali E, Goumans MJ, Dijke P. Signaling by members of the TGF- β family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol.* 2010; 20, 556–567.

149. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1997; 100: 3131–9.
150. Papapetropoulos A, Desai KM, Rudic RD, Mayer B, Zhang R, Ruiz-Torres MP, García-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate transforming-growth-factor-beta 1-stimulated capillary organization in vitro. *Am J Pathol* 1997; 150: 1835–44.
151. Partanen TA, Paavonen K. Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microsc Res Tech* 2001, 55: 108-121.
152. Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A, Ashmun RA, Shapiro LH, Arap W, Ruoslahti E. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* 2000; 60: 722–7.
153. Patan S. Division of Cardiology, Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University, Bronx, New York 10461, USA. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanism of vascular network formation, growth and remodeling. *Journal of Neuro-Oncology* 2000; 50: 1-15.
154. Pietras R, Weinberg O. Antiangiogenic Steroids in Human Cancer Therapy. *eCAM* 2005, 2: 49–57.
155. Pennanen S. Polimorfismo G-699C en la región promotora del receptor B1 de Bradikinina y tos inducida por Enalapril. Santiago de Chile, 2005.
156. Quesada A, Sainz J, Wangensteen R, Rodríguez-Gómez I, Vargas F, Osuna A. Nitric oxide synthase activity hyperthyroid and hypothyroid rats. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 117-122.
157. Risau W. Mechanism of angiogenesis. *Nature* 1997, 386: 671-674.
158. Robinson C, Woo S, Walsh A, Nowak AK, Lake RA. The antioxidants vitamins A and E and selenium do not reduce the incidence of asbestos-induced disease in a mouse model of mesothelioma. *Nutr. Cancer*. 2012; 64: 315–322.
159. Rodríguez-Gómez I, Baca Y, Moreno JM, Wangensteen R, Perez-Abud R, Payá JA, O'Valle F, Vargas F. Role of sympathetic tone in BSO-induced hypertension in mice. *Am J Hypertens*. 2010; 23: 882–888.

160. Rodríguez-Gómez I, Wangensteen R, Moreno JM, Chamorro V, Osuna A, Vargas F. Effects of chronic inhibition of inducible nitric oxide synthase in hyperthyroid rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E1252-E1257.
161. Rössig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM, Mülsch A, Dimmeler S. Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J Biol Chem* 1999; 274: 6823–6.
162. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973; 179: 588-590.
163. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Suzuki Y, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension* 2001; 38: 1382–7.
164. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat. Med.* 2005; 11: 1306-1313.
165. Safford SE, Oberley TD, Urano M, St Clair DK. Suppression of fibrosarcoma metastasis by elevated expression of manganese superoxide dismutase. *Cancer Res* 1994; 54: 4261-4265.
166. Sahni A, Francis CW. Stimulation of endothelial cell proliferation by FGF-2 in the presence of fibrinogen requires $\alpha v\beta 3$. *Blood*. 2004; 104:3635–3641.
167. Sawant BU, Nadkarni GD, Thakare UR, Joseph LJ, Rajan MG. Changes in lipid peroxidation and free radical scavengers in kidney of hypothyroid and hyperthyroid rats. *Indian J Exp Biol* 2003; 41:1334-1337.
168. Sayin VI, Ibrahim MX, Larsson E, Nilsson JA, Lindahl P, Bergo MO. Antioxidants Accelerate Lung Cancer Progression in Mice. *Sci Transl Med*. 2014; 6: 221ra15.
169. Schleiffer R, Durantón B, Gosse F, Bergmann C, Raul F. Nitric oxide synthase inhibition promotes carcinogen-induced preneoplastic changes in the colon of rats. *Nitric Oxide* 2000; 4: 583–589.

170. Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med* 2003; 35: 21–27.
171. Segarra AB, Ramirez M, Banegas I, Hermoso F, Vargas F, Vives F, Alba F, de Gasparo M, Prieto I. Influence of thyroid disorders on kidney angiotensinase activity. *Horm Metab Res* 2006; 38: 48-52.
172. Segarra AB, Wangensteen R, Ramirez M, Banegas I, Hermoso F, Vargas F, Vives F, Durán R, Alba F, de Gasparo M, Prieto. Atrial angiotensinase activity in hypothyroid, euthyroid, and hyperthyroid rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 48: 117-120.
173. Semenza G. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu Rev Med* 2003, 54: 17-28.
174. Sewerynek J, Wiktorska J, Novak D, Lewinski A. Methimazole protection against oxidative stress induced by hyperthyroidism in Graves disease. *Endocr Regul.* 2000; 34:83-89.
175. Seymen HO, Civelek S, Seven A, Yigit G, Hatemi H & Burkak G. Iron supplementation in experimental hyperthyroidism: effects of oxidative stress in skeletal muscle tissue. *Yonsei Med J* 2004; 45:413-418.
176. Seymen HO, Seven A, Civelek S, Yigit G, Hatemi H & Burkak G. Evaluation of antioxidant status in liver tissues: effects of iron supplementation in experimental hyperthyroidism. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1999; 10: 315-325.
177. Shoemaker JP, Bradley RL, Hoffman RV. Increased survival and inhibition of mammary tumors in hypothyroid mice. *J Surg Res* 1976; 21: 151–154.
178. Sibinga N, Ware A. A Pair of ACEs, for Openers?. *Circ Res.* 2000; 87:e1– e9
179. Simon BC, Cunningham LD, Cohen RA. Oxidized low density lipoproteins cause contraction and inhibit endothelium-dependent relaxation in the pig coronary artery. *J Clin Invest* 1990; 86: 75–9.
180. Singh A, Boldin-Adamsky S, Thimmulappa RK, Rath SK, Ashush H, Coulter J, Blackford A, Goodman SN, Bunz F, Watson WH, Gabrielson E, Feinstein E, Biswal S. RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2–related factor 2 gene expression in non–small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy. *Cancer Res.* 2008; 68: 7975–7984

181. Shibuya M. Structure and function of VEGF/ VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001, 26: 25-35.

182. Stegmann TJ. A human factor in growth in the induction of neoangiogenesis. *Exp Opin Invest Drugs* 1998; 7: 2011-2015.

183. Sun HC, Tang ZY. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: the retrospectives and perspectives. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2004; 130: 307-19.

184. Tan DY, Meng S, Cason GW, Manning RD Jr. Mechanisms of salt sensitive hypertension: role of inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol* 2000; 279: R2297–R2303.

185. Tapia G, Cornejo P, Fernandez V, Videla LA. Protein oxidation in the thyroid hormona-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation. *Toxicol Lett* 1999; 106:209-214.

186. Tiefenbacher CP, Chilian WM. Basic fibroblast growth factor and heparin influence coronary arteriolar tone by causing endotheliumdependent dilation. *Cardiovasc Res* 1997; 34: 411–7.

187. Theodossiou C, Schwarzenberger P. Propylthiouracil reduces xenograft tumor growth in an athymic nude mouse prostate cancermodel. *Am J Med Sci* 2000; 319: 96–99.

188. Thurston G. Role of kinases of tyrosine of the receiver of Angiopoietins and conection with angiogenesis lymphangiogenesis. *Tissue Res of the cell* 2003; 314: 61-8.

189. Tsui KH, Hsieh WC, Lin MH, Chang PL, Juang HH. Triiodothyronine modulates cell proliferation of human prostatic carcinoma cells by downregulation of the B-cell translocation gene 2. *Prostate* 2008; 68: 610–619.

190. Turner A, Hooper N. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 2002; 23: 177-183.

191. Turrens JF: Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physio* 2003; 552: 335-344.

192. Uemura H, Ishiguro H, Kubota Y. Pharmacology and new perspectives of angiotensin II receptor blocker in prostate cancer treatment. *Int J Urol* 2008; 15:19–26.

193. Ueta Y, Levy A, Chowdrey HS, and Lightman SL. Hypothalamic nitric oxide synthase gene expression is regulated by thyroid hormones. *Endocrinology* 1995; 136:4182-4187.
194. Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohé L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 1999; 285: 1393-1396.
195. Vafa O, Wade M, Kern S, Beeche M, Pandita TK, Hampton GM, Wahl GM. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: A mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol. Cell.* 2002; 9:1031–1044.
196. Van der Zee R, Murohara T, Luo Z, Zollmann F, Passeri J, Lekutat C, Isner JM. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation* 1997; 95(4):1030–7.
197. Vargas F, García del Río C, Luna JD, Haro JM, Osorio C. Studies on thyroid activity in deoxycorticosterone-salt and Goldblatt two-kidney, one clip hypertensive rats. *Acta Endocrinol* 1988; 118: 22-30.
198. Vargas F, Haro JM, Sabio JM. Renal beta-adrenoceptors in thyroxine-treated rats. *J Endocrinol Invest* 1992; 15: 605-8.
199. Vargas F, Moreno JM, Rodríguez-Gómez I, Wangenstein R, Osuna A, Álvarez-Guerra M, García-Estañ J. Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. *Eur J Endocrinol.* 2006; 154: 197-212.
200. Vargas F, Rodríguez Gómez I, Pérez-Abud R, Vargas Tendero P, Baca Y, Wangenstein R. Cardiovascular and renal manifestations of glutathione depletion induced by buthionine sulfoximine (BSO). *Am J Hypertens.* 2012a; 25:629-635.
201. Vargas F, Rodríguez-Gómez I, Vargas-Tendero P, Jimenez E, Montiel M. The renin-angiotensin system in thyroid disorders and its role in cardiovascular and renal manifestations. *Endocrinol* 2012b; 213: 25-36.
202. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9220 - 9225.

203. Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int.* 2003; 63: 179-85.
204. Vaziri ND, Wang F, Oveisi F, Rad B. Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension.* 2000; 36:142–146.
205. Vaziri ND, Zhenmin N, Oveisi F. Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31:1248-1254.
206. Veikkola T, Karkkainen M, Cleasson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000, 60: 203-212.
207. Venditti P, Balestrieri M, Di Meo S, and De Leo T. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *J Endocrinol* 1997; 155: 151-157.
208. Ventura RR, Olivares EL, Passos Junior DB, Ramalho MJ, Antunes-Rodrigues J, Reis LC. Effect of chronic oral administration of a low dose of captopril on sodium appetite of hypothyroid rats. Influence of aldosterone treatment. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 407-11.
209. Volpert OV, Ward WF, Lingen MW, Chesler L, Solt DB, Johnson MD, Molteni A, Polverini PJ, Bouck NP. Captopril inhibits angiogenesis and slows the growth of experimental tumors in rats. *J Clin Invest* 1996; 98:671–9.
210. Von Marschall Z, Cramer T, Hocker M, Finkenzeller G, Wiedenmann B, Rosewicz S. Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. *Gut* 2001; 48: 87-96.
211. Waisman G, Morales M. Impacto clínico de los inhibidores de la enzima de conversión en la enfermedad cardiovascular. Artículo en web. *Revista de la Federación argentina de cardiología* 2005.
212. Watson J. Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open Biol.* 2013; 3: 120144.
213. Wood JM, Bold G, Buchdunger E, Cozens R, Ferrari S, Frei J, Hofmann F, Mestan J, Mett H, O'Reilly T, Persohn E, Rosel J, Schnell C, Stover D, Theuer A, Towbin H, Wenger F, Woods-Cook K, Menrad A, Siemeister G, Schirner M, Thierauch KH, Schneider MR, Dreves J, Martiny-Baron G, Totzke F. PTK787/ ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor

tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res* 2000, 60: 2178-2189.

214. Xiao Z, Zhang Z, Diamond SL. Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium dependent but not calcium-activated. *Journal of Cell Physiology* 1997; 171:205-211.

215. Xie Q, Nathan C: The high-output nitric oxide pathway: Role and regulation. *J Leukocyte Biol* 1994; 56: 576-582.

216. Xue Y, Bi F, Zhang X, Zhang S, Pan Y, Liu N, Shi Y, Yao X, Zheng Y, Fan D. Role of Rac1 and Cdc42 in hypoxia induced p53 and von Hippel-Lindau suppression and HIF-1alpha activation. *Int. J. Cancer* 2006; 118: 2965-72.

217. Yalcin M, Dyskin E, Lansing L, Bharali DJ, Mousa SS, Bridoux A Hercbergs AH, Lin HY, Davis FB, Glinsky GV, Glinskii A, Ma J, Davis PJ, Mousa SA. Tetraiodothyroacetic acid (TETRAC) and nanoparticulate TETRAC arrest growth of medullary carcinoma of the thyroid. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95:1972–1980.

218. Yan H and Harding JJ. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem J* 1997; 328: 599-605.

219. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000, 407: 242-248.

220. Yokoyama Y, Beckman TK, Wheat JK, Cash TG, Freeman BA, Parks DA. Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am J Physiol* 1990; 258; G564-570.

221. Yoshiji H, Kuriyama S, Kawata M, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor perindopril suppresses tumor growth and angiogenesis: possible role of the vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1073–8.

222. Zetter B. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* 1998, 49: 407-424.

223. Zhou, X. J., Vaziri, N. D., Zhang, J., Wang, H. W, Zhuo, J. L., Imig, J. D., Hammond, T. J., Orengo, S., Benes, E, Navar, L. G. Ang II accumulation in rat renal endosomes during Ang II-induced hypertension: role of AT1 receptor. *Hypertension.* 2002; 39: 116–121.

224. Zhu Z, Witte L. Inhibition of tumor growth and metastasis by targeting tumor-associated angiogenesis with antagonists to the receptors of vascular endothelial growth factor. *Invest New Drugs* 1999, 17: 195-212.
225. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ, et al. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 1997; 99: 2625–34.
226. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J ClinInvest* 1994; 94: 2036–44.
227. Ziche M, Parenti A, Ledda F, Dell'Era P, Granger HJ, Maggi CA, et al. Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. *Circ Res* 1997; 80: 845–52.
228. Zsotér T, Tom H, Chappel C. Effects of thyroid hormones on vascular response. *J Lab Clin Med* 1964; 64: 433-441.

**PUBLICACIONES QUE
CONSTITUYEN LA TESIS**

Effect of thyroid hormone–nitric oxide interaction on tumor growth, angiogenesis, and aminopeptidase activity in mice

Javier Carmona-Cortés · Isabel Rodríguez-Gómez · Rosemary Wangenstein · Inmaculada Banegas · Ángel M. García-Lora · Andrés Quesada · Antonio Osuna · Félix Vargas

Received: 18 November 2013 / Accepted: 4 February 2014 / Published online: 20 February 2014
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2014

Abstract This study evaluated the effects of thyroid hormone–NO interaction on tumor development, vascularization, vascular endothelial growth factor (VEGF), and aminopeptidase (AP) activity in a murine model of implanted Lewis's carcinoma. Experiments were performed in male CBA-C57 mice. Animals were untreated (controls) or treated with: T₄, the antithyroid drug methimazole, the NO inhibitor L-NAME, T₄+L-NAME, methimazole+NAME, the $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin antagonist tetrac, T₄+tetrac, the iNOS inhibitor aminoguanidine (AG), and T₄+AG; all treatments were for 6 weeks except for tetrac, administered for the last 11 days. Mice were subcutaneously inoculated with 1×10^6 exponentially growing Lewis carcinoma 3LL cells into the dorsum. Study variables 9 days later were tumor weight (TW), Hb content, an index of tumor vascularization, VEGF, and AP activity. T₄ produced parallel increases in TW and angiogenesis. L-NAME reduced TW and angiogenesis in control, hyperthyroid, and hypothyroid mice, whereas AG had no effect on these variables. Tetrac arrested TW in normal and T₄-treated mice but did not decrease angiogenesis in T₄-treated animals. Negative correlations were found between TW and AP activity in tumors from control hyper- and hypothyroid groups and an inverse relationship

was observed between TW and AP activities in tetrac-treated mice. T₄ enhances TW and angiogenesis, in which NO participates, but requires activation of integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ to promote carcinogenesis. NO blockade reduces TW, regardless of the thyroid status. Thyroid hormone negatively modulates AP activity in the tumor. Accordingly, blockade of the membrane TH receptor $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin reduces TW associated with an increase in AP activity.

Keywords Tumor growth · Hemoglobin · Thyroxine · Methimazole · Aminopeptidases

Introduction

Epidemiological studies have suggested that thyroid hormone has tumor-promoting effects in several types of cancer [1]. Thus, reduced thyroid stimulating hormone levels have been associated with a higher risk of colon, lung, prostate, and breast cancer, and a thyroid hormone dose-dependent effect on cancer development has even been suggested [2]. Experimental studies have shown that thyroid hormones can stimulate the proliferation of pituitary [3], breast [4], and prostatic [5] cancer cell lines. Thyroid hormone was also found to enhance cancer development in rodent tumor implant models [6], whereas hypothyroidism had the opposite effect. Thus, hypothyroidism increased the survival of mice after implantation of murine mammary adenocarcinoma cells [7] and inhibited the local and metastatic growth of hepatomas in rats [8]. Theodossiou and Schwarzenberger [9] also reported significantly smaller tumors in propylthiouracil-treated mice than in untreated mice.

Abnormalities in NO generation have been reported in thyroid disorders [10, 11], and NO is known to be produced by tumor cell lines and solid tumors [12]. The precise role of NO in cancer is poorly understood, but it may influence tumor

J. Carmona-Cortés · R. Wangenstein · I. Banegas
Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén,
Jaén, Spain

I. Rodríguez-Gómez · F. Vargas (✉)
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina,
18012 Granada, Spain
e-mail: fvargas@ugr.es

Á. M. García-Lora
Servicio de Análisis Clínicos, Inmunología, Hospital Virgen de las
Nieves, Granada, Spain

A. Quesada · A. Osuna
Servicio de Nefrología, Hospital Virgen de las Nieves,
Granada, Spain

initiation, promotion, progression, tumor-cell adhesion, differentiation, immunosuppression [12], and angiogenesis [13]. Angiogenesis is an essential requirement for tumor growth. NO promotes new vessel growth by the NO-mediated upregulation of angiogenic factors [14] and by the proliferation of vascular cells [15]. The chemopreventive effect of NO blockade has been reported in murine esophageal [16] and mammary [17] cancer models. Conversely, L-NAME has been shown to promote preneoplastic changes in the colon of rats [18].

Activity or expression of the aminopeptidases (APs) responsible for the downstream cleavage of angiotensin II [19], including APA [20] and APN [21], has been implicated in tumor development and tumor angiogenesis [22]. These APs are changed in several tissues in rats with thyroid dysfunction [23, 24], but the potential modulatory role of thyroid hormone on AP activity in tumor development is unknown.

The above observations illustrate the need for further research in this area. The present study analyzed the influence of thyroid status and the thyroid hormone–NO interaction on tumor growth, angiogenesis, and AP activity in a murine model of implanted Lewis carcinoma 3LL cells. We also examined the effect on these variables of host treatment with the deaminated T₄ analog tetraiodothyroacetic acid (tetrac), antagonist of the $\alpha v\beta 3$ integrin receptor [25], and aminoguanidine, an iNOS inhibitor in vitro [26, 27] and in vivo [28, 29].

Materials and methods

Animals

We used 100 male CBA-C57 mice born and raised at the Granada University animal center. Animal care and work protocols were approved and carried out following the regulations set forth by the Committee of Animal Research and Bioethics of Granada University in accordance with European Union guidelines for the ethical care of animals. Male mice initially weighing 20–25 g were randomly assigned to different experimental groups. All animals had free access to standard mice diet (B&K rodent toxicology diet, Barcelona, Spain) and tap water or their respective drinking fluid ad libitum. Two experiments were performed, and each experimental group comprised ten animals, except when stated otherwise.

Cells and cell culture

Lewis carcinoma 3LL cells, provided by Dr. A. Lora (Department of Immunology, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain), were cultured in RPMI medium supplemented with 5 % fetal calf serum, standard antibiotics, and L-glutamine, all

from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Cells were maintained in a humidified 5 % CO₂ atmosphere at 37 °C.

Tumor induction

Mice were subcutaneously inoculated with 1×10^6 exponentially growing Lewis carcinoma 3LL cells into the dorsum. Nine days later, mice were deeply anesthetized with Equithesin (25 μ l/10 g). Tumors were rapidly removed, weighed, and immediately frozen for Hb and AP activity measurements.

Experimental protocols

The study variables in the tumors were tumor weight; Hb concentration, a recognized index of tumor vascularization [30–32], vascular endothelial growth factor (VEGF) protein abundance; and the activity of GluAp, AlaAp, and AspAp. Because of the major variations in tumor weight, concentrations are considered better markers of angiogenesis than are absolute values.

To analyze the interactive effect of thyroid hormone–nitric oxide on tumor weight and the other variables, mice were assigned to the following groups: control, T₄ (12 mg/l, drinking water), the antithyroid drug methimazole (300 mg/l, drinking water), L-NAME (15 mg/l, drinking water), T₄+L-NAME, methimazole+L-NAME, the iNOS inhibitor aminoguanidine (AG) (500 mg/l, drinking water), T₄+AG, tetrac (10 mg kg⁻¹ day⁻¹, i.p.), and T₄+tetrac. Treatments were for 6 weeks with the exception of tetrac, which was administered during the 11 days before the end of the experimental period.

Analytical procedures

Hb in blood was measured in a hematology cell counter (SYSMEX KX-ZIN, Roche, Madrid, Spain), while Hb in tumors was measured by spectrophotometry using the Drabkin method. Tumor tissue was homogenized in distilled water and centrifuged at 16,000 \times g for 5 min at 4 °C; then, 25 μ l of the supernatant were mixed with 225 μ l of Drabkin's reagent (Sigma, Madrid, Spain) in a microplate at room temperature for 15 min, and absorbance was measured at 540 nm. The Hb concentration was determined by comparison with a standard curve from 0 to 20 mg/ml of bovine Hb dissolved in water.

Plasma total T₄ and tumor free T₄ levels were determined using rat radioimmunoassay kits according to the manufacturer's instructions (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). For thyroid hormone measurements, the tumors were homogenized with a glass homogenizer in ice-cold HEPES buffer containing (mmol/l) 25 sodium HEPES, 1 EDTA, 0.1 phenylmethylsulfonyl fluoride, and

phosphate-buffered saline. After centrifugation of the homogenate at 6,000×g for 5 min at 4°C, the supernatant containing membrane and cytosolic components was separated into aliquots, frozen in liquid N₂, and stored at –80 °C until use.

To measure AP activity, tumor tissues were homogenized in 50 mM HCl–Tris (pH 7.4) containing 1 % Triton X-100 and centrifuged for 15 min at 1,000×g. GluAp, AlaAp, CysAp, and AspAp activities were determined in duplicate in a kinetic fluorimetric assay using glutamyl-, alanyl-, cystinyl-, and aspartyl-β-naphthylamide as substrates, respectively. Tissue protein was determined with the DC Protein Assay kit (Bio-Rad, Madrid, Spain).

VEGF abundance was quantified by indirect ELISA using an ELISA starter kit purchased from Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, TX, USA). Briefly, homogenized tumor tissues containing 1 mg/ml of total protein were fixed in a 96-well plate overnight at 4 °C. After blocking, the plate was probed with 1 μg/ml of rabbit anti-VEGF antibody (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) as primary antibody and with 0.2 μg/ml of mouse anti-rabbit HRP-linked IgG antibody (KPL Inc., Gaithersburg, MD, USA) as secondary antibody. All samples were determined in duplicate, and results were expressed as a percentage of the mean absorbance in the control group.

Statistical analyses

One-way analysis of variance (ANOVA) was performed, using Statview software (Adept Scientific, Acton, MA, USA) to compare means±standard deviations (SDs) between each experimental group and its respective control group. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. Linear regression and analysis of variance between tumor weight and AP activity or VEGF abundance were studied using Statgraphics software; $|r| > 0.5$, $p < 0.05$ was considered a strong correlation. Statgraphics software was also employed for the selection of linear regression model and comparison of slopes in Fig. 3.

Results

Body weight, plasma, and tumor T₄ levels (Table 1) Body weight was not significantly different among the experimental groups, although a tendency to a reduced body weight was observed in T₄- and methimazole-treated mice. Plasma total T₄ levels were increased in T₄-treated mice and decreased in methimazole-treated mice. Free T₄ values were increased in tumors from T₄-treated mice and reduced in those from methimazole-treated mice.

Tumor variables in thyroid disorders The T₄ group showed increased tumor weight, with no changes in Hb concentration

Table 1 Plasma (total T₄) and tumoral (free T₄) levels of thyroid hormones in the experimental groups

Groups	Body weight (g)	Plasma total T ₄ (μg/dl)	FT ₄ in the tumors (pg/g)
Control	29.00±1.90	4.1±0.2	30.4±2.8
T ₄	26.60±0.83	41.6±1.2*	240.6±9.1*
Methimazole	26.44±0.73	0.4±0.2*	5.4±1.5*
L-NAME	27.00±0.93	3.7±0.3	26±2.9
T ₄ +L-NAME	26.10±0.53	36.2±2.2*	230.5±7.7*
Methimazole+L-NAME	26.00±0.60	0.4±0.3*	4.2±0.7*
AG	29.38±0.59	4.5±.4	37.1±3.1
T ₄ +AG	27.10±0.66	39.4±3*	255.6±8.5*
Tetrac	27.75±0.45	4.2±0.4	36.3±3.5
T ₄ +Tetrac	26.0±0.63	42.1±3.3*	266.4±10*

Data expressed as means±SEM

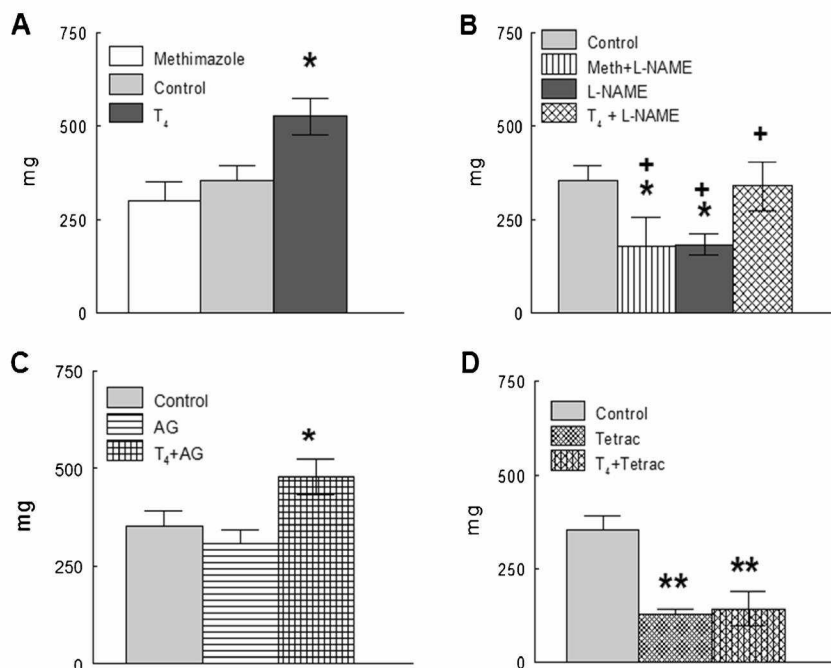
* $p < 0.001$ versus controls

levels and a nonsignificant increase in total Hb. Tumor weight, Hb concentration levels, and total Hb were nonsignificantly reduced in hypothyroid methimazole-treated mice. Tumors in the T₄ hyperthyroid mice showed a tendency to a reduction in AP activity. In contrast, tumors in hypothyroid mice showed an increase in AP activity. VEGF expression in the tumor was increased in the mice treated with T₄ versus controls but was not significantly modified in the methimazole group. These results are shown in Fig. 1a and Tables 2 and 3.

Interactive effects of thyroid hormone L-NAME and AG on tumor variables In the control group, L-NAME produced a major reduction in tumor weight and total Hb content, with no significant change in Hb concentration and a nonsignificant reduction in AP activity. In the T₄-treated group, L-NAME produced a reduction in tumor weight versus untreated controls, with no significantly change in Hb concentration or content but a marked increase in AP activity. The methimazole+L-NAME-treated animals showed a similar reduction in tumor weight to that observed in the L-NAME group, with a reduction in total Hb relative to the tumor mass but with no changes in Hb concentration; GluAp and AspAp activities were increased, but AlaAp activity was not significantly changed. VEGF protein was significantly increased in the T₄+L-NAME group. These results are given in Fig. 1b and Tables 2 and 3.

The administration of AG to normal or T₄-treated mice produced no changes in tumor weight or Hb concentration or content versus their respective controls, but it markedly reduced the activity of all three APs and increased VEGF protein abundance in both groups versus the control group, but not significantly in the T₄+AG group versus the T₄ group. The results of this experiment are exhibited in Fig. 1c and Tables 2 and 3.

Fig. 1 Tumor weight in the experimental groups. Data are expressed as means±SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ versus controls. ⁺ $p<0.05$ versus their respective L-NAME nontreated group



Effects of tetrac on tumor variables The tetrac-treated group showed major reductions in tumor weight, Hb concentration, and total Hb and an increase in the activity of all three APs studied. In the T_4 -treated group, tetrac administration produced a reduction in tumor weight versus controls, a decrease in total Hb and in Hb concentration, and increased GluAp and AspAp activities but no change in AlaAp activity. Interestingly, the tetrac-induced inhibition of tumor weight was associated with increased AP activity. VEGF protein abundance was reduced in the Tetrac and T_4 +Tetrac groups versus the control and T_4 groups, respectively. These results are shown in Fig. 1d and Tables 2 and 3.

Correlation studies When all data were pooled in a common regression line, tumor weight was negatively correlated with

the activity of all APs (Fig. 2). Total Hb showed a similar negative correlation with the AP activities. Regression analysis between tumor weight and total Hb content was $r=0.800$ ($p<0.0001$) when data from all groups were pooled. When the tumors from the control hyper- and hypothyroid mice were pooled in a common regression line, AP activity and tumor weight showed a very strong negative correlation (Fig. 3), which was disrupted by L-NAME treatment. When all groups were pooled in a common regression line, VEGF was negatively correlated with the activity of the three APs (Fig. 4) and positively correlated with the Hb concentration expressed in micrograms Hb/milligram protein ($r=0.64$, $p<0.01$) and with tumor weight ($r=0.57$, $p<0.01$). The correlation between VEGF and tumor weight was stronger ($r=0.79$, $p<0.0001$) when the L-NAME-treated groups were excluded from the analysis.

Table 2 Hemoglobin content and concentration in the experimental groups [hemoglobin concentration in the tumor (mg/g)/blood hemoglobin g/dl]

Groups	Hemoglobin concentration ($\mu\text{g Hb/mg protein}$)	Total hemoglobin (mg)	Hemoglobin (mg/g)	Ratio hemoglobin concentration in the tumor (mg/g)/blood hemoglobin (g/dl)
Control	351.0±30.5	2.61±0.35	7.01±0.61	0.53±0.15
T_4	321.6±25.3	3.05±0.27	6.43±0.50	0.54±0.08
Methimazole	283±19	1.80±0.28	5.67±0.38	0.54±0.09
L-NAME	415.8±60.0	1.45±0.22**	8.31±1.20	0.61±0.12
T_4 +L-NAME	386.3±36.5	2.55±0.48	7.72±0.73	0.55±0.07
Methimazole+L-NAME	388±79	0.63±0.07**	7±1.59	0.63±0.12
AG	398±36	2.59±0.76	7.96±0.73	0.56±0.04
T_4 +AG	338.0±36.5	3.05±0.71	6.76±0.73	0.54±0.09
Tetrac	195.6±17.9***	0.60±0.12***	3.91±0.35*	0.29±0.03*
T_4 +Tetrac	356.8±53.1	1.28±0.18**	11.1±3.48	0.76±0.18

Data expressed as means±SEM
* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ versus controls

Table 3 VEGF and Aminopeptidase activities in the experimental groups

Groups	VEGF % absorbance	GluAp (pmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	AlaAp (nmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	AspAp (pmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)
Control	100±14.4	0.30±0.03	2.22±0.31	0.04±0.01
T ₄	190.2±29.7*	0.27±0.04	1.78±0.24	0.03±0.01
Methimazole	110.2±13.5	0.71±0.08***	3.38±0.30*	0.07±0.01*
L-NAME	181.4±58.1	0.25±0.05	0.96±0.07	0.02±0.01
T ₄ +L-NAME	249.5±53.9**	0.20±0.02	0.87±0.07*	0.01±0.01**
Methimazole+L-NAME	136.4±32.8	1.35±0.21***	3.12±0.29	0.08±0.02*
AG	182.3±28.1**	0.13±0.01*	0.85±0.02***	0.01±0.01**
T ₄ +AG	218.7±41.8*	0.17±0.02**	0.89±0.11*	0.01±0.01**
Tetrac	70±5*	1.19±0.12***	10.8±1.22***	0.15±0.03***
T ₄ +Tetrac	109.2±21.0	1.51±0.07***	3.30±0.56	0.07±0.01*

Data expressed as means±SEM

p*<0.05, *p*<0.01, ****p*<0.001 versus controls

Discussion

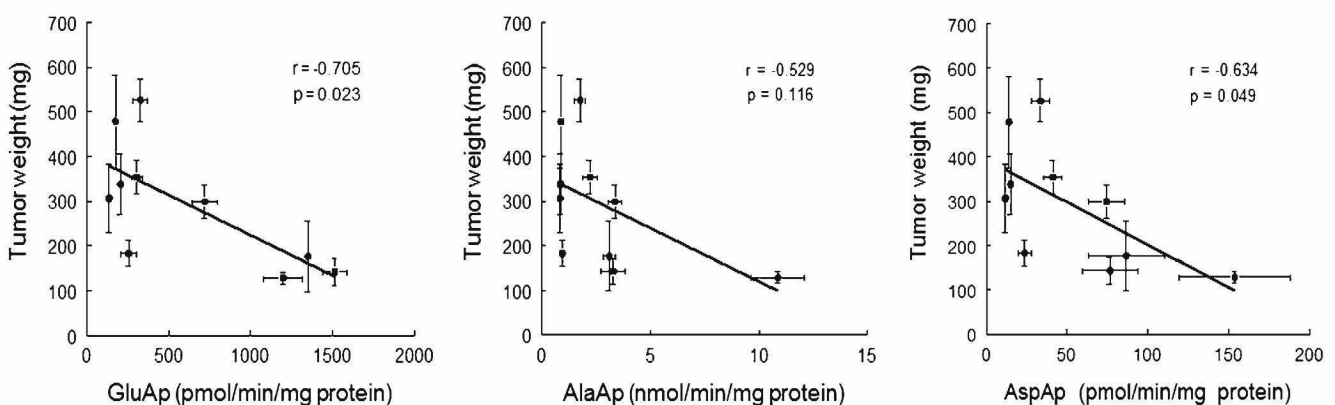
T₄ treatment increased tumor weight in mice without significantly changing the tumor tissue Hb concentration, suggesting that T₄ promotes tumor development associated with a proportional increase in neovascularization and in the tumor expression of the angiogenic factor VEGF. The stimulating effect of T₄ on tumor weight is consistent with previous findings that thyroid hormone excess enhances the proliferation of pituitary, breast, ovarian, and prostatic cancer cell lines [3–5]. In contrast, thyroid hormone nuclear receptors, which mediate the biological activity of T₃ via transcriptional regulation, were recently described as tumor suppressors [33]. The reasons for these contradictory findings are not clear, but they may be related to the type of tumor studied. In this context, it is important to draw a distinction between proliferation and oncogenesis. Thus, the proliferation of already-established cancer cells is promoted by T₄ and T₃ [34], but there is little evidence that the thyroid hormone is oncogenic.

VEGF increased in the tumors of all groups of mice treated with T₄, both normal and AG-treated mice, clearly indicating that T₄ activates VEGF production. Given that the Hb concentration was not increased in tumors of the T₄-treated mice,

it is possible that VEGF may contribute to match the angiogenic response to tumor growth. These data are in consonance with previous reports that the angiogenic response to thyroid hormone is in part mediated by VEGF [35]. Several potential factors may determine the elevated VEGF levels in the tumors of T₄-treated mice, including angiotensin II [36] or NO [37], which are increased in the hyperthyroid state [10].

VEGF was positively correlated with Hb concentration and with tumor weight in the present study, indicating that VEGF participated in the angiogenic response to tumor cells and in tumor growth under our experimental conditions.

Cellular actions of thyroid hormone may be initiated within the cell nucleus, at the plasma membrane, in cytoplasm, and at the mitochondrion [34]. Recently, a structural protein of the plasma membrane, integrin $\alpha v \beta 3$, has been shown to contain a binding domain for iodothyronines that is an initiation site for hormone-directed complex cellular events, such as cell division [38] and angiogenesis [39]. This qualifies $\alpha v \beta 3$ integrin binding site as a plasma membrane receptor for thyroid hormone [39]. Tetrac blocks the binding of agonist thyroid hormone analogs T₄ and T₃ to the integrin receptor on the cell surface and inhibits the cell proliferation effects of thyroid hormone [39]. The $\alpha v \beta 3$ integrin is connected to the receptors

**Fig. 2** Graphs showing the relationship between tumor weight and aminopeptidase activities when all data were pooled in a common regression line

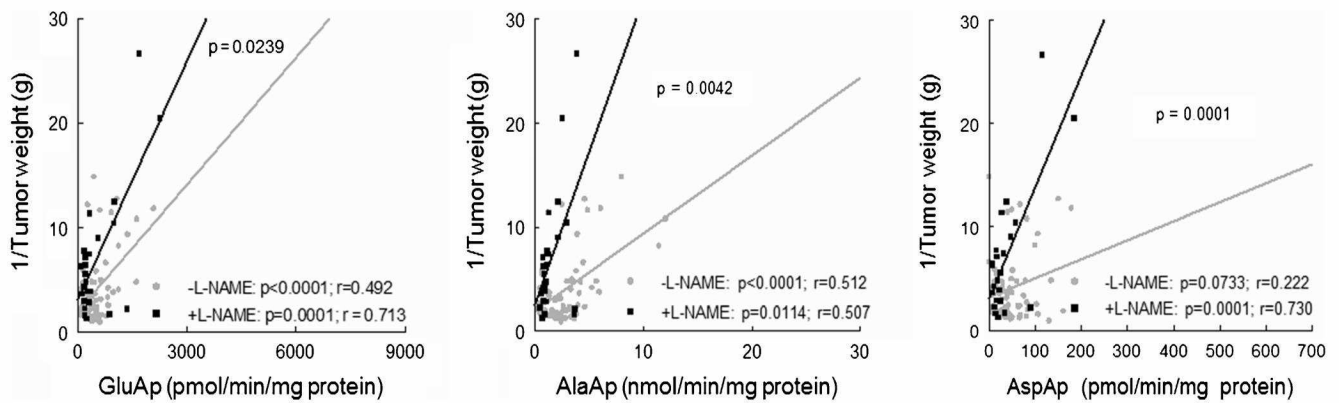


Fig. 3 Graphs showing the inverse relationship between tumor weight and aminopeptidase activities when the data of control, T₄, and methimazole groups and the same groups treated with L-NAME were

pooled in a common regression line. *p* values of the differences in slopes are displayed between the regression lines in each graph. *p* value and correlation coefficient of each regression line are also displayed

of proangiogenic agents [40, 41] whose activity is blocked by tetrac [25]. Tetrac is also antiangiogenic in the absence of thyroid hormone [25]. Daily treatment with tetrac was reported to reduce the growth of human medullary thyroid carcinoma [31] and the proliferation of nonsmall cell lung cancer cells [32] in murine xenograft models in association with a reduction in neovascularization, measured as tumor tissue Hb content. In the present study, tetrac induced a reduction in tumor weight, tumor vascularization, and tumor VEGF levels. Tetrac also arrested tumor growth and restored normal VEGF levels in tumors of T₄-treated mice, indicating that plasma membrane $\alpha v\beta 3$ integrin activation is an essential mechanism for T₄-promoted tumor growth and angiogenesis. These results add to the documented effects of tetrac in blocking VEGF-induced angiogenesis [25] and reveal that it also reduces tumor tissue VEGF levels.

Although several studies in rats [8] and mice [6, 7, 9] have reported that the hypothyroid state is associated with a decreased tumor weight, the present results show that tumor weight, Hb concentration levels, and total Hb were reduced in methimazole-treated hypothyroid mice, although statistical significance was not reached.

L-NAME reduced the tumor weight without significantly changing the HB concentration. This suggests that NO inhibition affects the tumor weight and tumor vascularization to a

similar degree. L-NAME also reduced the tumor weight in T₄-treated mice without significant changes in HB concentration or content. These results indicate that NO inhibition also affects proportionally tumor weight and tumor-associated neovascularization in T₄-treated mice. These findings agree with previous reports that NO promotes tumor growth through the stimulation of tumor angiogenesis [13] and that L-NAME inhibits tumor-induced angiogenesis [42]. L-NAME reduced tumor weight matched to the total Hb but did not reduce VEGF levels in tumors of the control, hypothyroid, or hyperthyroid mice, likely attributable to the blockade by L-NAME of NO [43], which is a downstream mediator of VEGF-induced angiogenesis.

Induction of iNOS with lipopolysaccharide and interferon- γ in murine mammary tumor cells stimulates tumor growth and metastasis [44], and iNOS has been detected in stromal elements of a majority of gastric carcinomas [45]. Furthermore, iNOS transduction in a human colon adenocarcinoma line enhanced tumor growth and vascularity when transplanted in nude mice [46]. In the present study, however, administration of the iNOS inhibitor AG [26–29] did not modify the tumor weight or Hb content in normal or T₄-treated mice, suggesting that the iNOS may not play a role in tumor growth or angiogenesis, at least in our model.

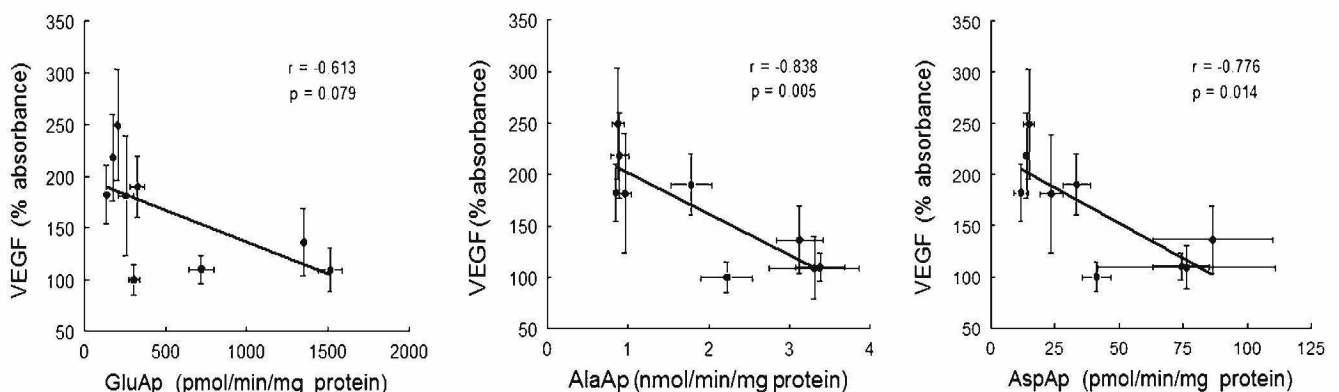


Fig. 4 Relationship between vascular endothelial growth factor (VEGF) and aminopeptidase activities when all data were pooled in a common regression line

GluAp and AlaAp, also called ApA and ApN, respectively, have been recognized as promoters of tumor growth and angiogenesis [20–22]. Besides cleaving angiotensin II, APN/CD13 can degrade the extracellular matrix, is overexpressed on tumor cells, and appears to play a role in tumor invasion, metastasis, and angiogenesis [20–22]. However, a decrease in APN activity has also been reported in C6 gliomas implanted in rats [47], in *N*-methyl-nitrosourea-induced mammary tumors in rats [48], and in meningiomas [49]. Our data are in line with the latter findings, given the negative correlation observed between tumor weight and the activity of the three APs analyzed, which suggests that an increased activity of these peptidases may have a potential role against tumor development. This correlation was closer in the tumors from control hyper- and hypothyroid groups and a strong inverse relationship was also observed between tumor weight and AP activities in the tetrac-treated mice. However, L-NAME produced a reduction in tumor weight associated with a decrease in AP activities, except in the L-NAME+methimazole group in which hypothyroid-related effects appeared to predominate. The AG-treated groups showed a marked reduction in tumor tissue AP activities, suggesting that iNOS positively modulates the activity of these enzymes. This effect might participate in the reduction of AP activities in the L-NAME groups.

The reason for the strong negative correlation between AP and VEGF protein abundance in the tumors is not clear, and it does not prove a causal relationship; however, it is consistent with the negative relationship between AP activity and tumor weight.

In conclusion, the angiogenesis and tumor growth induced by T₄ is mediated in part by NO and is dependent on activation of the $\alpha v\beta 3$ integrin. NO blockade reduces tumor growth, regardless of the thyroid status. Thyroid hormone negatively modulates AP activities in tumor tissue. VEGF protein abundance correlates negatively with the three APs measured. Finally, tetrac produces a reduction in tumor weight associated with increased AP activity.

Conflicts of interest None

Funding This study was supported by a grant (SAF2009-12294) from the Ministry of Education and Science and from the Carlos III Health Institute of the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs (Red de Investigación Renal, REDinREN 012/0021) “FEDER una manera de hacer Europa”.

References

- Moeller LC, Führer D. Thyroid hormone, thyroid hormone receptors, and cancer: a clinical perspective. *Endocr Relat Cancer*. 2013;20:R19–29.
- Hellevik AI, Asvold BO, Bjoro T, Romundstad PR, Nilsen TIL, Vatten LJ. Thyroid function and cancer risk: a prospective population study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18:570–4.
- Barrera-Hernandez G, Park KS, Dace A, Zhan Q, Cheng SY. Thyroid hormone-induced cell proliferation in GC cells is mediated by changes in G1 cyclin/cyclin-dependent kinase levels and activity. *Endocrinology*. 1999;140:5267–74.
- Hall LC, Salazar EP, Kane SR, Liu N. Effects of thyroid hormones on human breast cancer cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;109:57–66.
- Tsui KH, Hsieh WC, Lin MH, Chang PL, Juang HH. Triiodothyronine modulates cell proliferation of human prostatic carcinoma cells by downregulation of the B-cell translocation gene 2. *Prostate*. 2008;68:610–9.
- Kumar MS, Chiang T, Deodhar SD. Enhancing effect of thyroxine on tumor growth and metastases in syngeneic mouse tumor systems. *Cancer Res*. 1979;39:3515–8.
- Shoemaker JP, Bradley RL, Hoffman RV. Increased survival and inhibition of mammary tumors in hypothyroid mice. *J Surg Res*. 1976;21:151–4.
- Mishkin SY, Pollack R, Yalovsky MA, Morris HP, Mishkin S. Inhibition of local and metastatic hepatoma growth and prolongation of survival after induction of hypothyroidism. *Cancer Res*. 1981;41:3040–5.
- Theodossiou C, Schwarzenberger P. Propylthiouracil reduces xenograft tumor growth in an athymic nude mouse prostate cancer model. *Am J Med Sci*. 2000;319:96–9.
- Vargas F, Moreno JM, Rodríguez-Gómez I, Wangenstein R, Osuna A, Alvarez-Guerra M, et al. Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. *Eur J Endocrinol*. 2006;154:197–212.
- Carrillo-Sepúlveda MA, Ceravolo GS, Bruno-Fortes Z, Carvalho MH, Tostes RC, Laurindo FR, et al. Thyroid hormone stimulates NO production via activation of the PI3K/Akt pathway in vascular myocytes. *Cardiovasc Res*. 2010;85:560–70.
- Lind DS. Arginine and cancer. *J Nutr*. 2004;134:2837S–41.
- Morbideilli L, Donnini S, Ziche M. Role of nitric oxide in tumor angiogenesis. *Cancer Treat Res*. 2004;117:155–67.
- Cianchi F, Cortesini C, Fantappie O, Messerini L, Sardi I, Lasagna N. Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10:2694–704.
- Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med*. 2003;35:21–7.
- Chen T, Nines RG, Peschke SM, Kresty LA, Stoner GD. Chemopreventive effects of a selective nitric oxide synthase inhibitor on carcinogen-induced rat esophageal tumorigenesis. *Cancer Res*. 2004;64:3714–24.
- Jadeski LC, Chakraborty C, Lala PK. Nitric oxide mediated promotion of mammary tumour cell migration requires sequential activation of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and mitogen-activated protein kinase. *Int J Cancer*. 2003;106:496–504.
- Schleiffer R, Duranton B, Gosse F, Bergmann C, Raul F. Nitric oxide synthase inhibition promotes carcinogen-induced preneoplastic changes in the colon of rats. *Nitric Oxide*. 2000;4:583–9.
- Ardaillou R, Chansel D. Synthesis and effects of active fragments of angiotensin II. *Kidney Int*. 1997;52:1458–68.
- Nanus DM, Bogenrieder T, Papandreou CN, Finstad CL, Lee A, Vlamis V, et al. Aminopeptidase A expression and enzymatic activity in primary human renal cancers. *Int J Oncol*. 1998;13:261–7.
- Gullbo J, Wickstrom M, Larsson R, Nygren P. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Sci*. 2011;102:501–8.
- Khakoo AY, Sidman RL, Pasqualini R, Arap W. Does the renin-angiotensin system participate in regulation of human vasculogenesis and angiogenesis? *Cancer Res*. 2008;68:9112–5.

23. Segarra AB, Ramirez M, Banegas I, Hermoso F, Vargas F, Vives F, et al. Influence of thyroid disorders on kidney angiotensinase activity. *Horm Metab Res.* 2006;38:48–52.
24. Segarra AB, Wangenstein R, Ramirez M, Banegas I, Hermoso F, Vargas F, et al. Atrial angiotensinase activity in hypothyroid, euthyroid, and hyperthyroid rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;48:117–20.
25. Mousa SA, Bergh JJ, Dier E, Rebbaa A, O'Connor LJ, Yalcin M, et al. Tetraiodothyroacetic acid, a small molecule integrin ligand, blocks angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Angiogenesis.* 2008;11:183–90.
26. Griffiths MJ, Messent M, MacAllister RJ, Evans TW. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol.* 1993;110:963–8.
27. Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Milton RG, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol.* 1993;233:119–25.
28. Ortiz MC, Fortepiani LA, Martínez C, Atucha NM, García-Estañ J. Renal and pressor effects of aminoguanidine in cirrhotic rats with ascites. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7:2694–9.
29. Tan DY, Meng S, Cason GW, Manning Jr RD. Mechanisms of salt sensitive hypertension: role of inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol.* 2000;279:R2297–303.
30. Düwel A, Eleno N, Jerkic M, Arevalo M, Bolaños JP, Bernabeu C, et al. Reduced tumor growth and angiogenesis in endoglin-haploinsufficient mice. *Tumour Biol.* 2007;28:1–8.
31. Yalcin M, Dyskin E, Lansing L, Bharali DJ, Mousa SS, Bridoux A, et al. Tetraiodothyroacetic acid (tetrac) and nanoparticulate tetrac arrest growth of medullary carcinoma of the thyroid. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:1972–80.
32. Mousa SA, Yalcin M, Bharali DJ, Meng R, Tang H-Y, Lin H-Y, et al. Tetraiodothyroacetic acid and its nanoformulation inhibit thyroid hormone stimulation of non-small cell lung cancer cells in vitro and its growth in xenografts. *Lung Cancer.* 2012;76:39–45.
33. Aranda A, Martínez-Iglesias O, Ruiz-Llorente L, García-Carpizo V, Zambrano A. Thyroid receptor: roles in cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20:319–24.
34. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev.* 2010;31:139–70.
35. Luidens MK, Mousa SA, Davis FB, Lin HY, Davis PJ. Thyroid hormone and angiogenesis. *Vasc Pharmacol.* 2010;52:142–5.
36. Deshayes F, Nahmias C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16:293–9.
37. Frank S, Stallmeyer B, Kampfer H, Schaffner C, Pfeilschifter J. Differential regulation of vascular endothelial growth factor and its receptor fms-like tyrosine kinase is mediated by nitric oxide in rat renal mesangial cells. *Biochem J.* 1999;338:367–74.
38. Davis FB, Tang HY, Shih A, Keating T, Lansing L, Hercbergs A, et al. Acting via a cell surface receptor, thyroid hormone is a growth factor for glioma cells. *Cancer Res.* 2006;66:7270–5.
39. Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S. Integrin $\alpha v \beta 3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology.* 2005;146:2864–71.
40. Masson-Gadais B, Houle F, Laferrière J, Huot J. Integrin $\alpha v \beta 3$ requirement for VEGFR2-mediated activation of SAPK2/p38 and Hsp90-dependent phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells activated by VEGF. *Cell Stress Chaperones.* 2003;8:37–52.
41. Sahni A, Francis CW. Stimulation of endothelial cell proliferation by FGF-2 in the presence of fibrinogen requires $\alpha v \beta 3$. *Blood.* 2004;104:3635–41.
42. Jadeski LC, Hum KO, Chakraborty C, Lala PK. Nitric oxide promotes murine mammary tumour growth and metastasis by stimulating tumour cell migration, invasiveness and angiogenesis. *Int J Cancer.* 2000;86:30–9.
43. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ, et al. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest.* 1997;99:2625–34.
44. Edwards P, Cendan JC, Topping DB, Moldawer LL, Mackay S, Copeland EM, et al. Tumor cell nitric oxide inhibits cell growth in vitro, but stimulates tumorigenesis and experimental lung metastasis in vivo. *J Surg Res.* 1996;63:49–52.
45. Thomsen LL, Miles DW. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from human tumors. *Cancer Metastasis Rev.* 1998;17:107–18.
46. Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, et al. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:4392–6.
47. Mayas MD, Ramírez-Expósito MJ, Carrera MP, Cobo M, Martínez-Martos JM. Renin–angiotensin system-regulating aminopeptidases in tumor growth of rat C6 gliomas implanted at the subcutaneous region. *Anticancer Res.* 2012;32:3675–82.
48. Del Pilar CM, Ramírez-Expósito MJ, Mayas MD, García MJ, Martínez-Martos JM. Mammary renin–angiotensin system-regulating aminopeptidase activities are modified in rats with breast cancer. *Tumor Biol.* 2010;31:583–8.
49. Mawrin C, Wolke C, Haase D, Krüger S, Firsching R, Keilhoff G, et al. Reduced activity of CD13/aminopeptidase N (APN) in aggressive meningiomas is associated with increased levels of SPARC. *Brain Pathol.* 2010;20:200–10.

The pro-oxidant buthionine sulfoximine (BSO) reduces tumor growth of implanted Lewis lung carcinoma in mice associated with increased protein carbonyl, tubulin abundance, and aminopeptidase activity

Isabel Rodríguez-Gómez · Javier Carmona-Cortés · Rosemary Wangenstein · Pablo Vargas-Tendero · Inmaculada Banegas · Andrés Quesada · Ángel M. García-Lora · Félix Vargas

Received: 19 February 2014 / Accepted: 1 May 2014 / Published online: 11 May 2014
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2014

Abstract This study evaluated the effects of the pro-oxidant buthionine sulfoximine (BSO) and of the interaction between BSO and TETRAC, an antagonist of $\alpha v \beta 3$ integrin, on tumor development and aminopeptidase (AP) activity in a murine model of implanted Lewis's carcinoma. Male CBA-C57 mice were untreated (controls) or treated with BSO (222 mg/100 mL in drinking water), TETRAC (10 mg/kg/day, i.p.), or BSO + TETRAC. BSO for 28 days and TETRAC were given for the last 20 days. Mice were subcutaneously inoculated with 1×10^6 Lewis carcinoma 3LL cells into the dorsum. Study variables were tumor weight (TW); Hb, as index of tumor-mediated angiogenesis; vascular endothelial growth factor (VEGF) protein abundance; protein carbonyl content; α -tubulin abundance; and GluAp, AlaAp, and AspAp activities. BSO produced a major decrease in TW (203 ± 18 mg) with respect to controls (365 ± 26) and a reduction in Hb content. The TETRAC group also showed marked reductions in TW (129 ± 15) and Hb concentration associated with a reduced VEGF content. The BSO + TETRAC group showed a major TW reduction (125 ± 13); although, the difference with

the TETRAC group was not significant. BSO treatment increased protein carbonyl and tubulin abundance in comparison to controls. The activity of all APs was increased in the three experimental groups and was strongly and negatively correlated with TW. In conclusion, administration of BSO reduced the TW, which inversely correlated with protein carbonyl content, suggesting a loss of microtubule polymerization. The finding of a negative correlation between TW and AP activity opens up new perspectives for the study of APs as tumor growth modulators.

Keywords Tumor growth · Protein carbonyl · BSO · TETRAC · Aminopeptidases

Introduction

Antioxidants are widely used to protect cells from damage induced by oxidative stress. The belief that antioxidants protect against cancer development is widely held and has been supported by cellular and preclinical studies [1–3]. However, experimental data and clinical trials suggest that structurally unrelated antioxidants such as isoflavones, carotenes, vitamins, and *N*-acetylcysteine (NAC) should not be recommended for lung cancer prevention and may even increase cancer risk and promote tumor growth [4–7]. Thus, a trial of vitamin E and selenium for prostate cancer prevention was halted when prostate cancer was found to be more frequent in the vitamin E group than in controls [8]. Sayin et al. [9] recently reported that dietary supplementation with the antioxidants *N*-acetylcysteine (NAC) and vitamin E in mice bearing mutations was associated with an increase in lung cancer risk and

I. Rodríguez-Gómez · P. Vargas-Tendero · F. Vargas (✉)
Departamento de Fisiología,
Facultad de Medicina, 18012 Granada, Spain
e-mail: fvargas@ugr.es

J. Carmona-Cortés · R. Wangenstein (✉) · I. Banegas · A. Quesada
Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén,
Jaén, Spain
e-mail: rwangens@ujaen.es

Á. M. García-Lora
Servicio de Análisis Clínicos, Inmunología,
Hospital Virgen de las Nieves, 18012 Granada, Spain

tumor promotion, with the development of more numerous and more aggressive lung tumors that reduced the survival of the animals by half.

Glutathione (GSH) is a nonprotein thiol with diverse biological functions, including protection against oxidative stress, detoxification of xenobiotics, and bioreductive reactions [10]. It plays an important role in the resistance of tumors to cytostatics, and elevation of intracellular GSH is associated with resistance to irradiation and its reduction with sensitization to these therapies [11–17]. Thus, the efficacy of some anticancer agents was enhanced by using the GSH synthesis inhibitor buthionine sulfoximine (BSO) to deplete GSH [13–17]. Other pro-oxidant agents have also been found to possess anticancer activity, proving capable of inducing cell death associated with reactive oxygen species (ROS) generation and GSH depletion [13–17], and the combination of BSO with these agents further enhanced ROS production and apoptosis in tumor cells [13–17]. However, the combination of BSO with melphalan showed no additional therapeutic effect in advanced solid tumors [18]. Moreover, it was even reported [19] that the treatment of mice with BSO significantly increased benzo[a]pyrene-induced tumor multiplicity in the lung and forestomach.

Tetraiodothyroacetic acid (TETRAC) is a thyroid hormone analogue that inhibits the $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin receptor. The $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin is also connected to the receptors of proangiogenic agents that promote tumor growth [20, 21], whose activity is blocked by TETRAC [22]. Daily treatment with TETRAC reduces tumor growth in murine xenograft models [23, 24] in association with a reduced tumor-mediated angiogenesis, measured as tumor tissue Hb content and increases aminopeptidase (AP) activity [24].

With this background, we investigated the influence of the pro-oxidant BSO on tumor growth and on protein carbonyl content, α -tubulin abundance, and AP activity in a mouse model of lung cancer induced with implanted Lewis carcinoma 3LL cells. Moreover, we also examined the effect of the interaction between BSO and TETRAC on tumor growth, angiogenesis, and AP activity.

Materials and methods

Animals

We used 40 male CBA-C57 mice born and raised at the Granada University animal center. Animal care and work protocols were approved and carried out in accordance with the regulations established by the Committee of Animal Research and Bioethics of Granada University and with European Union guidelines for the ethical care of animals. The mice, initially weighing 20–25 g, were randomly distributed among different experimental groups. All animals had free access to

standard mice diet (rodent toxicology diet, B&K, Barcelona, Spain) and tap water or their respective drinking fluid *ad libitum*.

Cells and cell culture

Lewis carcinoma 3LL cells provided by Dr. A. Lora (Department of Immunology, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain) were cultured in RPMI medium supplemented with 5 % FCS, standard antibiotics, and L-glutamine, all from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Cells were maintained in a humidified 5 % CO₂ atmosphere at 37 °C.

Tumor induction

Mice were subcutaneously inoculated into the dorsum with 1×10^6 exponentially growing cells. After 9 days, mice were deeply anesthetized with Equithesin (25 $\mu\text{L}/10$ g). Tumors were rapidly removed, weighed, and immediately frozen until analyses of Hb, vascular endothelial growth factor (VEGF) protein abundance, protein carbonyl content, α -tubulin abundance, and AP activity. Liver samples were immediately harvested, cleaned, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until analysis of total GSH content.

Experimental protocols

Mice were assigned to one of four groups: control, BSO (222 mg/100 mL, 10 mmol/L in drinking water), TETRAC (10 mg/kg/day, *i.p.*), or BSO + TETRAC. BSO was administered for 28 days, and TETRAC was given at 20 days before the end of the experimental period. This BSO dose caused glutathione depletion and increased oxidative stress in mice of the same strain in previous experiments in our laboratory [25].

Tumor variables studied were tumor weight (TW); Hb concentration, as a recognized index of tumor vascularization [23, 24, 26]; VEGF protein abundance; protein carbonyl content; α -tubulin abundance; and GluAp, AlaAp, and AspAp activities. Because of the large variations in TW, concentrations are preferred over absolute values as markers of angiogenesis.

GluAp, AlaAp, and AspAp activities were selected as possible biomarkers of tumor growth because they were found to be negatively correlated with tumor growth in a previous study by our group [24].

Four days before the experimental period was completed, all animals were housed in metabolic cages (Panlab, Barcelona, Spain) for collection of 24-h urine samples and had free access to food and water and their respective treatments for 4 days (2 days for adaptation + 2 experimental days). Total F₂-isoprostane excretion was measured, considering the mean results of two experimental days in the intergroup analyses. A sample was taken from the liver for total GSH measurement.

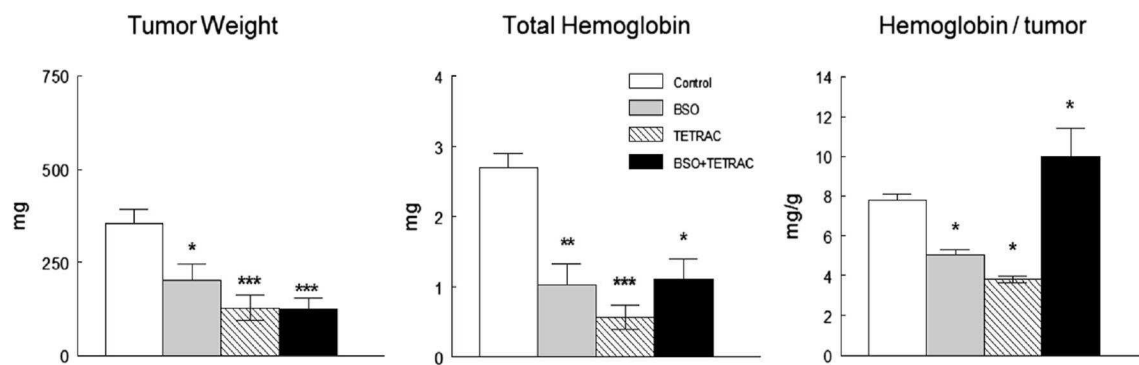


Fig. 1 Tumor weight, total hemoglobin, and hemoglobin concentration in the experimental groups. Data expressed as mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus controls ($n = 10$, each group)

Analytical procedures

All analytical procedures were carried out on ten mice per group except for the studies of protein carbonyl content and α -tubulin expression. Hb was measured by spectrophotometry using the Drabkin method. Tumor tissue was homogenized in distilled water and centrifuged at 16,000g for 5 min at 4 °C; 25 μ L of the supernatant was mixed with 225 μ L Drabkin's reagent (Sigma, Madrid, Spain) in a microplate at room temperature for 15 min, and the absorbance was measured at 540 nm. Hb concentration was determined by comparison with a standard curve from 0 to 20 mg/mL of bovine Hb dissolved in water.

AP activity was measured by homogenizing tumor tissues in 50 mM HCl-Tris (pH 7.4) containing 1 % Triton X-100 and centrifuging for 15 min at 1,000g. GluAp, AlaAp, and AspAp activities were determined in duplicate in a kinetic fluorimetric assay, using glutamyl-, alanyl-, and aspartyl- β -naphthylamide as respective substrates. Tissue protein was measured with the DC Protein Assay kit (Bio-Rad, Madrid, Spain).

VEGF abundance was quantified by indirect ELISA using a starter kit from Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, TX, USA). Briefly, homogenized tumor tissues containing 1 mg/mL of total protein were fixed in a 96-well plate overnight at 4 °C. After blocking, the plate was probed with 1 μ g/mL of rabbit anti-VEGF antibody (Merck Millipore, Billerica, MA,

USA) as primary antibody and 0.2 μ g/mL of mouse anti-rabbit HRP-linked IgG antibody (KPL Inc., Gaithersburg, MD, USA) as secondary antibody. All samples were measured in duplicate, and results were expressed as percentage of the mean absorbance in the control group.

Protein carbonyl content was analyzed in tumor tissues from control and BSO-treated groups with a 2,4-dinitrodiphenylhydrazine-based kit purchased from Sigma-Aldrich, Madrid, Spain. In order to avoid hemoglobin interference, one aliquot of each homogenate was assayed without reagent, and the absorbance of sample blanks was subtracted from the absorbance of their corresponding samples.

Expression of α -tubulin in tumors from control and BSO-treated groups was assayed by immunoblotting, subjecting 10 μ g of protein to SDS-PAGE and transferring to a PVDF membrane. After blocking with 5 % nonfat milk, the membrane was probed with rabbit anti- α tubulin polyclonal antibody (Labfrontier, Seoul, Korea) at 0.1 μ g/mL and a secondary HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (Biomedal, Sevilla, Spain). Bands were visualized with ECL (Amersham, Amersham, UK) in a CCD camera image system and quantified with the Image J program (NIH). Luminescence data were expressed as a percentage of the mean value in the control group.

For the determination of total F_2 -isoprostane (8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$), urine samples were hydrolyzed by incubation at

Table 1 VEGF and aminopeptidase activities in the experimental groups

Groups	VEGF % absorbance	GluAp nmol/min/mg protein	AlaAp nmol/min/mg protein	AspAp nmol/min/mg protein
Control	100 \pm 14.4	0.33 \pm 0.07	1.85 \pm 0.16	0.03 \pm 0.01
BSO	81 \pm 4.3	0.88 \pm 0.14***	6.70 \pm 1.43**	0.05 \pm 0.01
TETRAC	68 \pm 6.1*	1.22 \pm 0.15***	8.5 \pm 1.10***	0.16 \pm 0.02***
BSO + TETRAC	109.1 \pm 16.5	1.88 \pm 0.37***	5.66 \pm 1.76*	0.12 \pm 0.04**

Data expressed as means \pm SEM ($n = 10$, each group)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus controls

40 °C for 90 min with 10 M NaOH. Samples were allowed to cool and then neutralized with 2 M HCl. After centrifugation, the supernatant was collected for the assays. Total F₂-isoprostanes were measured using a competitive enzyme immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), and the total GSH content of the hepatic tissue was determined with the Cayman GSH assay kit (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, USA).

Statistical analyses

Statview software (Adept Scientific, Acton, MA, USA) was used for the statistical analysis. One-way ANOVA was applied to compare the mean \pm SD in each experimental group with that in its respective control group. $P < 0.05$ was considered significant. Regression studies and ANOVA studies were performed, using Statgraphics software (Adept Scientific) to analyze correlations of AP activities, protein carbonyl, and α -tubulin abundance with TW. $P < 0.05$ and $|r| > 0.5$ were considered a strong correlation.

Results

BSO and TETRAC reduced tumor weight and increased AP activities In comparison to the controls, the BSO-treated group showed significant reductions in TW, total Hb content, and Hb concentration. GluAp and AlaAp activities were significantly increased, but there was no difference in AspAp activity. VEGF protein abundance was slightly reduced, but significance was not reached. The TETRAC group showed a marked reduction in TW, Hb concentration, and total Hb versus controls, associated with an increased activity of all three APs, while tumor VEGF was reduced. The BSO + TETRAC group also evidenced a major reduction in TW, which was significant versus controls but not versus the TETRAC group, along with a significant decrease in Hb content but increase in Hb concentration and a major increase

Table 2 P value and correlation coefficient (r) of regression between AlaAp activity and tumor weight in the groups ($n=10$, each group)

Groups	P value	R
Control	0.0003***	-0.6395
BSO	0.0402*	-0.6886
TETRAC	0.0015**	-0.9136
BSO + TETRAC	0.0502*	-0.9412

$|r| > 0.5$

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

*** $p < 0.001$

in GluAp, AlaAp, and AspAp activities; VEGF protein abundance did not differ between the BSO + TETRAC-treated animals and controls (Fig. 1, Table 1)

Negative correlation between tumor weight and AP activities

When all data were pooled in a common regression line, TW showed a strong negative correlation with all AP activities (Fig. 2); separate analyses for each group also yielded high negative correlation coefficients. Table 2 compiles P values and correlation coefficients for the regression between AlaAp activity and TW in the groups' total Hb showed a similar negative correlation with all AP activities studied (data not shown).

Increase in oxidative stress variables in BSO-treated groups

The total GSH content of liver tissue was reduced in both BSO-treated groups versus their respective controls. Total F₂-isoprostane urinary excretion was significantly increased in both BSO-treated groups versus their respective controls (Table 3). These data indicate that the administration of BSO at the dose used in this study produced a state of oxidative stress and confirm previous observations in this model [25]. BSO treatment induced an increase in protein carbonyl content of the tumor tissues, which was inversely correlated with

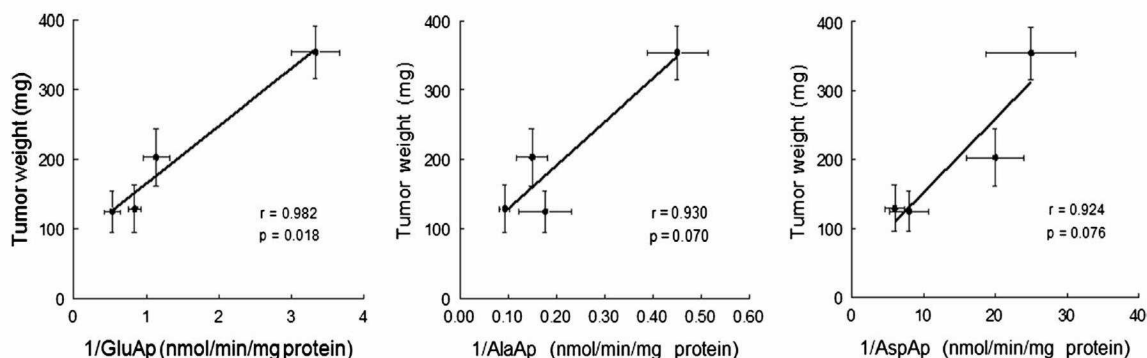


Fig. 2 Relationship between tumor weight and aminopeptidase activities when all data were pooled in a common regression line. GluAp, AlaAp, and AspAp = glutamyl-, alanyl-, and aspartyl-aminopeptidases, respectively

Table 3 Oxidative stress variables in the groups

Groups	Total GSH content in liver tissue ($\mu\text{mol/g}$ wet tissue)	Total F_2 -isoprostane urinary excretion ($\mu\text{g}/30 \text{ g}/24 \text{ h}$)
Control	5.8 ± 0.3	1.80 ± 0.15
BSO	$2.5 \pm 0.2^*$	$5.20 \pm 0.15^*$
TETRAC	4.9 ± 0.03	2.10 ± 0.14
BSO + TETRAC	$2.7 \pm 0.1^*$	$6.10 \pm 0.21^*$

Data expressed as means \pm EM ($n=10$, each group)

* $p < 0.01$ versus controls

TW (Fig. 3). Furthermore, the inverse correlation between protein carbonyl content and TW was higher in the BSO-treated group than in the control group (Fig. 3). BSO also induced an increased expression of α -tubulin (Fig. 4), which was correlated with the protein carbonyl content of each tumor. A strong inverse correlation with TW was found in the BSO-treated group, but there was no correlation between α -tubulin expression and TW in control mice.

Discussion

This study shows that BSO, a selective inhibitor of γ -glutamylcysteine synthetase, which induces glutathione depletion and increases oxidative stress, produces a marked reduction in TW in vivo, with a reduction in HB levels, suggesting that BSO reduces TW and tumor-induced angiogenesis when administered alone. The mechanism underlying this effect may be related to the carbonylation of cytoskeletal proteins, which are especially susceptible to oxidative stress and whose normal function is crucial for the development of tissues and, probably, tumors. Thus, the formation of protein carbonyls during GSH depletion has

been demonstrated in rat brain slices, identifying β -actin and α/β -tubulin as major carbonylation targets [27]. It has been demonstrated that carbonylated proteins accumulate due to a defect in the degradation of the modified proteins and/or resistance to proteolysis [28], explaining the higher expression of α -tubulin in the tumors from BSO-treated mice. It has also been reported that oxidation of tubulin with different treatments inhibits microtubule polymerization [29, 30] and that one of the main modulators of the redox state of tubulin is the GSH/glutaredoxin reductase system [31]. Hence, the pro-oxidant status induced by BSO may also inhibit microtubule polymerization with the consequent TW reduction. In the present study, we found a strong inverse correlation between TW and both protein carbonyl content and α -tubulin expression.

Several other potential mechanisms might participate in the antitumor activity of BSO. The increased oxidative stress induced by BSO may activate p53 protein, which protects against tumor progression, consistent with the recent report of a reduction in p53 after treatment with the antioxidants NAC and vitamin E [9]. Other studies have demonstrated that oncogenes such as K-RAS and B-RAF promote tumor growth by stimulating NRF2-mediated transcription of endogenous antioxidant genes [32, 33]. Moreover, kinetic studies suggest that GSH depletion stimulates c-Jun amino-terminal kinase and Bax translocation in HepG2 cells, with subsequent deregulation of mitochondria and proteolysis activation, leading to loss of membrane integrity, release of lactate dehydrogenase, and DNA degradation [15]. Further studies are required to elucidate the mechanism underlying the decrease in TW induced by BSO.

TETRAC administration for 21 days reduced tumor growth in association with a reduced tumor-associated neovascularization, measured as tumor tissue Hb content. These results agree with previous observations in human medullary thyroid carcinoma [23] and Lewis carcinoma 3LL cells [24]. TETRAC may exert this non-specific effect because its target,

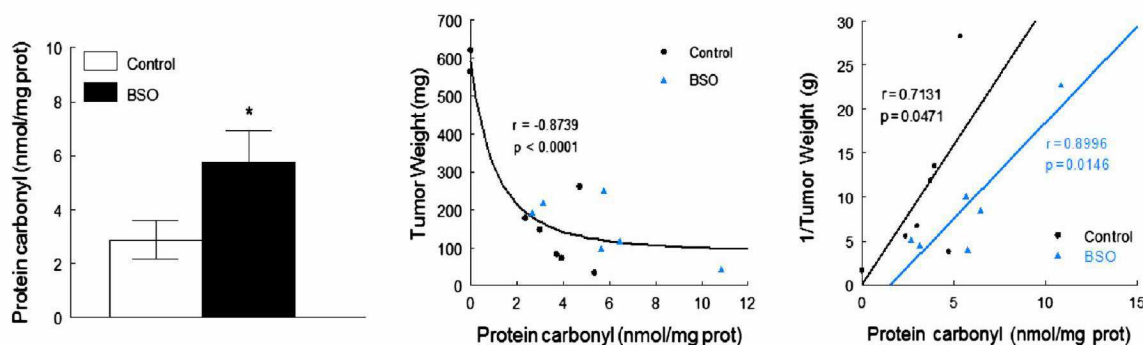


Fig. 3 Protein carbonyl content in control ($n=8$) and BSO-treated ($n=6$) groups. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$ versus control group (left). Graph showing the inverse relationship between tumor weight and protein carbonyl content when data of control and BSO groups were included in the same regression line

(middle). Graph showing inverse relationship between tumor weight and protein carbonyl content for control ($n=8$) and BSO ($n=6$) (right). P value and correlation coefficients of each regression line are also displayed

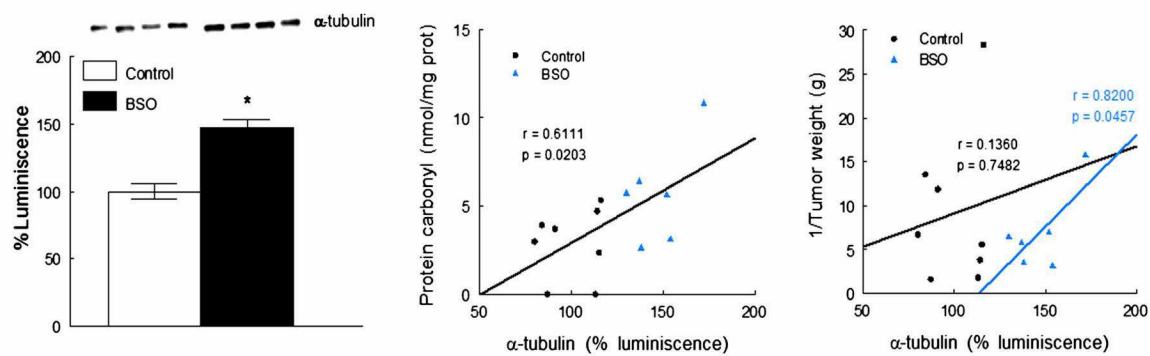


Fig. 4 Immunoblotting showing the expression of α -tubulin in tumors from control ($n=8$) and BSO-treated mice ($n=6$). Luminescence data were expressed as a percentage of the mean of control group. * $p < 0.001$ versus control (left). Graph showing correlation between α -tubulin expression and protein carbonyl content (middle). Inverse

relationship between α -tubulin expression and tumor weight in BSO-treated group ($n=6$) that was not observed in the control group ($n=8$) (right). P value and correlation coefficients of each regression line are also displayed

integrin $\alpha v \beta 3$, despite containing a binding domain for iodothyronines, is also connected to receptors of proangiogenic agents [20, 21] and participates in cell division [34]. Thus, TETRAC is also antiangiogenic in the absence of thyroid hormone [22].

The marked decrease in tumor growth obtained by the combination of BSO and TETRAC was not greater than that produced by the administration of TETRAC alone, indicating that inhibition of $\alpha v \beta 3$ integrin activation is a major factor in carcinogenesis. These results agree with findings by Bailey et al. [18] that the combination of BSO with melphalan, an alkylating anticancer agent, had no additional therapeutic effect on solid tumors; however, they contrast with reports that ROS production and apoptosis in tumor cells were further enhanced when BSO was combined with anticancer drugs with pro-oxidant activity [13–17]. These data would indicate that TETRAC does not possess an oxidative stress mechanism.

Unexpectedly, the association of BSO with TETRAC produced an increase in tumor-mediated angiogenesis, suggesting that BSO interferes with the known antiangiogenic activity of TETRAC [21, 22, 35].

We investigated GluAP, AlaAP, and AspAP activities and their relationship with tumor growth. These activities, which were reduced in BSO- and TETRAC-treated mice, were negatively correlated with TW, suggesting a possible role for these enzymes against tumor progression. This observation is in line with an earlier report from our lab [24] and consistent with previous findings of decreased APN (i.e., AlaAP) activity in untreated C6 gliomas implanted in rats [36], N-methylnitrosourea-induced mammary tumors in rats [37], and meningiomas [38].

The reduced TW in BSO- and TETRAC-treated groups was accompanied by a decrease in VEGF protein abundance, suggesting the participation of VEGF in tumor progression. Our data agree with previous reports that VEGF correlates positively with TW and negatively with the activity of these three APs [24].

In conclusion, administration of the GSH inhibitor BSO reduced TW in mice in association with a decrease in tumor-mediated angiogenesis; and the reduction in TW was related to the oxidation of cytoskeletal proteins. TW was negatively correlated with GluAP, AlaAP, and AspAP activities, which opens up new perspectives for the study of APs as modulators of tumor growth.

Acknowledgments This study was supported by a grant (CTS-6704) from the Junta de Andalucía and from the Carlos III Health Institute of the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs (Red de Investigación Renal, REDinREN 012/0021). “FEDER una manera de hacer Europa.”

Conflicts of interest None

References

- Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science*. 1997;275:1649–52.
- Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med*. 2005;11:1306–13.
- Vafa O, Wade M, Kern S, Beeche M, Pandita TK, Hampton GM, et al. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell*. 2002;9:1031–44.
- Watson J. Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open Biol*. 2013;3:120144.
- Allred CD, Allred KF, Ju YH, Virant SM, Helferich WG. Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner. *Cancer Res*. 2001;61:5045–50.
- Cortés-Jofré M, Rueda JR, Corsini-Muñoz G, Fonseca-Cortés C, Carabaloso M, Bonfill Cosp X. Drugs for preventing lung cancer in healthy people. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;10, CD002141.
- Robinson C, Woo S, Walsh A, Nowak AK, Lake RA. The antioxidants vitamins A and E and selenium do not reduce the incidence of asbestos-induced disease in a mouse model of mesothelioma. *Nutr Cancer*. 2012;64:315–22.

8. Klein EA, Thompson Jr IM, Tangen CM, Crowley JJ, Lucia MS, Goodman PJ, et al. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the selenium and vitamin E cancer prevention trial (SELECT). *JAMA*. 2011;306:1549–56.
9. Sayin VI, Ibrahim MX, Larsson E, Nilsson JA, Lindahl P, Bergo MO. Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Sci Transl Med*. 2014;6:221ra15.
10. Bailey HH. L-S, R-buthionine sulfoximine: historical development and clinical issues. *Chem Biol Interact*. 1998;111–112:239–54.
11. Awasthi YC, Chaudhary P, Vatsyayan R, Sharma A, Awasthi S, Sharma R. Physiological and pharmacological significance of glutathione-conjugate transport. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2009;12:540–51.
12. Carames M, Alonso-Varona A, García-Alonso I, Palomares T. Glutathione modulators reverse the pro-tumour effect of growth factors enhancing WiDr cell response to chemotherapeutic agents. *Anticancer Res*. 2010;30:1223–32.
13. Maeda H, Hori S, Ohizumi H, Segawa T, Kakehi Y, Ogawa O, et al. Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of arsenic trioxide and L-buthioninesulfoximine. *Cell Death Differ*. 2004;11:737–46.
14. Hancock CN, Stockwin LH, Han B, Divelbiss RD, Jun JH, Malhotra SV, et al. A copper chelate of thiosemicarbazone NSC 689534 induces oxidative/ER stress and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2011;50:110–21.
15. Hernández-Breijo B, Monserrat J, Ramírez-Rubio S, Cuevas EP, Vara D, Díaz-Laviada I, et al. Preclinical evaluation of azathioprine plus buthionine sulfoximine in the treatment of human hepatocarcinoma and colon carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2011;17:3899–911.
16. Kaushik G, Kaushik T, Yadav SK, Sharma SK, Ranawat P, Khanduja KL, et al. Curcumin sensitizes lung adenocarcinoma cells to apoptosis via intracellular redox status mediated pathway. *Indian J Exp Biol*. 2012;50:853–61.
17. You BR, Park WH. Zebularine-induced apoptosis in Calu-6 lung cancer cells is influenced by ROS and GSH level changes. *Tumor Biol*. 2013;34:1145–53.
18. Bailey HH, Ripple G, Tutsch KD, Arzoomanian RZ, Alberti D, Feierabend C, et al. Phase I study of continuous-infusion L-S, R-buthionine sulfoximine with intravenous melphalan. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:1789–96.
19. Srivastava SK, Xia H, Pal A, Hu X, Guo J, Singh SV. Potentiation of benzo[a]pyrene-induced pulmonary and forestomach tumorigenesis in mice by D, L-buthionine-S, R-sulfoximine-mediated tissue glutathione depletion. *Cancer Lett*. 2000;153:35–9.
20. Masson-Gadais B, Houle F, Laferrière J, Huot J. Integrin $\alpha\beta 3$ requirement for VEGFR2-mediated activation of SAPK2/p38 and Hsp90-dependent phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells activated by VEGF. *Cell Stress Chaperones*. 2003;8:37–52.
21. Sahni A, Francis CW. Stimulation of endothelial cell proliferation by FGF-2 in the presence of fibrinogen requires $\alpha\beta 3$. *Blood*. 2004;104:3635–41.
22. Mousa SA, Bergh JJ, Dier E, Rebbaa A, O'Connor LJ, Yalcin M, et al. Tetraiodothyroacetic acid, a small molecule integrin ligand, blocks angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Angiogenesis*. 2008;11:183–90.
23. Yalcin M, Dyskin E, Lansing L, Bharali DJ, Mousa SS, Bridoux A, et al. Tetraiodothyroacetic acid (TETRAC) and nanoparticulate TETRAC arrest growth of medullary carcinoma of the thyroid. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:1972–80.
24. Carmona-Cortés J, Isabel Rodríguez-Gómez I, Wangenstein R, Banegas I, García-Lora AM, Quesada A, et al. Effect of thyroid hormone-nitric oxide interaction on tumor growth, angiogenesis and aminopeptidase activity in mice. *Tumor Biol*. 2014.
25. Rodríguez-Gómez I, Baca Y, Moreno JM, Wangenstein R, Perez-Abud R, Payá JA, et al. Role of sympathetic tone in BSO-induced hypertension in mice. *Am J Hypertens*. 2010;23:882–8.
26. Düwel A, Eleno N, Jerkic M, Arevalo M, Bolaños JP, Bernabeu C, et al. Reduced tumor growth and angiogenesis in endoglin-haploinsufficient mice. *Tumor Biol*. 2007;28:1–8.
27. Bizzozero OA, Reyes S, Ziegler J, Smerjac S. Lipid peroxidation scavengers prevent the carbonylation of cytoskeletal brain proteins induced by glutathione depletion. *Neurochem Res*. 2007;32:2114–22.
28. Zhen J, Bizzozero OA. Reduced proteasomal activity contributes to the accumulation of carbonylated proteins in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem*. 2010;115:1556–67.
29. Landino LM, Hagedorn TD, Kim SB, Hogan KM. Inhibition of tubulin polymerization by hypochlorous acid and chloramines. *Free Radic Biol Med*. 2011;50:1000–8.
30. Clark HM, Hagedorn TD, Landino LM. Hypothiocyanous acid oxidation of tubulin cysteines inhibits microtubule polymerization. *Arch Biochem Biophys*. 2014;541:67–73.
31. Landino LM, Moynihan KL, Todd JV, Kennett KL. Modulation of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;314:555–60.
32. Singh A, Boldin-Adamsky S, Thimmulappa RK, Rath SK, Ashush H, Coulter J, et al. RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy. *Cancer Res*. 2008;68:7975–84.
33. DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K, et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature*. 2011;475:106–9.
34. Davis FB, Tang HY, Shih A, Keating T, Lansing L, Herbergs A, et al. Acting via a cell surface receptor, thyroid hormone is a growth factor for glioma cells. *Cancer Res*. 2006;66:7270–5.
35. Luidens MK, Mousa SA, Davis FB, Lin HY, Davis PJ. Thyroid hormone and angiogenesis. *Vasc Pharmacol*. 2010;52:142–5.
36. Mayas MD, Ramírez-Expósito MJ, Carrera MP, Cobo M, Martínez-Martos JM. Renin-angiotensin system-regulating aminopeptidases in tumor growth of rat C6 gliomas implanted at the subcutaneous region. *Anticancer Res*. 2012;32:3675–82.
37. Del Pilar Carrera M, Ramírez-Expósito MJ, Mayas MD, García MJ, Martínez-Martos JM. Mammary renin-angiotensin system-regulating aminopeptidase activities are modified in rats with breast cancer. *Tumour Biol*. 2010;31:583–8.
38. Mawrin C, Wolke C, Haase D, Krüger S, Firsching R, Keilhoff G, et al. Reduced activity of CD13/aminopeptidase N (APN) in aggressive meningiomas is associated with increased levels of SPARC. *Brain Pathol*. 2010;20:200–10.

