

## S - NITROSILACIÓN DE PROTEÍNAS: IMPLICANCIAS EN LA BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

### Protein S-Nitrosylation: Implications in Molecular Biology of Cancer

Guzmán Velásquez Luis Jesús<sup>1</sup>, Guevara-Vásquez Ana María<sup>2</sup>, Marín Carmen<sup>3</sup>.

#### RESUMEN

La s-nitrosilación de proteínas es mediada en gran parte por la transferencia de óxido nítrico a dianas celulares, facilitando los mecanismos de transducción de señales como una alternativa a modificaciones postraduccionales de objetivos biológicos. La evidencia acumulada indica que la s-nitrosilación de proteínas se encuentra involucrada en aspectos fisiológicos y en un amplio espectro de patologías humanas. La presente revisión muestra las implicancias de estas reacciones metabólicas desde una perspectiva de la biología molecular del cáncer. Siendo evidente que la s-nitrosilación no sólo puede resultar de las alteraciones en la actividad de expresión del óxido nítrico sintasa, sino puede reflejar una contribución del balance de las actividades moleculares en los mecanismos de regulación de los procesos tumorigénicos.

**Palabras clave:** S-nitrosilación, óxido nítrico, óxido nítrico sintasa, cáncer.

#### ABSTRACT

The s-nitrosylation of proteins is largely mediated by nitric oxide transfer to cellular targets, facilitating the mechanisms of signal transduction as an alternative to posttranslational modifications of biological targets. Accumulating evidence indicates that the s-nitrosylation of proteins is involved in physiological aspects and a wide spectrum of human diseases. This review shows the implications of these metabolic reactions from the perspective of the molecular biology of cancer. It is clear that the s-nitrosylation can not only result from alterations in the expression of nitric oxide synthase activity, also may reflect a contribution from the balance of the molecular activities in the regulatory mechanisms of tumorigenic processes.

**Key words:** S-nitrosylation, nitric, oxide, nitric oxide synthase, cancer.

#### INTRODUCCIÓN

La s-nitrosilación es una de las principales modificaciones postraduccionales de proteínas la cual se ha sugerido como un importante mecanismo de regulación de señalización celular mediada por óxido nítrico, consiste en la adición covalente reversible de un resto nitroxilo al grupo tiol de la cadena

lateral de residuos cisteína en sitios activos y alostéricos de proteínas, generando s-nitrosoproteínas (SNO-proteínas); algunos tiosoles de bajo peso molecular, en particular glutatión, se encuentran sometidos a s-nitrosilación, s-nitrosoglutatión (GSNO).<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Químico Farmacéutico. Maestría en Ciencias con mención Fisiología y Biofísica, Escuela de Postgrado, Universidad Nacional de Trujillo-Perú

<sup>2</sup> Químico Farmacéutico, Dra. Ciencias Biomédicas. Docente de la Cátedra de Fisiología y Fisiopatología- Fac. Farmacia y Bioquímica y Postgrado- Universidad Nacional de Trujillo-Perú

<sup>3</sup> Químico Farmacéutico, Mg. Fisiología. Docente de Cátedra de Fisiología y Fisiopatología Humana de la Fac. de Farmacia y Bioquímica-Universidad Nacional de Trujillo-Perú

Los estudios iniciales de la función de óxido nítrico como una molécula señalización en músculo liso demostraron el rol de GMPC como un segundo mensajero. Sin embargo, la investigación aculada en los últimos años ha demostrado que el óxido nítrico presenta una gran influencia en la transducción de señales y otros aspectos de la función celular en gran medida a través de s-nitrosilación de proteínas independientes GMPC.<sup>2,3</sup>

En mamíferos, la s-nitrosilación celular esta acoplada a la síntesis endógena de óxido nítrico, como parte del metabolismo de L-arginina a L-citrulina a través de una compleja reacción catalizada principalmente por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), la cual presenta tres isoformas: NOS neural (nNOS o NOS1), NOS inducible (iNOS o NOS2), y NOS endotelial (eNOS o NOS3).<sup>4</sup>

La evidencia científica actual sugiere que la s-nitrosilación de proteínas es uno de los principales mecanismos implicados en la transmisión de señales celulares basadas en óxido nítrico en la mayoría de sistemas biológicos. Similar a otras modificaciones postraduccionales, tales como la fosforilación, s-nitrosilación modula la actividad biológica de un gran número de proteínas *in vivo*, y está implicada específicamente en procesos críticos del ciclo celular que incluyen regulación de transcripción, reparación de ADN y apoptosis.<sup>5-9</sup>

La desregulación de los mecanismos celulares de s-nitrosilación han sido implicados en notables eventos fisiopatológicos como asma, fibrosis quística, enfermedades de Parkinson, insuficiencia cardiaca y accidentes cerebrovasculares.<sup>10-12</sup> Así mismo, incluyen eventos de gran influencia en la aparición y proliferación de células cancerosas.<sup>13,14</sup>

La revisión actual se centra en el papel de la s-nitrosilación de proteínas y sus implicancias moleculares en la biología del cáncer, con el objetivo de brindar una información actualizada de los procesos moleculares mediados por la participación de óxido nítrico en un escenario oncohematológico y contribuir en los nuevos paradigmas del desarrollo científico.

## CONTENIDO

### A. *La s-nitrosilación de proteínas es una reacción reversible*

La s-nitrosilación de proteínas es reversiblemente regulada por reacciones de s-nitrosilación y denitrosilación, reacciones que mantienen un balance dinámico en los sistemas biológicos, de tal forma que un grupo tiol en un residuo cisteína es s-nitrosilado o permanece en un estado denitrosilado dependiendo del estado redox de los sitios celulares de reacción. La selectividad es conferida en parte por la interacción de sustratos con fuente de grupos derivados de óxido nítrico incluyendo la óxido nítrico sintasa y donadores de óxido nítrico (SNO-proteínas y GSNO) y a través de motivos SNO que faciliten s-nitrosilación *in vivo* de un subconjunto de residuos cisteína en una proteína blanco.<sup>7</sup>

Los primeros análisis de SNO-proteínas fueron realizados en SNO-hemoglobina de mamíferos sugiriendo un motivo SNO acido-base donde la s-nitrosilación es dirigida a cadenas lateral cargadas (acido-base) en un espacio de 6 Å de un grupo tiol (Cys $\beta$ 93). Este tipo de interacción conferida a la hemoglobina también se sustenta en la presencia de residuos hidrófobos que se caracterizan por poseer residuos aromáticos (Tyr y Trp), los cuales se creen facilitan s-nitrosilación por transnitrosilación, como se ejemplifica en el intercambio de grupos derivados de óxido nítrico entre Trp y Cys de la albumina. Los sitios activos con cercanías de residuos Tyr y Cys aumentan la reactividad de los grupos tiol de cisteína por disminución de *pKa*. También se puede facilitar s-nitrosilación por ruta de radicales, catalizadas por un radical catiónico Tyr que va extraer un electrón de un residuo Cys, facilitando así una rápida reacción con óxido nítrico. Es importante destacar que, los residuos cargados se han sugerido por desempeñar un rol importante en las interacciones proteína-proteína que puedan promover un sitio específico de s-nitrosilación.<sup>15,16</sup>

Este balance dinámico y la selectividad por los grupos tiol es determinante en las reacciones celulares de s-nitrosilación por interacciones proteína-proteína; sin embargo,

también es facilitada por la localización subcelular de las isoformas de óxido nítrico sintasa.<sup>17</sup> Las enzimas responsables de la adición directa de derivados de óxido nítrico vía reacciones de transnitrosilación en las proteínas diana son consideradas proteínas nitrosilasas; por otro lado, las proteínas denitrosilasas juegan un papel crítico en disipar las SNO-proteínas modulando así sus niveles celulares, tales como la cobre, zinc-Superoxido Dismutasa (Cu, Zn-SOD), GSNO Reductasa (GSNOR), Tiorredoxina (TRX), Tiorredoxina Reductasa (TR).<sup>18-20</sup>

#### B. *S-nitrosilación en la biología del cáncer, un efecto mediado por óxido nítrico*

Desde las primeras investigaciones en óxido nítrico, existe una clara asociación entre la amplia expresión, y en algunos casos baja expresión de las isoformas de óxido nítrico sintasa con varios tumores en seres humanos. Los efectos del óxido nítrico en el ambiente tumoral dependen de su concentración, duración de exposición, la ubicación y actividad de las isoformas de óxido nítrico sintasa, el tipo de célula y la sensibilidad del microambiente a óxido nítrico.<sup>21</sup>

Todas las isoformas de óxido nítrico sintasa se han asociado a la inhibición o promoción de células tumorales. Dichas células a menudo expresan iNOS y en algunos casos eNOS o nNOS dependiendo del tipo de tumor y el estadio en el cual se encuentra.<sup>22,23</sup>

Los bajos niveles de óxido nítrico podrían facilitar la progresión tumoral mientras que los altos niveles ejercer un efecto inhibitorio, de esta forma las concentraciones de óxido nítrico provenientes de las células tumorales podrían promover o inhibir la progresión tumoral.<sup>7</sup>

En algunos estudios de carcinoma de mama se ha observado, que el Receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) nuclear se relaciona con la alta expresión de iNOS, y la interacción entre STAT3 y EGFR nuclear resulta estar implicada con la activación de la transcripción de iNOS y un aumento de proliferación celular. Así mismo, estudios muestran un aumento en la regulación de la expresión del Factor de crecimiento de endotelio vascular (VEFG) con promoción de angiogénesis y progresión tumoral, la cual es mediada por la inducción iNOS en células

tumoral de carcinoma de colon. Sin embargo, los análisis histopatológicos de diversos tejidos tumorales revelan que la expresión de iNOS no guardaría relación con progresión del tumor correlacionándose inversamente con el estadio y grado de la progresión tumoral.<sup>24,25</sup>

Las diferencias en los distintos tipos de tumor, los niveles locales y la respuesta celular a óxido nítrico podrían estar dispuesta a la sensibilidad de la célula tumoral. En este sentido, la respuesta de la célula tumoral a la inducción de iNOS depende del estado de p53. Esta observación muestra que tras la inducción de iNOS se incrementa la expresión de VEGF, angiogénesis y crecimiento tumoral en células tumorales con presencia de p53 mutada pero una inhibición de la promoción tumoral en células con presencia de p53 del tipo silvestre.<sup>26</sup>

#### C. *S-nitrosilación de proteínas y apoptosis*

La actividad dual de óxido nítrico en la inducción o protección contra los mecanismos de muerte celular podrían explicar el rol multifacético del óxido nítrico en la patogénesis y progresión del cáncer. Estos mecanismos podrían ser activados por la inducción de óxido nítrico sintasa y el consiguiente aumento de estrés oxidativo nitrosante, generando un daño directo en la membrana plasmática y las estructuras del núcleo celular.<sup>9</sup>

La evidencia acumulada sugiere que el óxido nítrico podría promover muerte celular vía s-nitrosilación de proteínas diana en la cascada de señalización de apoptosis. Uno de los mecanismos de inducción a apoptosis mediada por óxido nítrico es vía s-nitrosilación del Factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B) lo cual causaría una inhibición cascada abajo de muchas proteínas antiapoptóticas.<sup>27</sup>

El NF- $\kappa$ B denota una familia de factores de transcripción encargada de transducir una amplia gama de estímulos nocivos o inflamatorios en la activación coordinada de múltiples genes, incluyen aquellos que codifican citoquinas, receptores de citoquinas, moléculas de adhesión, y las proteínas antiapoptóticas. Por tanto NF- $\kappa$ B sirve como un elemento de respuesta crítico en la supervivencia celular y proliferación.<sup>28</sup>

Está bien establecido que el heterodímero p50/p65, NF- $\kappa$ B, es secuestrado en el citoplasma por el inhibidor IK $\beta$  (inhibidor del NF- $\kappa$ B) y que muchos estímulos activadores inducen fosforilación de IK $\beta$  por el complejo IK $\beta$  kinasa (IKK), iniciando así ubiquitinación de IK $\beta$  mediada por el proteosoma 26S y posterior la translocación de NF- $\kappa$ B hacia el núcleo. La s-nitrosilación de NF- $\kappa$ B *in vitro*, ya sea con óxido nítrico exógeno o mediante la inducción de iNOS, inhibe su unión a ADN, activación del promotor y transcripción de genes. Análisis *in vivo* indicó que p50 es s-nitrosilado en un el residuo Cys62 que se encuentra en el bucle de unión a ADN N-terminal dentro del dominio de homología Rel. Además, se demostró que el tratamiento de células intactas con donadores de óxido nítrico mejora significativamente la inducción a apoptosis mediada por el Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y que esta facilitación podría no solo reflejar la reducción de afinidad de NF- $\kappa$ B a ADN, sino también una disminución de la degradación IK $\beta$ , evitando de esta manera la translocación de NF- $\kappa$ B.<sup>29,30</sup>

Alternativamente una ruta de señalización apoptótica es mediada vía s-nitrosilación de la Deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH), enzima catalítica implicada en la síntesis del primer intermediario de alta energía 1,3-bifosfoglicerato de la ruta glucolítica, sugerida como una proteína multifuncional. GAPDH es fisiológicamente s-nitrosilado en el residuo Cys150, lo cual suprime su actividad catalítica y confiere la capacidad de unión a Siah1, una E3 ubiquitina ligasa, la cual posee una señal de localización nuclear.<sup>31,32</sup> El complejo proteico GAPDH-Siah1 a nivel nuclear, tras su translocación, es acetilado por la acetiltransferasa p300/CBP quien estimula acetilación de otras proteínas, como p53; además GAPDH s-nitrosilado genera la transnitrosilación de proteínas nucleares diana activando mecanismos de muerte celular por mecanismos apoptóticos.<sup>33-35</sup>

Mecanismos recientes revelan apoptosis mediada por óxido nítrico que involucran el receptor Fas. Este receptor también conocido como CD95, pertenece a la familia de receptores del Factor de necrosis tumoral que inducen a apoptosis a través de una activación

secuencial de caspasas. Muchas células cancerosas expresan el receptor Fas pero no se someten a apoptosis mediada por Fas. La s-nitrosilación del receptor Fas inducida por óxido nítrico se realiza en los residuos Cys199 y Cys304 de la región citoplasmática del receptor. En las células cancerosas que sobre expresan Fas de tipo silvestre, la s-nitrosilación del receptor genera la redistribución de rafts lipídicos y las células se sensibilizan a ligandos Fas, favoreciendo así la formación de complejos de señal de inducción a muerte celular.<sup>36</sup>

Por otro lado, las modificaciones proteicas mediadas por óxido nítrico de dianas celulares que regulan la ruta de muerte celular podrían generar efectos antiapoptóticos. Como explica la s-nitrosilación de los sitios activos catalíticos Cys de la Caspasa3, la cual inhibe la apoptosis. Sin embargo, estas proteínas pueden ser nuevamente reguladas mediante reacciones de denitrosilación por Tiorredoxina.<sup>20</sup>

#### D. *Angiogénesis tumoral medida vía s-nitrosilación de proteínas*

Uno de los principales eventos en la promoción y progresión tumoral radica en la alteración del balance de las proteínas proangiogénicas y antiangiogénicas que conducen a la neovascularización tumoral. La actividad angiogénica resulta esencial en el metabolismo tumoral y el aporte de nutrientes a dicho tejido; sin embargo, la formación de nuevos vasos no solo permite encontrar balance a la excesiva demanda metabólica, sino también diseminación y metástasis tumoral.<sup>37</sup>

La angiogénesis es estimulada por diversas proteínas de factores de crecimiento, de entre los cuales la familia de Factores de crecimiento de endotelial vascular (VEGF) juega un rol de mayor importancia. Cuando el factor angiogénico VEGF-A acopla su receptor VEGFR2 en las células endoteliales, la señal Try Kinasa corriente bajo genera la activación de una proteína kinasa serina/treonina (Akt/PKB) responsable de fosforilar residuos serina específicos eNOS induciendo así la síntesis de óxido nítrico. De tal forma que la presencia de óxido nítrico generaría una vía de señalización dependiente

de GMPc lo cual incrementaría la proliferación, migración, supervivencia y permeabilidad de las células endoteliales.<sup>38,39</sup> Sin embargo, la activación de las rutas angiogénicas puede responder a cambios en el entorno celular, siendo la hipoxia uno de los principales mecanismo mediadores de la respuesta adaptativa a la reducción de la disponibilidad de oxígeno de las células tumorales, regulada por la transcripción del Factor 1 inducible a la hipoxia (HIF1).<sup>40</sup>

HIF1 es un factor de transcripción proangiogénico que interactúa con secuencias específicas de promotores, denominadas Elementos de respuesta a la hipoxia (HREs) en regiones regulatorias diana en las secuencias de ADN lo cual estimula la transcripción de diversos factores angiogénicos, incluyendo VEGF y genes que involucran supervivencia y proliferación celular. HIF1 es un heterodímero compuesto por dos subunidades, HIF $\alpha$  y HIF $\beta$ . La subunidad HIF $\alpha$  en condiciones normales de niveles de oxígeno (normoxia) es fácilmente degradable, mientras la subunidad  $\beta$  es constitutivamente expresada. Bajo condiciones de hipoxia, la subunidad HIF $\alpha$  es estable y dimeriza con la subunidad HIF $\beta$  formando el factor de transcripción activo. Esta estabilidad de la subunidad HIF $\alpha$  dependiente de oxígeno es debida a que la molécula sufre hidroxilaciones en residuos prolina 402 y 564 en una secuencia denominada Dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD). La hidroxilación de HIF $\alpha$  conduce a la molécula a degradación proteosomal por mecanismos de ubiquitinación.<sup>41</sup>

Estudios iniciales con moléculas donadoras de óxido nítrico en diferentes tipos celulares evidencian que óxido nítrico provee la estabilización de la subunidad HIF1, facilitando su translocación y posterior unión a secuencias específicas de ADN en condiciones de normoxia. Se sugiere que dicha estabilidad mediada por óxido nítrico es debida a la s-nitrosilación de la subunidad HIF1 $\alpha$  en Cys533 presente en el Dominio de degradación dependiente de oxígeno, lo cual inhibiría la degradación de la subunidad HIF1 $\alpha$ .<sup>40,42</sup>

Alternativamente las reacciones de s-nitrosilación podrían regular la activación

génica de dependiente de HIF1 por rutas redundantes, mediante la inhibición de la actividad supresora de tumores de la Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa (PTEN) por reacciones de s-nitrosilación. Los principales sustratos de PTEN son los fosfoinositoles generados tras la activación de la Fosfoinositol 3-kinasa (PI3K), siendo PTEN uno de los principales reguladores negativos de la vía de señalización PI3K/Akt, la cual juega un rol fundamental en la promoción tumorigénica y angiogénica. Estas observaciones tienen implicancias importantes en la capacidad de los eventos dependientes de S-nitrosilación de promover la angiogénesis tumoral y en última instancia la progresión del cáncer.<sup>43,44</sup>

#### *E. Proceso de metástasis mediada vía s-nitrosilación de proteínas*

Los procesos de propagación de focos tumorales de un órgano distinto del cual se inició cursan por mecanismos de invasión y metástasis. Este suceso de cambios moleculares y celulares se origina con la invasión primaria de células tumorales e ingreso dentro de la circulación (intravasación) para así ser transportados a través de la circulación hasta ser arrestados en microvasos (extravasación), originando la formación de nódulos micrometastásicos y finalizar colonizando tejidos a distancia.<sup>45</sup>

La síntesis y niveles óxido nítrico se asocian con invasión y metástasis en distintos procesos cancerígenos. Datos clínicos indican que la actividad de óxido nítrico sintasa es positivamente asociada con la progresión de cáncer de mama y estudios realizados en tumores mamarios murinos la activación de la óxido nítrico sintasa, la vía dependiente de GMPc y MAPk son pasos esenciales en la invasión y metástasis.<sup>46,45</sup>

Los procesos de conversión de las células epiteliales a migratorias, determinado por los mecanismos de transición epitelial-mesénquimal, brinda a las células tumorales adquirir habilidades invasivas, de resistencia a apoptosis y de diseminación. Estos procesos fueron originalmente identificados durante estadios específicos de embriogénesis, en los cuales un conjunto de factores de transcripción, tales como Snai1, Slug, Twist y

Zell/2, orquestan la migración de células epiteliales y colonización de varios territorios embrionarios en distintos órganos. Similarmente, estos factores reguladores de transcripción son sobreexpresados en células tumorales de tipo maligno.<sup>47</sup>

Varios de estos factores de transcripción reprimen de manera directa la expresión génica de E-cadherina, privando así a las células epiteliales neoplásicas de un supresor clave en la motilidad e invasividad celular. Observaciones muestran, la administración de donadores de óxido nítrico muestran efectos inhibitorios de la transición epitelio-mesénquima, cuyos efectos podrían estar mediados por la inhibición de la expresión de Snail y su unión a secuencias de ADN que paralelamente sobreexpresaría al supresor de metástasis RKIP (proteína inhibitoria de la Raf1 kinasa) y la transcripción de E-cadherina. Se conoce que Snail es transcripcionalmente regulado por NF- $\kappa$ B. Estos mecanismos revelarían acciones inversas a la invasión celular y resistencia a metástasis mediadas por óxido nítrico vía s-nitrosilación.<sup>48,49</sup>

Las observaciones antes mencionadas sugieren que los altos niveles de óxido nítrico podrían revertir los procesos de transición epitelio-mesénquima y las capacidades invasivas de las células malignas. Sin embargo, podrían existir efectos positivos en la progresión de la metástasis mediados por óxido nítrico. La disrupción de E-cadherina y el mejoramiento de invasión celular producto de la estimulación de  $\beta$ -estradiol en células de cáncer de mama reporta ser dependiente de la producción de óxido nítrico y la s-nitrosilación de la tirosina kinasa C-Src, la cual sufre s-nitrosilación en el residuo Cys498, mejorando así su capacidad kinasa y subsecuentemente el mejoramiento de la invasividad celular estimulada por  $\beta$ -estradiol.<sup>50</sup>

Mecanismos mediados por óxido nítrico también están implicados en la supresión de apoptosis dependiente de anclaje celular a estructuras de la matriz extracelular, anoikis, un proceso que es el mecanismo principal de inhibición de metástasis de la célula tumoral. Estudios muestran que óxido nítrico podría generar una regulación negativa de anoikis dependiente de s-nitrosilación que involucra a Caveolin1, siendo este una estructura proteica

que forma parte de microdominios de membrana denominados caveolas que actúa como regulador negativo de anoikis favoreciendo a la metástasis y supervivencia celular.<sup>51,52</sup>

Generada la intravasación, las células metástasis que sobreviven a la corriente circulatoria y llegan a tejidos distales necesitan extravasar para poder originar una colonización. Los flujos de óxido nítrico en el microambiente metastásico juegan un rol importante en la dinámica de las células tumorales en el éxito o fracaso de la extravasación.

La síntesis de óxido nítrico derivada de la actividad de la eNOS induce aumento de la permeabilidad y angiogénesis en las células endoteliales. Se sugiere a  $\beta$ -catenina como un blanco de s-nitrosilación en respuesta a estímulos de VEGF en células endoteliales. La activación de los receptores de VEGF generarían una señalización corriente abajo que activaría a la eNOS y con ello un aumento de síntesis de óxido nítrico, que vía s-nitrosilación de los residuos Cys619 en  $\beta$ -catenina promueve la disociación de VE-cadherina contribuyendo a un aumento de permeabilidad, y la consiguiente extravasación de células neoplásicas.<sup>53</sup>

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Los estudios actuales han retratado con claridad los mecanismos de s-nitrosilación como un proceso ubicuo involucrado en las distintas fases de progresión del cáncer, y con ellos en rol multifacético del óxido nítrico en la biología del cáncer. La evidencia clínica y experimental actual nos muestra la interrelación que existe entre una molécula tan simple y los complejos mecanismos de las vías moleculares críticas en los procesos neoplásicos, evidenciando tanto su capacidad de promover o inhibir la progresión tumoral, dependiendo de su concentración, duración de exposición, ubicación y actividad de las isoformas de la óxido nítrico sintasa, y la sensibilidad celular del microambiente tumoral. La s-nitrosilación se ha convertido en un mecanismo clave involucrado en la señalización de óxido nítrico, y la evidencia

acumulada de estas modificaciones postraduccionales tiene un importante rol en la regulación de la tumorigénesis. Sin embargo, los mecanismos de interrelación entre el óxido nítrico y las reacciones s-nitrosilación no están del todo esclarecidas requiriéndose mayor evidencia científica que sin lugar a dudas en un futuro ampliaran nuestros conocimientos científicos respecto a los mecanismo de s-nitrosilación y sus implicancias en la biológica celular del cáncer.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Puneet A, Stamler J. Enzymatic mechanisms regulating protein s-nitrosylation: implications in health and disease. *J mol Med.* 2013. 90(3): 233-44.
2. Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest.* 1986. 78(1): 1-5.
3. Hess D, Matsumoto A, Kim S, Marshall H, Stamler J. Protein s-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cel Biol.* 2005. 6(2): 150-66.
4. Knowles R, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994. 298: 249-58.
5. Stamler J, Lamas S, Fang F. Nitrosylation: The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell.* 2001. 106(6): 675-83.
6. Marshall H, Merchant K, Stamler J. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB J.* 2000 14: 1889-1900.
7. Foster H, Hess D, Stamler J. Protein s-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med.* 2009. 15(9): 391-404.
8. Mannick J. Regulation of apoptosis by protein s-nitrosylation. *Amino Acids.* 2007. 32(4): 523-6.
9. Benhar M, Stamler J. A central rol for s-nitrosylation in apoptosis. *Nat Cel Biol.* 2005. 7(7): 645-6.
10. Cho D, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Gu Z, Lipton S. S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neural injury. *Science.* 2009. 324: 102-5.
11. Yao D, Gu Z, Nakamura T, Shi Z, Ma Y, Gaston B et al. Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004. 101: 10810-14.
12. Gonzalez, D.; Biegii, F.; Treuer, A.; Hare, J. Deficient ryanodine receptor s-nitrosylation increases sarcoplasmic reticulum calcium lake and arrhythmogenesis in cardiomyocytes. *Proc Natl acad sci USA.* 2007. 104: 20612-17.
13. Wei, W.; Li, B.; Hanes, M.; Kakar, S.; Chen, X.; Liu, L. S-nitrosylation from GSNOR deficiency impairs DNA repair and promotes hepatocarcinogenesis. *Sci Transl Med.* 2010. 2(19): 19ra13.
14. Lim, K.; Ancrile, B.; Kashatus, D.; Counter, C. Tumour maintenance is mediated by eNOS. *Nature.* 2008. 452: 646-49.
15. Foster, M.; Forrester, M.; Stamler, J. A protein microarray-based analysis of s-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009. 106: 18948-53.
16. Marino, S.; Gladyshev, V. Structural analysis of cysteine s-nitrosylation: a modified acid-based motif and the emerging rol of transnitrosylation. *J Mol Biol.* 2010. 395: 844
17. Muntane, J.; De la mata, D. Nitric oxide and cáncer. *World J Hepatol.* 2010. 2(9): 337
18. Pawloski, J.; Hess, D.; Stamler, J. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature.* 2001. 409: 622-26.
19. Okado, A.; Fridovich, I. Putative denitrosylase activity of Cu, Zn-superoxide dismutase. *Free Radical Biol Med.* 2007. 43: 830-36.
20. Benhar, M.; Forrester, M.; Hess, D.; Stamler, J. Regulated protein

- denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science*. 2008. 320: 1050-54.
21. Ridnour, L.; Thomas, D.; Donzelli, S.; Espey, M.; Roberts, D.; Wink, D.; et al. The biphasic nature of nitric oxide responses in tumor biology. *Antioxid Redox Signal*. 2006. 8(8): 1329-37.
  22. Bakshi, A.; Nag, T.; Wadhwa, S.; Mahapatra, A.; Sarkar, C. The expression of nitric oxide synthases in human brain tumors and peritumoral áreas. *J Neurol Sci*. 1998. 155: 196-203.
  23. Puhakka, A.; kunnala, V.; Napankangas, U.; Saily, M.; Koistein, P.; Paakko, P.; et al. High expression of nitric oxide synthases is a favorable prognostic sign in non-small cell lung carcinoma. *APMIS*. 2003. 111(12): 1137-46.
  24. Lo, H.; Hsu, S.; Seyed, M.; Gunduz, M.; Xia, W.; Wei, Y. Nuclear interaction to EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell*. 2005. 7(6): 575
  25. Ambs, S.; Merriam, W.; Bennett, W.; Felley, E.; Ogunfusika, M.; Oser, S. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Res*. 1998. 58(2): 334-41.
  26. Schinoff, C.; Daou, M.; Jones, S.; Schiffer, C.; Ross, A. Nitric oxide-mediated inhibition of Hdm2-p53 binding. *Biochemistry*. 2002. 41: 13570-4.
  27. Matthews, J.; Botting, C.; Panico, M.; Morris, H.; Hay, R. Inhibition of NF-KappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acid Res*. 1996. 24(12): 2236-42.
  28. Marshall, H.; Stamler, J. Nitrosative stress-induced apoptosis through inhibition of NF-KappaB. *J Biol Chem*. 2002. 277: 34223-8.
  29. Kelleher, Z.; Matsumoto, A.; Stamler, J.; Marshall, H. NOS2 regulation of NF-KappaB by S-nitrosylation of p65. *J Biol Chem*. 2007. 282: 30667-72.
  30. Marshall, H.; Hess, D.; Stamler, J. S-nitrosylation: Physiological regulation of NF-KappaB. *Proc Natl Sci USA*. 2004. 101: 8841-2.
  31. Hara, M.; Snyder, S. Nitric oxide-GAPDH-Siah: a novel cell death cascade. *Cell Biol Neurobiol*. 2006. 26(4): 527-38.
  32. Hara, M.; Cascio, M.; Sawa, A. GAPDH as a sensor of NO stress. *Biochim Biophys Acta*. 2006. 1762(5): 502-9.
  33. Kornberg, M.; Sen, N.; Hara, M.; Juluri, K.; Nguyen, J.; Snowman, A.; et al. GAPDH mediates nitrosylation of nuclear protein. *Nat Cell Biol*. 2010. 12(11): 1094.100.
  34. Sen, N.; Hara, M.; Kornberg, M.; Cascio, M.; Bae, B.; Shahani, N.; et al. Nitric oxide induced nuclear GAPDH activates P300/CBP and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2008. 10(7): 866-73.
  35. Hara, M.; Agrawal, N.; Kim, S.; Cascio, M.; Fujimuro, M.; Ozeki, Y.; et al. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol*. 2005. 7(7): 665-74.
  36. Leon L, Subramaniam S, Cauvard O, Plenchette C, Paul C, Godar C.; et al. S-nitrosylation of the death receptor fas promotes fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells. *Gastroenterology*. 2011. 140(7): 2009-18.
  37. Hicklin D, Ellis J. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*. 2005. 23: 1011-27.
  38. Ellis, L.; Hicklin, D. VEGF targeted therapy: mechanisms of anti-tumor activity. *Nat Rev Cancer*. 2008. 8: 579-91.
  39. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher A. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cell by Akt-dependent

- phosphorylation. *Nature*. 1999. 399: 601-5.
40. Olson N, Van der Vliet. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory diseases. *Nitric Oxide*. 2011. 25(2): 125-37.
41. Hirota K, Semenza G. Regulation of angiogenesis by hypoxia inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006. 59(1): 15-26.
42. Semenza, G. Hypoxia inducible factor 1 (HIF1) pathway. *Sci STKE*. 2007. 407:cm8.
43. Brune B, Zhou J. The role of nitric oxide in stability regulation of hypoxia inducible factor 1 alpha. *Curr Med Chem*. 2003. 10(10): 845-55.
44. Nedospasov A, Rafikov R, Beda N, Nudler E. An autocatalytic mechanism of protein nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000. 97: 13543-48.
45. Dueñas A, Isales C, Del Mar A, Gonzales R, Sanguenza O, Rodriguez J. Expression of inducible nitric oxide synthase in breast cancer correlates with metastatic disease. *Mod Pathol*. 1997. 10(7): 645-9.
46. Jadesky, L, Chakraborty C, Lala P. 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.
47. Polyak K, Weinberg R. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisitions of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. 2009. 9: 265-73.
48. Baritaki S, Huerta S, Sahakyan A. Mechanisms of nitric oxide mediated inhibition of EMT in cancer: inhibition of the metastasis inducer Snail and induction of the metastasis suppressor RKIP. *Cell Cycle*. 2010. 9: 4931-40.
49. Wu K, Bonavida B. The activated Nk-kappa B –Snail-RKIP circuitry in cancers regulates both the metastatic cascade and resistance to apoptotic by cytotoxic drug. *Crit Rev Immunol*. 2009. 29: 241-54.
50. Rahman M, Senga T, Ito S, Hyodo T, Hasegawa H, Hamaguchi S. S-nitrosylation to Cysteine 498 of c-Src tyrosine kinase regulates nitric oxide mediated cell invasion. *J Biol Chem*. 2010. 285: 3806-14.
51. Goetz J, Lajoie, P, Wiseman S, Nabi I. Caveolin 1 in tumor progression: the good, the bad and ugly. *Cancer Metastasis Rev*. 2008. 27: 715-35.
52. Simpson C, Anyiwe k, Schimmer A. Anoikis resistance a tumor metastasis. *Cancer Lett*. 2008. 272: 177-85.
53. Lahdenranta J, Hagendoom J, Hoshida T, Nelson G, Kashiwagi S. Endothelial nitric oxide synthase mediates lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res*. 2009. 69(7): 2810-8.