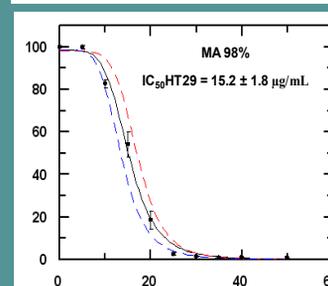
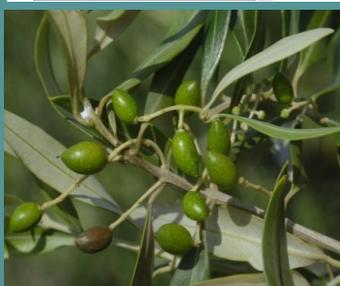
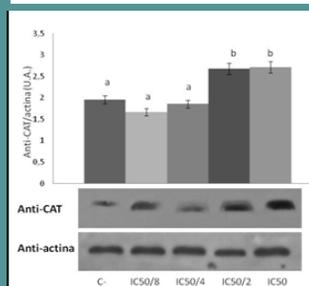
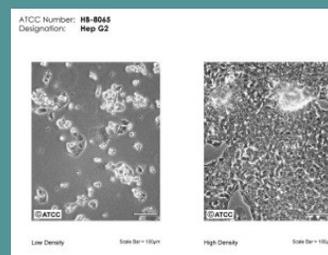
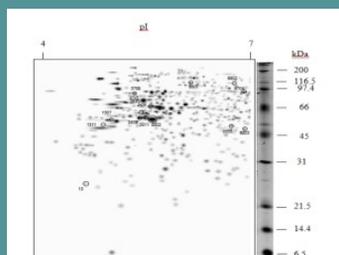
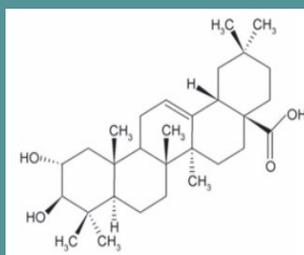


TESIS DOCTORAL

2013

Caracterización del efecto antioxidante y proliferativo del ácido maslínico en diferentes líneas celulares

Khalida Mokhtari



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



ugr

Universidad
de Granada



UNIVERSIDAD DE GRANADA

**Caracterización de los efectos
antioxidantes y proliferativos del ácido
maslínico en diferentes líneas
tumORAles**

Khalida Mokhtari

TESIS DOCTORAL

2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Khalida Mokhtari
D.L.: GR 214-2014
ISBN: 978-84-9028-733-0



**Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular I**



Empresa Biomasic S.L.

Caracterización de los efectos antioxidantes y proliferativos del ácido maslínico en diferentes líneas tumorales

Memoria para optar al grado de Doctora,
presentada por la Licenciada en Biología

Khalida Mokhtari

DIRECTORES DEL TRABAJO

Dr. José Antonio Lupiáñez Cara

Dra. Eva E. Rufino Palomares

Dr. Fernando J. Reyes Zurita

Catedrático de Universidad
Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I
Universidad de Granada

Profesora Ayudante Doctor
Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I
Universidad de Granada

Profesor Ayudante Doctor
Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I
Universidad de Granada

JUNIO 2013

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias al disfrute de una beca de formación para personal de investigación dentro del contrato de investigación nº 3341-00, adscrito al Proyecto de investigación PPT-010000-2009-017 de la Fundación Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Empresa Biomasic, S.L. Organismo: Fundación Universidad de Granada-Empresa.

La investigación desarrollada ha sido financiada por el Plan Andaluz de Investigación (PAI) dentro de la subvención concedida al grupo de Investigación BIO-157, "Drogas, tóxicos ambientales y metabolismo celular" durante los años 2010 al 2013.

Parte de los resultados de esta tesis doctoral han sido recogidos en las siguientes Comunicaciones a Congresos y papers:

Maslinic acid, a triterpenic anti-tumoural agent, interferes with cytoskeleton protein expression in HT29 human colon-cancer cells".

Eva E. Rufino-Palomares, Fernando J. Reyes-Zurita, Leticia García-Salguero, Khalida Mokhtari, Pedro P. Medina, José A. Lupiáñez, Juan Peragón.

(2013) Journal of Proteomics 83:15-25. doi: 10.1016/j.jprot.2013.02.031.

"Efecto del ácido maslínico, agente antitumoral, sobre las proteínas del citoesqueleto de células HT29".

Eva E. Rufino-Palomares, Fernando J. Reyes-Zurita, **Khalida Mokhtari**, Leticia García-Salguero, Pedro P. Medina, José Antonio Lupiáñez, Juan Peragón.

Comunicación oral. **II Jornadas sobre Investigación en Biotecnología y Biomedicina. Máster universitario en Biotecnología y Biomedicina por la Universidad de Jaén**. Jaén, Diciembre **2012**. (**Congreso nacional**).

"El ácido maslínico estimula las deshidrogenasas de la ruta de las pentosas fosfato en la dorada (*Sparus aurata*)".

Eva E. Rufino-Palomares, Juan Peragón, Fernando J. Reyes-Zurita, **Khalida Mokhtari**, Leticia García-Salguero, José Antonio Lupiáñez.

Comunicación oral y póster. **XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM)**. Barcelona, Septiembre **2011**. (**Congreso nacional**).

Dedicada a mi familia

Agradecimientos

Esta tesis no hubiera sido posible sin la ayuda y el apoyo de muchas personas a quienes me gustaría expresar mi agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, al Dr. José Antonio Lupiáñez, Dr. Eva Rufino Palomares y Dr. Reyes Zurita.

Muy especialmente quiero agradecer a José Antonio Lupiáñez, millones de gracias, por su excelente dirección, asesoramiento, disponibilidad, confianza, cariño, consejos, paciencia, calidad como persona y apoyo en todo el camino, usted ha sido el director, el familiar y el amigo que nunca he podido tener en mi vida.

A Eva Rufino Palomares, quiero agradecer su inestimable ayuda y, sobre todo, su paciencia. Has sido la directora y la amiga que tanto he necesitado. Gracias por tu cariño, tu disponibilidad, tu comprensión, y además, por tu absoluta dedicación, tu apoyo incondicional, tu optimismo y tus ganas de trabajar, durante todo el tiempo de la realización de esta tesis, siendo especialmente importante durante el período de redacción y de corrección.

A Fernando Reyes-Zurita, quiero decirte gracias por tu ayuda y gracias por todo.

Los tres, me habéis enseñado a ser investigador, me habéis guiado hasta el día de hoy, que aspiro a convertirme en doctor. Sois excelentes personas y grandes Bioquímicos.

Me considero afortunada por haber podido contar con vosotros.

¡¡¡Muchas gracias de corazón!!!

Quisiera también agradecer al Dr. Juan Peragón su gran amabilidad y su comprensión. Gracias también a todos los miembros de mi grupo de investigación, gracias a Pedro Medina por su amabilidad.

Gracias a la Empresa Biomaslínic S.L. por posibilitar que esta tesis se realizara.

Por supuesto quiero dar las gracias a todos y cada uno de mis compañeros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. He tenido la oportunidad de trabajar en él y conocer a todas las personas que lo integran.

Os doy las gracias por vuestra amabilidad y apoyo. Gracias a Leticia, a M^a Paz, a Borí, a Carmen, a Pepe, a Ana, a Marichu, a Víctor, a Rogelio, a María, a Patricia, a Hilarío, a José Manuel y a Juan Antonio.

Gracias también, a Carolina, a Pablo, a Xiomara, a Sonia y a Cristina.

Finalmente quiero tener un recuerdo especial para mi familia, por su amor inestimable y su apoyo: A mis padres, Fatna y el Mokhtar; a mis hermanas, Hakima, Malika y Fadoua y a mis sobrinos, Moatassim y Safouan

RESUMEN

RESUMEN

El ácido maslínico es un triterpeno pentacíclico presente en la capa cerosa que recubre el fruto y la hoja del olivo, perteneciente al grupo de los oleanano triterpenoides. Este compuesto ha mostrado de forma preliminar propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antioxidantes, activadoras del sistema inmune, antivirales, entre otras. Las propiedades antioxidantes del ácido maslínico han sido poco estudiadas, por lo cual, en este trabajo se resalta la necesidad de determinar la capacidad antioxidante de dicho compuesto en situaciones de estrés oxidativo sobre líneas celulares cultivadas *in vitro*, previamente tratadas con tres condiciones estresantes (privación de suero, presencia de peróxido de hidrógeno y nitroprusiato sódico).

Para llevar a cabo dicho estudio se realizaron diferentes ensayos utilizando líneas celulares de melanoma murino (B16-F10) y células normales de músculo liso (A10). Estos ensayos consistieron, en primer lugar, de estudios de viabilidad celular mediante incorporación de MTT en la determinación de la concentración IC_{50} en ambas líneas celulares. Los tratamientos siguientes fueron realizados con concentraciones inferiores a dicho IC_{50} . Posteriormente, fue determinada la actividad celular mediante citometría de flujo por uso de 1, 2, 3-dihidrorodamina y finalmente, se analizaron los niveles de expresión y de actividad de las enzimas relacionadas con la defensa antioxidante. Los resultados permitieron determinar que el ácido maslínico es efectivo en la protección contra el daño oxidativo celular causado a nuestras células. Este hecho demostró en las condiciones experimentales, el AM tiene un claro efecto sobre la actividad de estas enzimas, modificando la actividad de las mismas; y, por otro lado, también es capaz de inducir la mayor o menor expresión de estas enzimas, dependiendo del estado de estrés y dependiendo de la dosis del mismo y del tipo celular, ya que este efecto protector es mayor en las células normales estresadas, que las tumorales.

Teniendo en cuenta que estos compuestos pueden también afectar significativamente los procesos de crecimiento en condiciones normales, se decidió estudiar los aspectos moleculares relacionados con los posibles efectos proliferativos junto con su efecto protector apoptótico provocado por el estrés oxidativo ocasionado por la privación del suero en líneas celulares de origen humano cultivadas *in vitro*, ya que este efecto fue observado previamente en peces. Para llevar a cabo dicho estudio se han realizado diferentes ensayos utilizando como modelo las líneas celulares de carcinoma humano HT29 (carcinoma de colon) y HepG2 (hepatoma). Para corroborar y comprobar si realmente el ácido maslínico inducía un efecto proliferativo sobre células en cultivo, se estudió la acción de dicho compuesto sobre el ciclo celular por citometría de flujo y la actividad enzimática de la defensa antioxidante. Para continuar caracterizando este efecto y corroborar los resultados anteriores, se analizaron los niveles de expresión de las proteínas p-IkB y p-Akt, ambas implicadas en procesos de proliferación. Para ello, se determinó la concentración de proteínas por el método BCA. Los resultados mostraron una mayor cantidad de proteína a las concentraciones de $IC_{50/4}$ e $IC_{50/8}$, con respecto al control negativo tanto en el caso de HepG2, como en el caso de HT29. Resultados que concuerdan con los obtenidos en el conteo celular. Los ensayos de expresión por western-blot de los niveles de proteínas p-Akt y p-IkB mostraron una disminución dosis dependiente de la expresión de estas proteínas, así cuanto mayor es la concentración del ácido maslínico, menor es la expresión de las proteínas, estos resultados podrían explicar el efecto proliferativo del compuesto observado a bajas dosis.

Para profundizar sobre el mecanismo de acción de MA como agente antitumoral, hemos investigado sus efectos sobre el citoesqueleto. Se utilizó un procedimiento de proteómica basado en la electroforesis bidimensional en gel, análisis de masas et huellas dactilares de masa péptica. La incubación de las células HT29 con MA llevó a un arresto de la fase G_1 del ciclo celular. Después de 24 horas de exposición a $3,7 \mu M$ ($IC_{50/8}$) y $30 \mu M$ de MA (IC_{50}) catorce proteínas del citoesqueleto diferencialmente expresadas podrían ser reconocidas. Un grupo de estas proteínas, compuesto de queratina 2, queratina 8, queratina tipo II citoesqueletal 8, queratina tipo I citoesqueletal 9, queratina tipo I citoesqueletal 18, citoqueratinas 18 y 19, y β -actina, ejercen una función estructural, mientras que otro grupo, compuesto de lamina B1, gelsolina 1, septina 2, villina 1, proteína 2 relacionada con actina y moesina, está relacionada con la nucleación de la actina y la formación de citoesqueleto. Los cambios en la expresión de moesina, villina 1 y β -actina identificados por las técnicas de proteómica fueron corroborados por Western Blot. Esta es la primera evidencia obtenida de los efectos reguladores de MA en el citoesqueleto, que puede llegar a ser una de las bases de su efecto anti-proliferativo contra las células de cáncer de colon.

Palabras Clave:

Ácido maslínico, peróxido de hidrógeno, nitroprusiato sódico, privación de factores de crecimiento, defensa antioxidante.

ÍNDICES

INDICE GENERAL

<i>II.1. Objetivo general</i>	31
<i>II.2. Objetivos específicos</i>	31
<i>Este estudio consistió en medir el H₂O₂ intracelular mediante el uso del fluorocromo 1, 2, 3 Dihidrorodamina (DHR), en un citómetro de flujo. Tras la medida de cada tratamiento, se obtuvo un porcentaje de actividad celular en cada una de nuestras condiciones experimentales y líneas celulares empleadas. Los resultados se presentan agrupados según los tratamientos que se querían comparar. En primer lugar, en las células B16-F10, inicialmente se realizó un control de los agentes estresantes SNP y H₂O₂, con objeto de observar las diferentes actividades celulares en respuesta a un agente y a otro. Los ensayos se realizaron a dosis fijas de SNP y H₂O₂ de acuerdo con los resultados obtenidos de MTT y lo que se varió fueron los tiempos de incubación (3 y 24 h), con objeto de conocer además del efecto dosis, el efecto tiempo.</i>	97
FIGURA 68. GEL MÁSTER	160
A. PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO CON FUNCTION ESTRUCTURAL	164

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción breve de las bioactividades del ácido maslínico	10
Tabla 2. Volumen de reactivos para el ensayo de Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa...	60
Tabla 3. Volumen de reactivos para el ensayo de Glutación S-Transferasa	62
Tabla 4. Protocolo para la preparación de geles para la SDS-PAGE.....	64
Tabla 5. Resumen de IC50 determinados en los ensayos de MTT.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

F

- Figura 1. Fotografía de la hoja y del fruto del árbol *Olea europaea*, “el olivo”, de donde se extrae entre otros compuestos triterpénicos, el ácido maslínico en una concentración superior al 60%. , 6
- Figura 10. Distribución de tratamientos en placas de 12 pocillos, dos placas por cada línea celular (B16-F10 y A10), 50
- Figura 11 (Derecha) Esquema de detección de las distintas intensidades de fluorescencia por un citómetro tipo FACS, en el que pueden detectarse hasta 5 señales diferentes provenientes de la misma partícula (FS, SS, FL1, FL2, FL3). (Izquierda) Histograma del ciclo celular de una población normal de células, 53
- Figura 12. Procedimiento completo de la técnica “Western blot”, en el que se hace hincapié en los pasos determinantes del proceso: transferencia, bloqueo, hibridación con los anticuerpos primario secundario y revelado. , 65
- Figura 14. Efecto del ácido maslínico sobre la inhibición del crecimiento celular de B16-F10, tras 24 horas de tratamiento con AM (A) Con FBS y (B) Sin FBS. La inhibición fue analizada con el ensayo MTT. , 91
- Figura 15. Efecto del ácido maslínico sobre la inhibición del crecimiento celular A10, tras 24 horas de tratamiento con AM (A) Con FBS y (B) Sin FBS. La inhibición fue analizada con el ensayo MTT. , 92
- Figura 16. Efecto del H₂O₂ sobre la inhibición del crecimiento celular tras 24 horas de tratamiento. La inhibición fue analizada con el ensayo MTT. (A) Curva de viabilidad dosis-depente para B16-F10. (B) Curva de viabilidad dosis-depente para A10. , 93
- Figura 17. Efecto del SNP sobre la inhibición del crecimiento celular tras 24 horas de tratamiento. La inhibición fue analizada con el ensayo MTT. (A) Curva de viabilidad dosis-depente para B16-F10. (B) Curva de viabilidad dosis-depente para A10. , 94
- Figura 18. Efecto del AM en la concentración de proteínas de la línea celular B16-F10 A) Con FBS y (B) Sin FBS. , 96
- Figura 19. Efecto del AM en la concentración de proteínas de la línea celular A10 A) Con FBS y (B) Sin FBS. , 97
- Figura 2. Estructura del ácido maslínico y otros tres triterpenos pentacíclicos estudiados. , 9
- Figura 20. Efecto del AM en la concentración de proteínas de la línea celular B16-F10 A) Con H₂O₂ (150 μM) y B) Con SNP (200 μM). , 98
- Figura 21. Efecto del AM en la concentración de proteínas de la línea celular A10, 99
- Figura 22. Variaciones de la actividad celular de B16-F10, 100

Figura 23. Variaciones de la actividad celular de B16-F10, 101

Figura 24. Variaciones de la actividad celular de B16-F10, 102

Figura 25. Variaciones de la actividad celular de A10, 103

Figura 26. Variaciones de la actividad celular de A10, 103

Figura 27. Variaciones de la actividad celular de A10, 104

Figura 28. Variaciones de la actividad celular a diferentes concentraciones de AM. (A) B16-F10. (B) A10, 105

Figura 29. Actividad SOD en A10 para distintos tratamientos., 106

Figura 3. Esquema simplificado del mecanismo molecular intrínseco, por el que el ácido maslínico induce apoptosis en células HT29 (Reyes-Zurita y col., 2011), 14

Figura 30. Actividad SOD en B16-F10 para distintos tratamientos., 108

Figura 31. Actividad catalasa en A10 para distintos tratamientos, 110

Figura 32. Actividad catalasa en B16-F10 para distintos tratamientos, 112

Figura 33. Actividad GPX en A10 para distintos tratamientos, 114

Figura 34. Actividad GPX en B16-F10 para distintos tratamientos, 116

Figura 35. Actividad GR en A10 para distintos tratamientos, 118

Figura 36. Actividad GR en B16-F10 para distintos tratamientos, 120

Figura 37. Actividad G6PDH en A10 para distintos tratamientos, 121

Figura 38. A. Actividad G6PDH en B16-F10 para distintos tratamientos, 123

Figura 39. Actividad GST en A10 para distintos tratamientos, 125

Figura 4. Diferentes antioxidantes enzimáticos para las especies reactivas del oxígeno., 24

Figura 40. Actividad GST en B16-F10 para distintos tratamientos, 126

Figura 41. Niveles de expresión de SOD en A10 para distintos tratamientos, 128

Figura 42. Niveles de expresión de SOD en B16-F10 para distintos tratamientos, 129

Figura 43. Niveles de expresión de CAT en A10 para distintos tratamientos, 130

Figura 44. Niveles de expresión de CAT en B16-F10 para distintos tratamientos, 132

Figura 45. Niveles de expresión de G6PDH en A10 para distintos tratamientos, 133

Figura 46. Niveles de expresión de G6PDH en B16-F10 para distintos tratamientos, 135

Figura 47. Niveles de expresión de GST en A10 para distintos tratamientos, 136

Figura 48. Niveles de expresión de GST en B16-F10 para distintos tratamientos, 137

Figura 49. Efecto del ácido maslínico (98% y sal) sobre la inhibición del crecimiento en células HT29, 138

Figura 5. Detalle de un cultivo de B16.F10 a diferentes aumentos, de menor aumento a mayor A, B, C respectivamente.,
36

Figura 50. Efecto del ácido maslínico (98% y sal) sobre la inhibición del crecimiento en células HepG2, 140

Figura 52. Porcentaje de células frente a las diferentes concentraciones de ácido maslínico, 142

Figura 53. Porcentaje de células HT29 medidas por citometría de flujo utilizando FDA/IP., 143

Figura 54. Porcentaje de células HepG2 medidas por citometría de flujo utilizando FDA/IP., 144

Figura 55. Variaciones de los ratios o número de células, 147

Figura 56. Variaciones en los incrementos de células en fase G0/G1, 148

Figura 57. Variaciones en los incrementos de células en fase S, 149

Figura 58. Variaciones en los incrementos de células en fase G2/M, 150

Figura 59. Variaciones de los ratios o número de células, 151

Figura 6. Detalle de un cultivo de las células A10., 37

Figura 60. Variaciones en los incrementos de células en fase G0/G1, 152

Figura 61. Variaciones en los incrementos de células en fase S, 153

Figura 62. Variaciones en los incrementos de células en fase G2/M, 153

Figura 63. Actividad específica en mU/mg proteína de la enzima GR, 156

Figura 64. Actividad específica en mU/mg proteína de la enzima GPX., 158

Figura 65. Actividad específica en mU/mg proteína de la enzima Catalasa, 159

Figura 66. Análisis por “western blot” de la expresión del contenido de p-AKT., 160

Figura 67. Análisis por “western blot” de la expresión del contenido de p-IK, 161

Figura 68. Gel máster, 163

Figura 7. Morfología típica celular de un cultivo de HT29., 38

Figura 70. Análisis por Western-blot las proteínas de moesina (A), villina 1 (B) y β -actina (C)., 170

Figura 71, 185

Figura 8. Morfología típica celular de un cultivo de células de carcinoma hepatocelular humano HepG2., 40

Figura 9. Esquema de uso de la cámara de Neubauer., 44

Figure 69. Imágenes 2-DE que muestran la expresión diferencial de las 14 proteínas identificadas del citoesqueleto., 169

LISTADO DE ABREVIATURAS

- AM: Ácido maslínico
- H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
- SNP: Nitroprusiato de sodio
- B16-F10: Células de melanoma murino
- A10: Células de músculo liso murino
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- COO⁻: Grupo carboxilo
- OH: Grupo hidroxilo
- ROS: Especies reactivas del oxígeno
- ERN: Especies reactivas del nitrógeno
- LPO: Peroxidación lipídica
- NO: Óxido nítrico
- SOD: Superóxido dismutasa
- CAT: Catalasa
- GPX: Glutación peroxidasa
- GR: Glutación reductasa
- GSH: Glutación reducido
- GSSG: Glutación oxidado
- NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- O₂⁻: Radical superóxido
- G6PDH: Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
- GST: Glutación S-Transferasa
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium[®]
- MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium
- FBS: Fetal bovine serum (Suero bovino fetal)
- IC₅₀: Inhibitory concentration of 50% (Concentración inhibitoria del 50% de la viabilidad)

- DHR: 1,2,3 Dihidrorodamina
- SDS-PAGE: Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
- PVDF: Membrana de polifluoruro de vinilideno
- IκB: inhibidor del elemento kappa B
- PI3K: fosfatidil-inositol-3-quinasa
- NF-κB: factor nuclear kappa B
- AKT/PKB: serina-treonina quinasas específicas/proteínas quinasa B
- IKK: quinasa del inhibidor del elemento kappa B
- (iNOS) óxido nítrico sintasa

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actividad antioxidante del AM

Se conoce que la presencia de radicales libres puede producir la peroxidación lipídica de las membranas celulares, modificaciones de las proteínas asociadas a dichos lípidos y daños en el ADN. Como se ha mencionado, entre las propiedades biológicas que se atribuyen al ácido maslínico, se encuentra la de agente antioxidante, la cual ha mostrado en diversos estudios ser capaz de reducir los radicales libres intracelulares.

Este hecho resulta beneficioso en la prevención y tratamiento de enfermedades como el cáncer; tanto es así que, en los últimos 5 años, el número de investigaciones con triterpenos han sufrido un auge con el objetivo de conocer cuál es el efecto de compuestos naturales ante cualquier tipo de estrés (Montilla y col., 2003; Márquez-Martín y col., 2006a; Allouche y col., 2011; Qian y col., 2011).

Por este motivo, este estudio ha sido enfocado en la observación de la respuesta celular de dos líneas celulares, no descritas anteriormente, ante un tratamiento de 24 horas con ácido maslínico. La importancia de este estudio reside en la comparación de la acción antioxidante del compuesto entre una línea celular normal (A10) y una línea celular tumoral (B16-F10), permitiendo establecer diferencias de actuación del compuesto objeto de estudio y el mecanismo de acción que ocurre en un sistema alterado, como es el cáncer y el que ocurre en condiciones normales. Ambos sistemas, de manera preliminar se alterarán, provocándoles un estrés externo, para conseguir observar los efectos del ácido maslínico en uno y otro de un modo más claro.

Actividad proliferativa del AM

Se ha observado que el AM presenta la capacidad de inducir un mayor crecimiento en animales completos (Fernández-Navarro y col., 2006; Fernández-Navarro y col., 2009; Rufino-Palomares y col., 2012a; Rufino-Palomares y col., 2012b). Asimismo, se ha descrito

que el AM es un agente antitumoral. Existen numerosos trabajos que lo demuestran (Reyes y col., 2006; Reyes y col., 2009; Chenghai Li y col., 2010; Wu y col., 2011; Parra y col., 2011; Park y col., 2012; Mooi y col., 2012). Esto nos lleva a pensar, que el AM tiene un papel fundamental en la ruta de proliferación, relacionadas con los procesos de crecimiento, tanto normal, como patológico.

El efecto anticancerígeno o proliferativo podría depender de las dosis de AM utilizadas. Por ello, en este estudio hemos pretendido evaluar si el AM presenta un efecto proliferativo sobre las líneas celulares de origen humano cultivadas *in vitro*, HT29 (carcinoma de colon) y HepG2 (hepatoma) en condiciones de privación de factores de crecimiento. Paralelamente, se evaluará el efecto estresante para las células que supone dicha privación.

Respecto a la capacidad antitumoral del AM y con objeto de profundizar en el mecanismo molecular de su acción, hemos estudiado la expresión de proteínas del citoesqueleto utilizando como modelo la línea celular HT29.

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ANTECEDENTES

El ácido maslínico es un metabolito producido por algunas especies de plantas, mayormente en el olivo y sus frutos (Bianchi y col., 1994) con capacidad de generar una respuesta beneficicosa para las mismas.

Diferentes investigaciones han determinado distintas propiedades biológicas de este compuesto, perteneciente a la familia de los triterpenos, como: propiedades analgésicas, hepatoprotectoras, antitumorales, antiinflamatorias, antioxidantes, efectoras del sistema inmunológico, entre otras (Bianchi y col., 1994; Saimaru y col., 2007; Stiti, Triki y Hartmann, 2007).

En particular, el efecto del ácido maslínico como agente antioxidante ha sido probado sobre diferentes líneas celulares tales como: hepatocitos, macrófagos, células de cáncer de mama, neuronas normales, etc. (Montilla y col., 2003; Márquez-Martín y col., 2006a; Allouche y col., 2011; Qian y col., 2011), donde se ha hallado la reducción de radicales libres intracelulares.

Resultados preliminares (no publicados) obtenidos por el grupo de investigación del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad de Granada muestran que el ácido maslínico no posee actividad captadora de radicales libres (scavenger activity), pero si es capaz de modificar los niveles endógenos de antioxidantes celulares.

Por otro lado, aún no se conoce el mecanismo molecular por el cual el ácido maslínico es capaz de inducir este efecto antioxidante, ni cuál es su efecto en condiciones similares en células normales no cancerígenas.

Por ello, el presente trabajo de investigación planteaba determinar el posible efecto antioxidante del ácido maslínico, en dos tipos de líneas celulares (una tumoral, B16-F10 y otra normal, A10) mediante la generación de estrés celular inducido por diferentes agentes oxidantes, no probados hasta el momento en este tipo de células. El estrés celular sería generado mediante la eliminación de los factores de crecimiento en el medio y mediante la adición de peróxido de hidrógeno y nitroprusiato de sodio, en ensayos independientes.

Entre los sistemas antioxidantes estudiados se encuentran: la actividad glutatión peroxidasa, responsable de la eliminación de peróxido, que utiliza como cofactor el glutatión en su forma reducida (GSH) el cual pasa a su forma oxidada (GSSG). El GSH se regenera posteriormente por la acción de la glutatión reductasa que utiliza el NADPH proveniente de la ruta de las pentosas fosfato. La velocidad de generación de NADPH en la ruta de las pentosas fosfato depende inicialmente de la actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

Otras enzimas implicadas en los mecanismos antioxidantes endógenos son la catalasa, que cataliza la desproporción del H_2O_2 en agua y oxígeno; la superóxido dismutasa responsable de la disminución de radicales libres, que transforma el radical superóxido (O_2^-) en H_2O_2 y la glutatión S-transferasa (GST) que cataliza la conjugación de glutatión reducido con compuestos que contienen un centro electrófilo.

Es bien conocido el papel anticancerígeno del AM (Reyes-Zurita y col 2009, Park y col, 2012), lo que nos hace pensar que el AM guarda relación con los procesos de crecimiento. En relación a la capacidad proliferativa del AM, se han realizado estudios en modelos animales, concretamente, nuestro grupo de investigación lo ha hecho en peces y se ha

visto que este triterpeno es capaz de inducir un aumento en el crecimiento de los animales tratados con él, de una modo dosis dependiente. La mayor velocidad de crecimiento se atribuyó a una mejor eficacia en la síntesis de proteínas.

Al mismo tiempo, se indujo una mayor actividad y velocidad máxima de los enzimas marcadores del crecimiento (Fernández Navarro y col 2006; Rufino-Palomares y col 2012). Este efecto ha sido relacionado con la capacidad del AM de inhibir a las serín-proteasas (Xu y col., 1996), aunque el mecanismo molecular por el que ocurre aún no ha sido investigado. Desde el punto de vista antitumoral, esta propiedad del AM podría ser importante, ya que este producto no sólo actuaría frente a los procesos cancerígenos, sino que además podría aportar propiedades anticaquéticas importantes para el tratamiento de este tipo de enfermedades.

De un modo resumido, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar la capacidad antioxidante del ácido maslínico, previa inducción de estrés celular, mediante la adición de SNP y H₂O₂ así como la privación de FBS en líneas celulares normales y tumorales. El daño oxidante de estos compuestos y el efecto antioxidante del ácido maslínico se comprobaron mediante la medida de actividad celular por dihidrorodamina cuantificada por citometría de flujo, así como por el análisis enzimático y de expresión de los diferentes marcadores de estrés oxidativo, tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa.

Asimismo, en este trabajo se estudió la capacidad proliferativa del ácido maslínico. Este estudio se realizó en dos líneas celulares tumorales, previa privación de FBS, se vieron las dosis citotóxicas del compuesto y se trabajó con dosis inferiores a ellas. Se realizaron pruebas de viabilidad celular, análisis del ciclo celular por citometría de flujo, ensayos enzimáticos de marcadores de proliferación, así como, estudios de expresión de las proteínas relacionadas con las rutas de proliferación.

Con objeto de profundizar en el mecanismo de actuación del AM como agente antitumoral y conocer la respuesta celular a este compuesto, hemos realizado un estudio de proteómica sobre las proteínas del citoesqueleto en la línea tumoral HT29.

I.2. ÁCIDO MASLÍNICO. GENERALIDADES Y ESTRUCTURA

El ácido maslínico (ácido 2- α , 3- β -dihidroxiolean-12-en-28-oico), conocido también como ácido crataególico, es un metabolito producido por algunas especies de plantas (Bianchi y col., 1994) con capacidad de generar una respuesta beneficiosa para las mismas, desempeñando un papel protector frente al ataque de algún microorganismo patógeno (Kombargi y col., 1998; Pungitore y col., 2005).



Figura 1. Fotografía de la hoja y del fruto del árbol *Olea europaea*, “el olivo”, de donde se extrae entre otros compuestos triterpénicos, el ácido maslínico en una concentración superior al 60%.

Este compuesto natural pertenece a la familia de los oleano triterpenoides (derivados del oleanano) siendo un triterpeno pentacíclico. Se ha encontrado en una gran cantidad de plantas como: el olivo (*Olea europaea*) (Bianchi y col., 1994), el rododendro

(*Rhododendro collettianum*) (Ullah y col., 2007), el espino amarillo (*Hippophae rhamnoides*) (Yang y col., 2007), en especies ornamentales de la familia verbenáceas (*Junellia aspera*) (Pungitore y col., 2007), en el durián, planta de la familia de las malváceas (*Durio zhibethinus* y *Durio kutejensis*) (Rudiyansyah y Garson, 2006), en *Galphimia glauca* (Nader y col., 2006), en *Cornus cousa* (Sultana y Lee, 2007), en la granada (*Punica granatum*), el olmo (*Ulmus pumila*) (Wang y col. 2006), en especies de Salvia (*Salvia palaestina Benth.* y *Salvia syrica L.*) (Al-Jaber y col. 2012), en una especie de rizoma (*Nelumbo nucifera*) (Chaudhuri y Singh, 2012), en la corteza de *Aegiceras corniculatum* (Ponnappalli y col., 2012), entre otras.

De todas las plantas mencionadas, el olivo es quien presenta una mayor concentración de ácido maslínico, encontrándose entre el 55-68% del total de compuestos presentes en la cera superficial que recubre el fruto y hojas de esta especie de planta mediterránea (Bianchi y col., 1994, Frega y col., 1995). En la Figura 1 se muestra la hoja y fruto típico del olivo.

El ácido maslínico, a pesar de ser el triterpeno más abundante en el olivo, no es el único triterpeno encontrado; también están presentes el ácido oleanólico (31-44%), el eritrodiool, la β -amirina, la β -amirona, además de triterpenos derivados del lupano (lupeol, lupona), derivados del ursano (ácido ursólico, uvaol) y derivados del taraxano (taraxerol).

De los triterpenos mencionados, el ácido maslínico y el ácido oleanólico son los más abundantes, siendo su concentración de 681 ± 63 mg/kg y 420 ± 20 mg/kg respectivamente (Bianchi y col., 1994). Sin embargo, estudios más recientes realizados por Goulas y Manganaris (2012) indican que, según las condiciones de riego del cultivo de olivos utilizadas, se pueden conseguir concentraciones de ácido maslínico y ácido oleanólico de hasta 2.524 ± 16 mg/kg y 1.158 ± 14 mg/kg respectivamente.

Los triterpenos presentan distintas propiedades biológicas y aplicaciones. Se han descrito efectos analgésicos, hepatoprotectores, anti-tumorales, anti-inflamatorios, antioxidantes, también pueden actuar como efectores del sistema inmunológico, etc. Esta

variedad de propiedades, ha desencadenado el estudio de triterpenos en múltiples áreas de investigación, ya sean relacionadas con la producción, aislamiento y extracción de triterpenos, como por las implicaciones que puedan tener en diversas patologías (Bianchi y col., 1994; Saimaru y col., 2007; Stiti, Triki y Hartmann, 2007).

La obtención de triterpenos, más concretamente, el aislamiento del ácido maslínico y del ácido oleanólico, es llevado a cabo a partir de subproductos de molturación de la aceituna durante el proceso de fabricación del aceite (García-Granados y col., 2000).

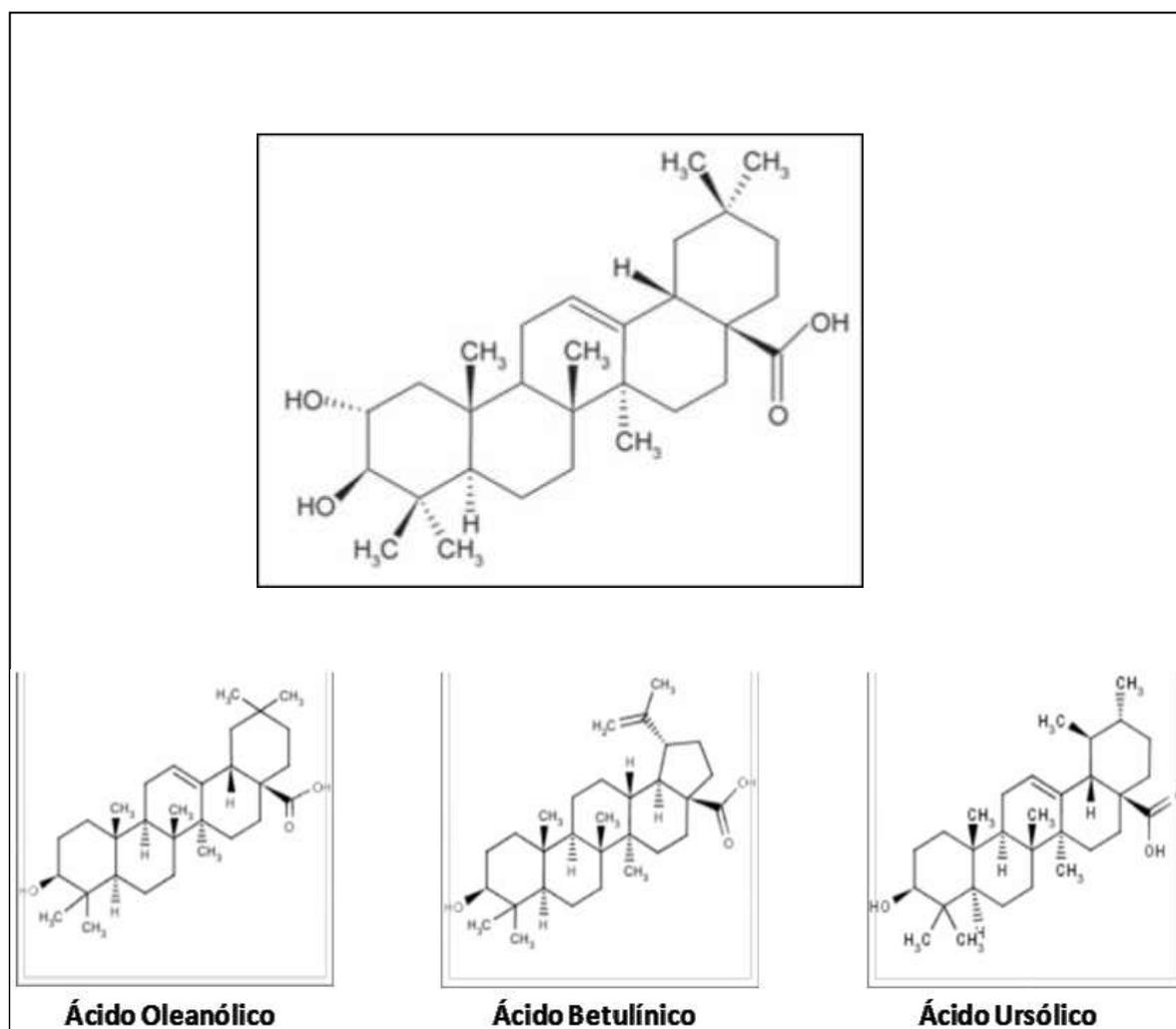


Figura 2. Estructura del ácido maslínico y otros tres triterpenos pentacíclicos estudiados.

Estos autores, han extraído estos compuestos con valores de rendimiento muy elevados; el ácido maslínico, lo producen en dos calidades: al 85% de pureza, siendo el 15% restante correspondiente a otros terpenos, sobre todo ácido oleanólico, y por encima del 97% de pureza (García-Granados y col., 2000).

El aislamiento del ácido maslínico, fue descrito inicialmente por Bianchi y col. (1994), por extracción metanólica, principalmente con hexano, de olivas previamente lavadas con cloroformo. La estructura del ácido maslínico corresponde al de un triterpeno de 5 anillos con 6 elementos (Figura 2).

Actualmente, se ha determinado que la extracción de ácidos triterpénicos de la aceituna, asistida por ultrasonidos, específicamente del ácido maslínico, presenta una gran efectividad de purificación en comparación a las técnicas más convencionales como la extracción sólido-líquido (Romero y col., 2010), la extracción a 40° C (Banik y Pandey, 2008) y la extracción Soxtec (Kontogianni y col., 2009; Parra y col., 2010). Los disolventes utilizados en la purificación también son relevantes, donde los más eficientes son el etanol o la mezcla metanol-etanol (Goulas y Manganaris, 2011).

El ácido maslínico posee dos sustituyentes hidroxilo (OH) en los carbonos C-2 y C-3; un grupo carboxilo (COO⁻) en el carbono C-28, dos grupos metilo en los C-4 y C-21, un grupo metilo en los carbonos C-8, C-10 y C-15 y un doble enlace sobre los carbonos C-12 y C-13 (Serra y col., 1994).

El ácido maslínico (AM), es un derivado del ácido oleanólico, con el que comparte estructura, a diferencia del grupo OH en el C-2. Una característica común a todos los triterpenos, que relaciona sus estructuras con actividades biológicas, es la importancia del grupo COO⁻ en el C-28 y el grupo OH en C-3 (Serra y col., 1994). El grupo OH en el C-2, que presenta el ácido maslínico, y no el oleanólico, parece ser que está relacionado con la capacidad antioxidante de este compuesto (Márquez-Martín y col., 2006a). El ácido maslínico presenta una masa molecular de 472,7 g/mol, un punto de fusión de 269-271°C (Wen y col., 2005).

I.2.1. Importancia del ácido maslínico: bioactividades

Al ácido oleanólico se le han atribuido propiedades inmunomoduladoras, cardiotónicas, antialérgicas, antioxidantes, antisépticas, antibacterianas, anticarcinogénicas, antiedémicas, antiinflamatorias, antitumorales y sedativas, entre otras (Liu y col, 1995a; Liu y col, 1995b; Shon y col, 1995; Zhang y Ma, 1995).

En la tabla 1 se muestran las diferentes propiedades bioactivas atribuidas al ácido maslínico.

Tabla 1. Descripción breve de las bioactividades del ácido maslínico

Propiedad	Autor	Líneas celulares, organismos
Efecto anticancerígeno	Reyes y col., 2006	HT29 y Caco-2
	Juan y col., 2006	HT29
	Reyes-Zurita y col., 2009	HT29
	Martín y col., 2007	Astrocitoma
	Kim y col., 2000	A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF49, HCT-15
	Taniguchi y col., 2002	HSC-2, HSG, HGF
	Wang y col., 2006	ACC
	Wu y col., 2011	B16-F10
	Parra y col., 2011	DU145
	Park y col., 2012	Raji
Mooi y col., 2012	Panc-1, BxPC-3, AsPC-1, A293	
Li y col., 2010		
Efecto antiproliferativo	Reyes-Zurita y col., 2009	HT29
	Juan y col., 2006	HT29
	Wang y col., 2006	HeLa, A375, MCF-7
	He y Liu., 2007	HepG2, MCF7
	Li y col., 2010	Panc-28
	Allouche y col., 2011	MCF7
Liu y col., 2011	A549	
Capacidad antioxidante	Montilla y col., 2003	Rata
	Márquez-Martín y col. 2006a	Macrófagos de mamíferos
	Allouche y col., 2011	MCF-7
	Qian y col., 2011	Astroцитos
	Shaik y col., 2012	Rata
Yin y col., 2012	Rata	
Efecto inmunomodulador	Márquez-Martín y col., 2006b	PBM
	Huang y col., 2011	Astroцитos de Rata

Efecto vaso-modulador	Rodríguez-Rodríguez y col., 2006	Produce dilatación en la aorta de ratas hipertensas
Previene estrés oxidativo	Márquez Martín y col., 2006	Inhibe la producción de NO inducido por LPS
Efecto sobre actividades enzimáticas		
-Inhibición colesterol acil transferasa	Kim y col., 2005 Lui y col., 2007	<i>Campsis grandiflora</i> Rata
-Inhibición glucógeno fosforilasa	Wen y col., 2005/2006 Guan y col., 2009/2011	Rata/músculo de conejo Astrocitos/Rata
-Inhibición ADN topoisomerasa y ADN polimerasa	Pungitore y col., 2007	Diferentes líneas cell cancerígenas
-Inhibición elastasas	Sultana y Lee, 2007	<i>C. kousa</i>
-Inhibición de PKC	Mooi y col., 2012	Raji
Capacidad antimicrobiana o antiparasitaria relacionada con la capacidad de inhibir serín-proteasas	Xu y col., 1996 García-Granados y col., 1998 Vlietnick y col, 1998 Braca y col., 2000 Carlos Moneriz,y col,2011	Virus del sida (VIH-1) <i>Cryptosporidium parvuum</i> <i>Toxoplasma</i> <i>T. cruzi</i> , <i>L. Donovanii</i> , Gram + y hongos Rata
Aditivo alimentario	Guillen y col., 2008 Fernández-Navarro y col., 2006 y 2008 Rufino-Palomares, y col., 2011, 2012a, b, y 2013	Ratón Trucha arco iris Dorada
Efecto neuroprotector	Guan y col., 2010 Guan y col., 2011 Qian y col., 2011	Rata Rata Astrocitos
Efecto Hipolipomiente	Liu y col., 2007 Liu y col, 2011 Hussain y col., 2012	Rata Rata Rata

I.2.1.1. Actividad anticancerígena

Muchos triterpenos son conocidos por inducir apoptosis y poseer propiedades antitumorales. El ácido maslínico es uno de estos triterpenos.

El efecto antitumoral del AM se ha demostrado en diferentes trabajos, en los cuales se observa que presenta propiedades antiproliferativas en líneas celulares, HT29 y Caco-2, de

cáncer de colon en humanos, induciendo una parada en la fase G0/G1 del ciclo celular y con la posterior muerte celular por apoptosis mediante la activación de caspasa-3 y fragmentación del ADN (Reyes y col., 2006; Juan y col., 2006; Juan y col., 2008).

Este efecto también se ha estudiado en células de astrocitoma, donde se demostró la inhibición del crecimiento celular, precedida de alteraciones morfológicas relacionadas con la apoptosis, concluyendo que la exposición de las células al AM o al ácido oleanólico, provocaba una inducción de apoptosis, incrementando los niveles de ROS (especies oxígeno reactivas intracelulares) (Martín y col., 2007).

Se ha descrito, la inducción de citotoxicidad por el ácido maslínico, aislado de *Physocarpus intermedius* sobre las siguientes líneas tumorales humanas: A549 (cáncer de pulmón), SK-OV-3 (cáncer de ovario), SK-MEL-2 (melanoma), XF-498 (sistema nervioso central) y HCT-15 (cáncer de colon) (Kim y col., 2000).

El AM produjo a su vez citotoxicidad en líneas celulares de carcinoma oral escamoso humano (HSC-2), en la línea de fibroblastos gingivales (HGF) y en líneas tumorales de la glándula salivar (HSG) (Taniguchi y col., 2002).

La actividad antiproliferativa del AM también fue encontrada frente a las líneas celulares de cáncer hepático HepG2 y MCF-7 de cáncer de mama y Caco-2, de cáncer de colon en humanos (He y Liu, 2007), y en células de melanoma murino, B16-F10 (Parra y col., 2011).

En células de cáncer pancreático fue estudiado el efecto antiproliferativo del AM, encontrándose que éste puede potenciar las actividades antitumorales de TNF α , activar las caspasas y suprimir la expresión de NF-kB, produciendo así apoptosis celular (Li y col., 2010). También, en células de carcinoma adenoide quístico de glándulas salivales (ACC), se estudió el efecto antitumoral del AM. En este tipo celular este triterpeno indujo un aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular, lo cual provocaba la fosforilación de p38 para activar posteriormente la caspasa-3 que condujo a la apoptosis (Wu y col., 2011).

Recientemente, se ha determinado el efecto del AM en la inhibición de actividad metastásica de las células de cáncer de próstata (DU145), con concentraciones de 0 a 25 μM . La Figura 3 muestra el mecanismo molecular proapoptótico del ácido maslínico.

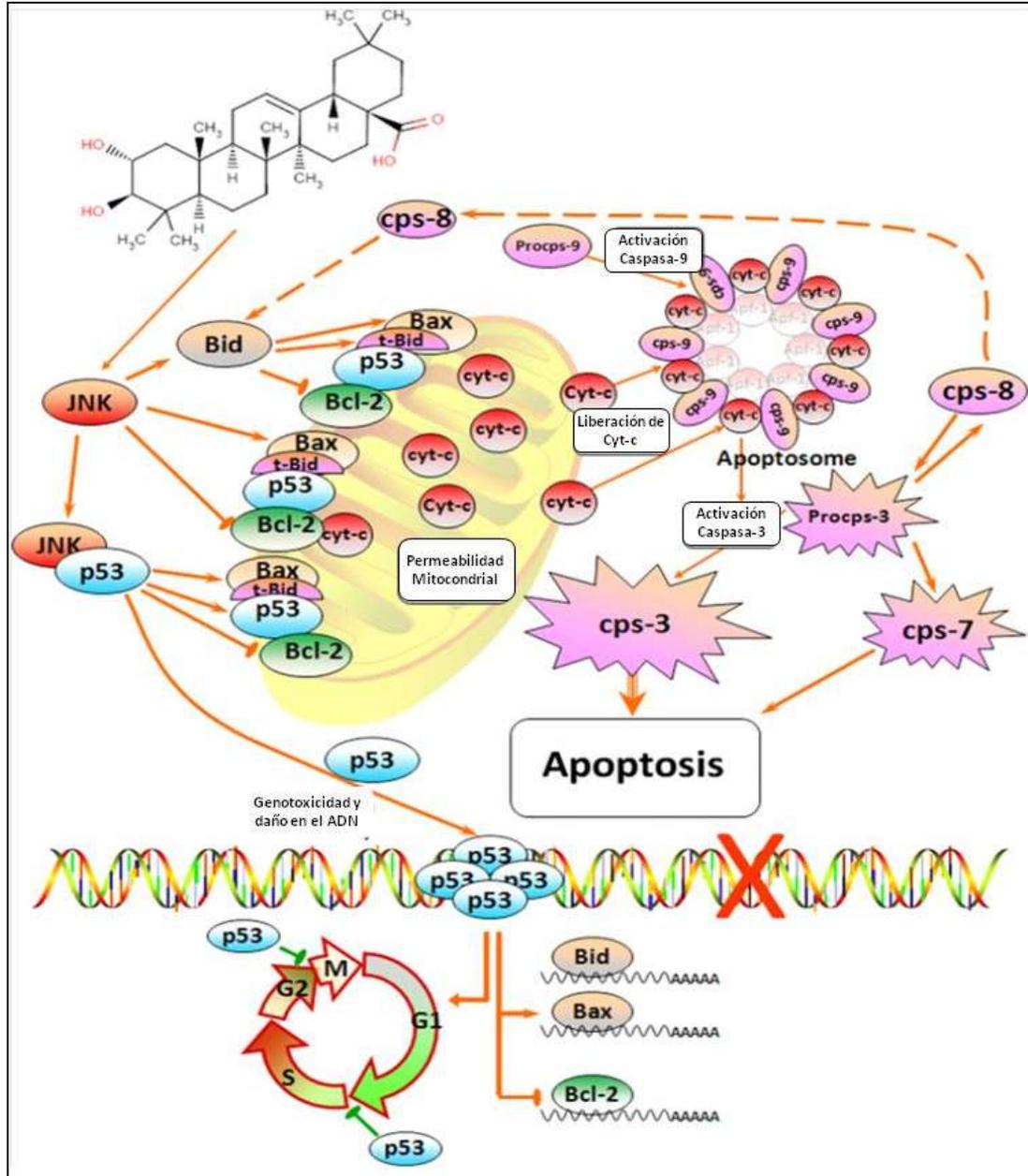


Figura 3. Esquema simplificado del mecanismo molecular intrínseco, por el que el ácido maslínico induce apoptosis en células HT29 (Reyes-Zurita y col., 2011).

Los resultados indican una reducción de la migración, invasión y adhesión de las células DU145 mediante la inhibición de uPAR, E-cadherina, VEGF y MMP (Park y col., 2012).

Se observan los múltiples trabajos que hablan del efecto anticancerígeno del AM ahora bien, también se conoce la ruta molecular por la que induce apoptosis en células HT29 (Reyes-Zurita y col., 2009a) (Reyes-Zurita y col., 2011).

De este modo, este compuesto natural produce la activación del mecanismo intrínseco mitocondrial de apoptosis mediado por la quinasa JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) lo que induce la activación de p53, además provoca la detención del ciclo celular en la fase G₀/G₁.

En este tipo de células el mecanismo molecular caracterizado, continúa con la activación de la familia proapoptótica de proteínas Bcl-2 (Bax y Bid) e inhibición de las proteínas anti-apoptóticas de esta familia (Bcl-2 y Bcl-xL), produciendo finalmente, la disrupción de la membrana mitocondrial, incremento de ROS (especies oxígeno reactivas), liberación de citocromo-c, activación de caspasa-9, caspasa-3 y caspasa-7, así como, la activación tardía de la caspasa-8, amplificando así la señal inicial de apoptosis mitocondrial (Reyes-Zurita y col., 2009, Reyes-Zurita y col., 2011).

El proceso por el cual el AM era capaz de llevar su actividad anticancerígena fue estudiado en detalle, encontrándose que la caspasa-9 (activadora) y la caspasa-3 (ejecutora) se activaban de manera significativa después de 48 h, alcanzando su nivel máximo después de 72 h.

Las caspasas iniciadoras, tales como caspasa-8 y caspasa-7 se activaban después de 72 h, amplificándose la señal apoptótica (Reyes-Zurita y col., 2011).

De esta manera, el ácido maslínico puede jugar un papel importante como quimioterapéutico y quimiopreventivo en el tratamiento de carcinoma de colon.

I.2.1.2 Actividad antioxidante

El efecto del AM como antioxidante ha sido también estudiado sobre la susceptibilidad del plasma o membrana de hepatocitos a la peroxidación lipídica (LPO), inducida respectivamente por el radical hidroxilo (OH^\cdot).

Se ha demostrado que ratas tratadas con AM presentan unos niveles endógenos más bajos de radicales en plasma y en las membranas de los hepatocitos. De este modo, este compuesto podría mostrar algunas ventajas en la resistencia al estrés oxidativo en animales (Montilla y col., 2003).

Este efecto también ha sido estudiado por otros autores, Márquez-Martín y col., (2006a). Dichos investigadores han demostrado el efecto del AM en condiciones de estrés oxidativo y producción de citoquinas usando macrófagos de mamíferos. Los mismos concluyeron que el AM producía la inhibición de la actividad radicalaria de óxido nítrico (NO) inducida por el lipopolisacárido (LPS). Este resultado podría ser consecuencia de la inhibición de la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible, iNOS.

Cuando medían las especies oxígeno reactivas (ROS), previa estimulación con 12-miristato-13-acetato-forbol (PMA), no se apreciaron cambios en el anión superóxido debido al AM; aunque el pre-tratamiento con AM sí fue capaz de producir una disminución en la generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de forma dosis dependiente. De esta forma se concluyó, que el AM presenta un potencial biofarmacéutico, ya que previene el estrés oxidativo (Márquez-Martín y col., 2006a).

A su vez, se ha demostrado que el ácido maslínico puede reducir el estrés oxidativo y modular la liberación de ROS, por ejemplo de NO y H_2O_2 y las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y $\text{TNF}\alpha$ en macrófagos. El NO está implicado en la fagocitosis como respuesta fisiológica. Sin embargo, el NO, puede aumentar la inflamación y lesiones en los tejidos cuando se produce en altas cantidades (Márquez-Martín y col., 2006a).

El tratamiento con LPS hace que las células presenten hasta 36 veces más altos los niveles de NO, que las células no tratadas con LPS. Este hecho lo han estudiado varios investigadores (Márquez-Martín y col., 2006a).

También, en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) se ha demostrado que el AM puede reducir los niveles intracelulares de ROS y de H₂O₂ inducidos por la lesión oxidativa (Allouche y col., 2011).

En células neuronales normales, sometidas a estrés por privación de oxígeno y glucosa, se ha encontrado que el AM logra normalizar la expresión de las caspasas y aumentar la expresión de Bcl-2/Bax. Adicionalmente, el AM inhibe la producción de NO y la expresión de iNOS. En este estudio se concluye que el AM puede proporcionar neuroprotección (Qian y col., 2011).

I.3.1.3. Efecto inmuno-modulador

Los triterpenos pentacíclicos presentan propiedades anti-inflamatorias y pro-inflamatorias, y la mayor o menor capacidad inflamatoria depende de la propia estructura del triterpeno y de la dosis empleada de cada uno de ellos (Márquez-Martín y col., 2006b).

Para demostrarlo, estos autores, investigaron el efecto de los triterpenos presentes en la fracción no glicérica del aceite de orujo de oliva sobre la producción de citoquinas (glicoproteínas solubles, que participan en la inicialización, mantenimiento y regularización de la respuesta inflamatoria, homeostasis y en los propios procesos inflamatorios) en células mononucleadas de sangre periférica (PBM), y los resultados que obtuvieron fueron una disminución en la producción del factor de necrosis tumoral (TNF α), en la concentración de citoquinas y de quimioquinas.

Más recientemente, investigaciones realizadas por Huang y col. (2011) en cultivos de astrocitos de ratas estimulados con lipopolisacáridos (LPS) demostraron que el

tratamiento con ácido maslínico presenta una fuerte acción antiinflamatoria mediante la inhibición de la producción óxido nítrico y el factor de necrosis tumoral (TNF α).

El tratamiento con ácido maslínico a su vez inhibió la traslocación de la subunidad p65 de NF-kB inducida por LPS y la fosforilación de I κ B α inducida por LPS. El AM también inhibió significativamente la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Estos resultados sugieren que el ácido maslínico puede reducir potencialmente la neuroinflamación mediante la inhibición de NF-kB (Huang y col., 2011)

I.2.1.4. Efecto vaso-modulador

Se ha estudiado la capacidad vaso-moduladora que presentan los compuestos triterpénicos. En este sentido, se ha analizaron los efectos del ácido oleanólico, maslínico, eritridiol y uvaol sobre la vaso-relajación en la aorta de ratas hipertensas (SHR) (Rodríguez-Rodríguez y col., 2006), y se pudo comprobar que todos los triterpenos aislados produjeron vaso-relajación dosis dependiente.

I.3.1.5. Efecto sobre actividades enzimáticas

El ácido maslínico no es sólo capaz de inhibir la acción de serín-proteasas, sino que también la de otras enzimas. La enzima colesterol acil transferasa (hACAT-1) cataliza la acilación del colesterol para dar ésteres de ácidos grasos de cadena larga y el AM es capaz de inhibir esta acción enzimática. Se encontró una actividad inhibitoria del 46,2 \pm 1,1% del enzima hACAT-1 y del 17,3 \pm 1,1% de hACAT-2 a una concentración de ácido maslínico de 100 μ g/mL.

La inhibición de las colesterol acil transferasas presenta importancia en el tratamiento de enfermedades como la hipercolesterolemia y la arterioesclerosis, donde los inhibidores clásicos presentan inconvenientes por su biodisponibilidad oral y su toxicidad renal o hepática (Kim y col., 2005).

Se ha comprobado que los triterpenos, ácido corosólico y ácido maslínico son inhibidores de la glucógeno fosforilasa (GP) (Wen y col., 2005). Estos autores afirman que estos compuestos inhiben, en ratones diabéticos, el incremento de glucosa sanguínea inducida por adrenalina, probablemente a través de la inhibición de la actividad de la enzima glucógeno fosforilasa.

Estos mismos autores sintetizaron derivados del ácido maslínico, determinando sus efectos sobre la enzima glucógeno fosforilasa de músculo de conejo (Wen y col., 2006). Estos resultados de inhibición de la GP también han sido hallados en astrocitos (Guan y col., 2009).

Se han aislado a partir de *Tetracera boliviana*, tres triterpenos, entre ellos dos derivados del ácido maslínico, el ácido 3-cis-p-coumaroil maslínico, y el ácido 3-trans-p-coumaroil maslínico (Pungitore y col., 2007). Ambos, presentaron capacidad de inhibición sobre las ADN topoisomerasas y ADN polimerasas.

Estas enzimas juegan un papel crucial en la replicación, transcripción, recombinación y segregación de cromosomas durante la mitosis. Inhibidores de estas enzimas podrían tener un papel importante como antitumoral (Pungitore y col., 2007).

Sultana y Lee, en 2007, probaron el efecto del AM frente a las elastasas (hidrolizan la elastina de los tejidos) y observaron que el ácido maslínico presentó una IC₅₀ de 21,21 µg/mL. En este sentido el ácido maslínico podría jugar un papel importante para la industria cosmética por inhibir la acción proteolítica sobre la elastina (Sultana y Lee, en 2007).

Recientemente, se ha comprobado que en células B-linfoblastoides humanas (células Raji), el AM inhibió (de forma dependiente a la concentración) la expresión de la proteína quinasa C (PKC), la cual se encuentra implicada en la carcinogénesis. En este estudio, se concluye que el AM podría estar implicado en la regulación de vías de señalización que se activan a través de receptores de PKC (Mooi y col., 2012).

2.1.6. Efecto anti-microbiano

Varios grupos de investigación, han comprobado que el AM actúa como un potente inhibidor de proteasas, en concreto de serín-proteasas. Esta propiedad ha sido empleada en el tratamiento de determinadas enfermedades, como por ejemplo aquellas enfermedades causadas por el virus de la inmunodeficiencia adquirida (HIV) (Xu y col, 1996; García-Granados y col, 1998a; Vlietinck y col, 1998) y aquellas otras provocadas por parásitos del género *Cryptosporidium* (García-Granados y col, 1998b).

Cryptosporidium parvum es un parásito oportunista ampliamente distribuido en la naturaleza. En condiciones normales, este organismo es capaz de resistir su acción invasiva. Sin embargo, es capaz de desarrollarse rápidamente, solo o en compañía de otros agentes infecciosos oportunistas en organismos inmunodeprimidos, siendo el caso típico el de los individuos afectados por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Estos parásitos producen ciertos enzimas que les permiten atravesar la pared celular de las células huésped. Un grupo de enzimas que juega un papel importante en estos procesos son las proteasas (McKerrow y col, 1993).

La invasión de células por las especies del género *Cryptosporidium* se realiza mediante la apertura de la membrana de la célula a invadir utilizando serín-proteasas. El tratamiento con AM es capaz de inhibir la infección de células MDCK por el parásito *Cryptosporidium parvum* en un 92,3% a una concentración de 37 mg/mL. Es capaz de inhibir la infección de *Toxoplasma* en células Vero, en un porcentaje del 87% a 30 mg/mL. Y, también, se han mostrado efectos inhibidores sobre los parásitos *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania donovani*.

La capacidad de inhibitoria del ácido maslínico sobre la infección de estos agentes microbianos se debe a su posible inhibición de las serín-proteasas que utilizan estos parásitos para abrirse paso hacia las células hospedadoras (García-Granados y col., 1998b).

La capacidad inhibidora sobre micrororganismos también se ha observado en derivados del ácido maslínico. Los derivados, 3β , O-trans-caumaroil maslínico y el 3β ,O-cis-caumaroil-maslínico, mostraron actividad antimicrobiana frente a bacterias gram positivas y hongos, aunque en bacterias gram negativas no se vio tal efecto (Braca y col., 2000).

I.2.1.7 Efecto anti-viral

El AM ha sido utilizado en el tratamiento de diversas patologías, una de ellas es la causada por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV). Diversos autores han estudiado este hecho y todos ellos han descrito que el AM es un inhibidor de la serín-proteasa HIV-1, de tal manera que, *in vitro*, el AM impide la replicación de este virus, aunque no se conoce si el compuesto es capaz de actuar en el ámbito intracelular, y de si hay margen entre la dosis terapéutica y la concentración admisible según su toxicidad (Xu e tal., 1996; García-Granados y col., 1998b y Vlietinck y col., 1998).

La terapia frente al HIV se basa en tres tipos de agentes: análogos de nucleósidos, inhibidores de la transcriptasa inversa e inhibidores de la proteasa. Esta última es un componente esencial en el ciclo replicativo de los virus HIV. Su inhibición conduce a progenies virales no infecciosas, por lo que previene la expansión de la infección.

La proteasa es un dímero de dos cadenas con 99 aminoácidos cada una. Se postula que se trata de una aspartato proteasa, bastante diferente a las proteasas aspárticas humanas, por lo que su tratamiento selectivo es factible (Moyle y Gazzard, 1995).

I.2.1.8. Aditivo alimentario y proliferativo in vivo

El AM puede ser utilizado como aditivo alimentario en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Fernández-Navarro y col., (2006), concluyeron que el ácido maslínico puede actuar como un factor estimulante del crecimiento en el hígado de la trucha arco iris. El AM, cuando se añade a la dieta en una concentración de 25 y 250 mg/kg, estimula la

velocidad de síntesis hepática de proteínas, los procesos de hiperplasia, y los niveles de glucógeno celular, en el hígado. Al final, se determinó el peso total, el peso del hígado y el coeficiente de crecimiento siendo mayor en truchas alimentadas con el ácido maslínico que en las truchas controles (Fernández-Navarro y col., 2006).

El peso final en las truchas alimentadas con 250 mg/kg de ácido maslínico fue un 30% superior al control. Además, el ADN total hepático, utilizado como marcador de hiperplasia, fue superior en un 37% con la dosis de 25 mg/kg y un 68% a la de 250 mg/kg respecto al control. La velocidad de síntesis de proteína hepática fraccional y absoluta fue significativamente superior respecto al control.

Todos estos resultados están relacionados con el crecimiento del animal completo, por lo que el ácido maslínico puede actuar como un factor de crecimiento cuando es adicionado en la dieta (Fernández-Navarro y col., 2006).

En otro trabajo, realizado en dentón (*Dentex dentex*), cuando se añadió ácido maslínico a la dieta en una concentración de 0, 20, 40 y 80 mg/kg durante 49 días, no se encontraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento de estos peces (Hidalgo y col., 2006). Resultados semejantes a los del hígado, fueron encontrados en el músculo blanco de la trucha arco iris (Fernández-Navarro y col., 2008).

El músculo blanco es el tejido más abundante en peces, y su tasa de crecimiento es muy similar a la de todo el cuerpo (Weatherley y Gill, 1989), por lo que determina en gran medida el crecimiento y el tamaño de los peces (Weatherley y Gill, 1984).

Estudios similares a los realizados en trucha, se han realizado en dorada (Rufino-Palomares y col. 2011; Rufino-Palomares y col. 2012); en este caso las dosis de AM empleadas fueron 50 y 100 mg/kg de ácido maslínico, y se pudo observar que a ambas concentraciones de AM, se producía un mayor crecimiento del animal completo, una mayor tasa de síntesis proteica en hígado y músculo, así como un mayor contenido en ácidos nucleicos.

Estos mismos autores, Rufino-Palomares y col., 2013 relacionaron esta capacidad de crecimiento con el estado metabólico del pez y se vio que éste estaba estimulado en respuesta al AM, sin provocar daño alguno ni en los tejidos estudiados, ni en el animal completo.

Asimismo, Rufino-Palomares y col., 2011, estudiaron por primera vez en peces, el proteoma completo de dorada mediante técnicas de proteómica. En tales estudios, pusieron de manifiesto que el AM provocaba cambios en la expresión de proteínas en hígado de dorada. En este sentido, propusieron un mecanismo de ruta molecular por el que el AM provocaba cambios a nivel metabólico, para finalmente inducir cambios en el crecimiento de estos animales.

I.3. Estrés oxidativo. Generalidades

El oxígeno molecular es indispensable en los procesos metabólicos de los seres vivos aerobios. Como consecuencia del metabolismo endógeno y a la acción de determinados factores externos se generan una serie de moléculas especialmente reactivas llamadas radicales libres y que son las responsables de la toxicidad del oxígeno.

Un radical libre es una molécula o fragmento de molécula, que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo (van der Vliet y col., 1999), siendo este electrón desapareado el que le confiere gran reactividad. Tienen una vida media del orden de milisegundos, aunque varía según el tipo de radical libre, y poseen una gran afinidad para reaccionar con moléculas de alrededor, extrayendo o donando electrones con el fin de estabilizar sus orbitales externos.

Existe gran cantidad de radicales libres, que pueden derivar del oxígeno o del nitrógeno, siendo, respectivamente, denominadas en conjunto “especies reactivas de oxígeno (ROS)” y “especies reactivas de nitrógeno (ERN)”. Las ROS representan la clase

más importante de radicales generados en los sistemas vivos (Valko y col., 2007). Se trata de un término colectivo que incluye tanto radicales libres de oxígeno como sustancias “no radicales” que son agentes oxidantes que se convierten fácilmente en radicales como es el caso del Peróxido de Hidrógeno (Buonocore y col., 2010).

Las ROS pueden inducir daños en diferentes tejidos al producir la peroxidación lipídica de las membranas, fenómeno implicado en la fisiopatología de muchas enfermedades (Ames y col., 1993). Durante los eventos hipóxicos se incrementa la producción de ROS, mecanismo en el cual juegan un papel preponderante la xantina oxidasa y las células del sistema retículo endotelial (Valko y col., 2007).

Los organismos vivos utilizan una variedad de mecanismos antioxidantes para hacer frente a los efectos nocivos de las ROS. De esta manera, existen moléculas exógenas o de síntesis endógena y determinadas enzimas destinadas a interceptar o inactivar los radicales libres (Figura 4) (Cadenas, 1995).

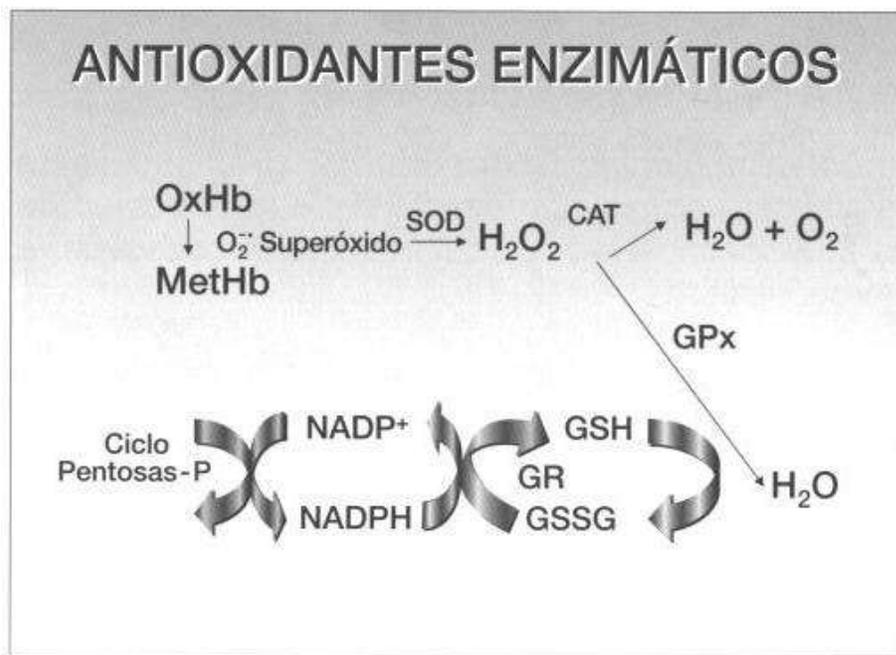


Figura 4. Diferentes antioxidantes enzimáticos para las especies reactivas del oxígeno.

El estudio se centrará en las enzimas que están relacionadas con la defensa antioxidante por ser uno de los objetivos de este trabajo.

Estas enzimas son de gran importancia en la vida aerobia, demostrándose un incremento de su actividad asociado a niveles altos de oxígeno ambiental ya que, en estas condiciones, favorece la formación de especies de oxígeno reactivo (Cadenas, 1995; Felton, 1995; Liebler y Reed, 1997).

Las superóxido dismutasas (SOD) son un conjunto de metaloproteínas ampliamente distribuidas que catalizan la dismutación del anión superóxido [O_2^-] en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (McCord y Fridovich, 1969).

La catalasa participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno. La catalasa (CAT) está presente en casi todos los tejidos animales y especialmente en hígado y eritrocitos, presentando baja actividad en cerebro, corazón y músculo.

En concreto, se ha encontrado actividad catalasa/peroxidasa en peroxisomas, asociada a la producción de H_2O_2 durante la β -oxidación, observándose niveles casi inexistentes en mitocondrias y retículo endoplasmático (Chance y col., 1979).

Para combatir las ROS, el organismo presenta medios de defensa entre los que se encuentra el sistema de glutatión peroxidasa/glutatión reductasa (GPX/GR). La glutatión reductasa (GR) es una enzima que cataliza la reducción del glutatión oxidado a glutatión reducido el cual será utilizado por la glutatión peroxidasa (GPX) para la reducción del peróxido y de lipoperóxidos, los cuales son especies reactivas del oxígeno.

Estas enzimas juegan un importante papel en la defensa antioxidante y debido a su presencia en los diferentes tejidos y órganos está involucrada en la fisiopatología de varias enfermedades (Fernandez-Checa y col., 1997; Garcia-Ruiz y Fernandez-Checa, 2006).

La GR permite mantener concentraciones de glutatión reducido (GSH) en la célula no sólo para ser utilizado por la GPX en la eliminación del H_2O_2 ; este GSH también es de

utilidad en la recuperación de las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (alfa-tocoferol) luego de participar en la eliminación de radicales libres generados *in situ* o a distancia.

El GSH interviene además en la detoxificación de compuestos xenobióticos, el almacenamiento y transporte de cisteína, la regulación del balance redox de la célula, el metabolismo de leucotrienos y prostaglandinas, la síntesis de los desoxirribonucleótidos, la función inmunológica y la proliferación celular. Por tanto, la alteración de la actividad de la GR provocará disminución en las concentraciones de GSH dando lugar a un aumento en los niveles de especies reactivas del oxígeno.

La alteración de la actividad de la GR y de los niveles de GSH por esta consecuencia se ha reportado en varios procesos patológicos y está asociada con un aumento del riesgo al estrés oxidativo (Fernandez-Checa y col., 1997; Garcia-Ruiz y Fernandez-Checa, 2006).

La glutatión peroxidasa (GPX) es una de las enzimas que participan en las transformaciones de especies reactivas del oxígeno, catalizando la reducción del peróxido o lipoperóxido, para lo cual utiliza como agente reductor al glutatión reducido. Esta enzima desempeña un importante papel en la defensa antioxidante por su localización en todos los órganos y tejidos, como parte del sistema antioxidante del glutatión, por lo que está involucrada en la fisiopatología de varias enfermedades (Nakano y col., 1999).

La GPX y la GR se encuentran formando parte de un sistema antioxidante (GPX/GR) y la catalasa de otro (SOD/CAT). Se sabe que ambos sistemas no actúan a la par, por tener afinidades diferentes al peróxido: la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H₂O₂ (Giblin y col., 1982) y la GPX lo hace a bajas, a concentraciones casi fisiológicas (Spector y Garner, 1981), lo que demuestra una correlación inversa en la actividad de ambas enzimas. Sin embargo, GPX resulta más eficiente en la desintoxicación por H₂O₂ (Giblin y col., 1982). Además algunas citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF), elinterferón (IFN) y la interleuquina-1 (IL-1) son capaces de inhibir la actividad de la GPX (Lam y col., 1993).

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) cataliza la transformación de la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona relacionada con la conversión de NADP a NADPH (Warburg y Christian, 1931). Esta enzima presenta un papel importante en la ruta de las pentosas fosfato, en diversos trastornos hemolíticos y, además su actividad puede variar en distintas condiciones nutricionales y hormonales (Kletzien y Berdanier, 1993; Kletzien y col, 1994; Hodge y Salati, 1997; Farhud y Yazdanpanah, 2008).

El potencial como de esta enzima como regulador para la disponibilidad de la NADPH reducida es requerido en diferentes procesos biosintéticos (Chung y Langdon, 1963). Una de las funciones del NADPH es la protección de las células contra los agentes oxidantes mediante la acción conjunta de la GR en la reducción del disulfuro de glutatión (GSSG) por lo que el G6PDH actuaría como cofactor (Levy, 1979). NADPH es crítico para la conversión de la forma inactiva de la catalasa en forma activa (Beutler, 1994).

La glutatión S-transferasa (GST) forma parte de una familia de enzimas que poseen papeles importantes en la regulación del equilibrio intracelular de ROS. GST cataliza la conjugación de glutatión reducido con compuestos que contienen un centro electrófilo, de forma que los compuestos derivados pueden ser excretados de las células.

De esta forma, GST contribuye a la desintoxicación celular de compuestos endógenos como 4-hydroxyalkenals y propenales (productos tóxicos de la peroxidación lipídica), y xenobióticos, incluyendo fármacos, herbicidas e insecticidas (Danielson y col, 1987; Hayes y Pulford, 1995; Huang y col., 2011).

Las moléculas y enzimas antioxidantes operan en conjunto contra la toxicidad del oxígeno, observándose un efecto regulador entre ellas, ya que un descenso en la actividad SOD va asociado a una menor GPX y catalasa, lo que podría deberse a una posible inactivación de estas enzimas por parte del O_2^- acumulado. De igual manera, un incremento de H_2O_2 , asociado a baja actividad catalasa y GPX, también puede ejercer un efecto inhibitor en la actividad SOD (Halliwell, 2000).

En resumen, en condiciones normales el organismo está generando especies de oxígeno reactivo (ROS) que son eliminadas por la acción de defesas antioxidantes. Las enzimas antioxidantes juegan un papel fundamental en la prevención de los daños oxidativos, y catalizan una serie de reacciones secuenciales con el fin de asegurar la mayor protección frente a las distintas ROS.

El efecto del ácido maslínico como agente antioxidante ha sido probado sobre diferentes líneas celulares tales como: hepatocitos, macrófagos, células de cáncer de mama, neuronas normales, etc. (Montilla y col., 2003; Márquez-Martín y col., 2006a; Allouche y col., 2011; Qian y col., 2011), donde se ha hallado la reducción de radicales libres intracelulares.

Resultados preliminares (no publicados) obtenidos por el grupo de investigación del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad de Granada muestran que el ácido maslínico no posee actividad captadora de radicales libres (scavenger activity), pero si es capaz de modificar los niveles endógenos de antioxidantes celulares.

Por otro lado, aún no se conoce el mecanismo molecular por el cual el ácido maslínico es capaz de inducir este efecto antioxidante, ni cuál es su efecto en condiciones similares en células normales no cancerígenas.

OBJETIVOS

Figura 1. Fotografía de la hoja y del fruto del árbol *Olea europaea*, “el olivo”, de donde se extrae entre otros compuestos triterpénicos, el ácido maslínico en una concentración superior al 60%.

II- OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

Caracterización del efecto antioxidante y proliferativo desencadenado en respuesta a la acción del ácido maslínico en diferentes líneas celulares.

II.2. Objetivos específicos

II.2.1. Efecto antioxidante

- Estudiar el efecto oxidante de la ausencia de factores de crecimiento (FBS), de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y nitroprusiato sódico (SNP), comparando una línea celular tumoral (B16-F10), con una línea normal de músculo liso (A10). Estudio de concentraciones y tiempo.
- Estudiar el efecto antioxidante del AM provocado por el estrés celular que se ha generado por la privación del suero durante el crecimiento celular durante los estudios de proliferación.
- Determinar la capacidad antioxidante del AM en las situaciones ensayadas. Estudio de concentraciones y tiempo mediante el ensayo MTT y contaje celular.
- Estudiar la mayor o menor actividad celular del AM por citometría de flujo utilizando como fluorocromo la 1, 2, 3 dihidrorodamina, DHR.
- Caracterizar la cinética de las enzimas relacionadas con la defensa antioxidante.
- Determinar la expresión proteica de los marcadores moleculares que median la respuesta antioxidante, mediante la técnica de western blotting.

II.2.2. Efecto proliferativo

- Determinar el nivel de proliferación y viabilidad celular de las líneas HT29 y HepG2 frente al ácido maslínico mediante el ensayo MTT.

- Asegurar si se producía un efecto proliferativo a las concentraciones subcitotóxicas utilizadas, mediante contaje celular.
- Para corroborar y comprobar si realmente el ácido maslínico inducía un efecto proliferativo sobre células en cultivo, se estudió la acción de dicho compuesto sobre el ciclo celular por citometría de flujo.
- Analizar los niveles de expresión de las proteínas p-IkB y p-Akt, ambas implicadas en procesos de proliferación.
- Conocer el mecanismo de acción del 0 AM mediante proteómica de los patrones de expresión proteica del citoesqueleto en HT29.

METODOLOGÍA

III. METODOLOGÍA

III.1. Líneas celulares empleadas

En este trabajo se usaron diferentes líneas celulares. Para evaluar el efecto antioxidante del AM se emplearon B16-F10 y A10, y para estudiar el efecto proliferativo, HT29 y HepG2.

III.1.1. Línea celular B16-F10

Células de melanoma de ratón (*Mus musculus*). Obtenidas del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Este tipo celular es una variante de las células de melanoma de murinos B16. Presentan un potencial metastásico superior a las células de B16 (Sloane y col., 1982). En la figura 5 puede observarse en detalle un cultivo de este tipo de células.

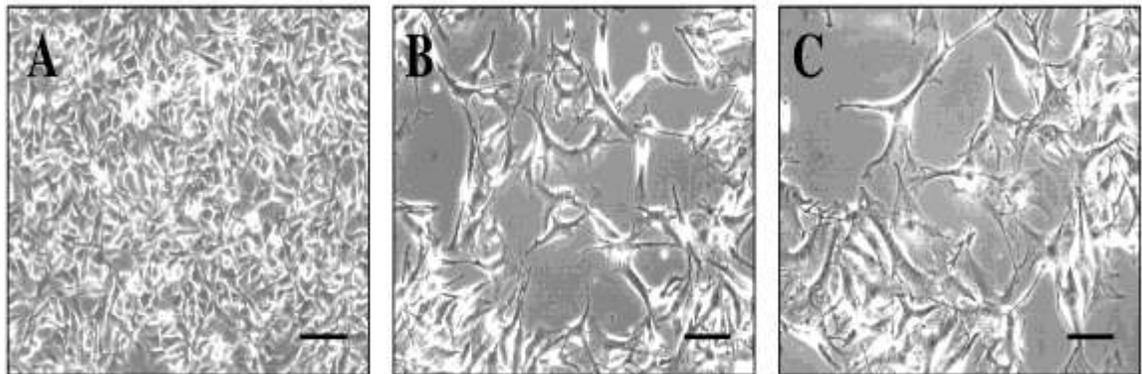


Figura 5. Detalle de un cultivo de B16.F10 a diferentes aumentos, de menor aumento a mayor A, B, C respectivamente.

III.1.2. Línea celular A10

Es una línea celular derivada de la aorta torácica de embriones de ratón y es usada en como modelo de estudio de las células musculares lisas (SMC) (Rao y col., 1997). Este tipo

celular muestra una gran capacidad proliferativa y pueden ser subcultivadas varias veces, lo que permite una rápida obtención de masa celular (Figura 6).

En los cultivos primarios, las células sufren un proceso de modulación de su fenotipo. En general, tras ser cultivadas, conservan el fenotipo contráctil durante unos pocos días (de 1 a 7), a continuación se produce una modulación hasta el fenotipo sintético, seguido de una intensa proliferación.

Cuando el cultivo se acerca a la confluencia, disminuye la proliferación y se depositan grandes cantidades de matriz extracelular. Frecuentemente, una vez que el cultivo ha alcanzado la confluencia, modula su nuevo fenotipo hacia el contráctil. De esta forma, el fenotipo contráctil se manifiesta únicamente en etapas tempranas y finales del cultivo primario (Chamley-Campbell, J y col., 1979).

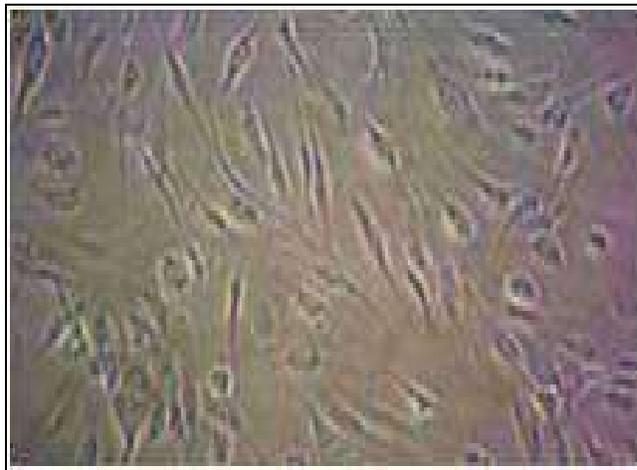


Figura 6. Detalle de un cultivo de las células A10.

Dependiendo del animal y de la especie del que procedan, los cultivos primarios de SMC vascular pueden cultivarse entre 6 y 20 veces, hasta que el cultivo muere por un proceso de senescencia.

Las SMC cultivadas van perdiendo progresivamente la capacidad de modular su fenotipo, de forma que a partir del tercer o cuarto pase, casi la totalidad de las células tiene el fenotipo sintético (inclusive en estado de confluencia).

Posiblemente debido a la gran síntesis de matriz extracelular, los cultivos SMC pueden crecer formando varias capas cuando alcanzan la confluencia. Esto provoca un tipo de confluencia denominado “colinas” o “valles”, las colinas contienen de 5 a 10 capas de células, mientras que los valles no contienen más de 3 capas celulares (Chambey-Campbell y col., 1979).

La composición de la matriz extracelular producida por la SMC en cultivo primario, es similar a la encontrada en el tejido conectivo de los vasos sanguíneos de los que procedan (principalmente colágeno I y II, elastina, proteoglicanos y glucosaminoglicanos), aunque se han descrito alteraciones en la composición relacionadas con la especie, las condiciones y el número de pases del cultivo (Chambey-Campbell y col., 1979).

Cuando la población celular se encuentra en crecimiento activo, la mayoría de los recursos se destinan a la proliferación y cuando ésta cesa, se activa la síntesis de matriz extracelular (Stepp, y col., 1986).

III.1.3. Línea celular HT29

Son líneas celulares derivadas de cáncer colorrectal. Han proporcionado una herramienta muy útil para el estudio de genes reguladores de la diferenciación intestinal y su implicación en el cáncer, en gran parte debido a la dificultad de obtener cultivos primarios a partir de células epiteliales normales de intestino (Figura 7).

En particular, algunas líneas celulares colorrectales tienen conservadas partes del programa de diferenciación epitelial del intestino, expresando muchos de los genes característicos de las células del epitelio colónico diferenciado (por ejemplo de células absortivas o mucosecretoras), y mantienen la capacidad de formar monocapas de células polarizadas una vez que han alcanzado la confluencia en cultivos *in vitro*.

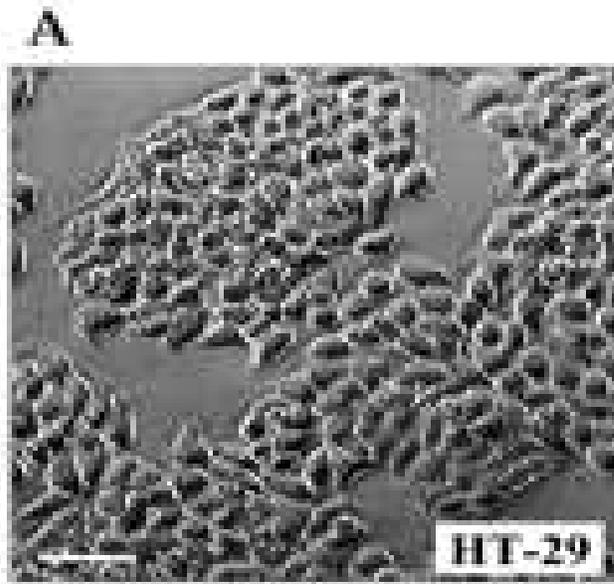


Figura 7. Morfología típica celular de un cultivo de HT29.

Por otra parte, muchas de estas líneas celulares presentan mutaciones genéticas, así como inestabilidad cromosómica y de microsatélites similares a lo que ocurre en tumores colorrectales, lo cual es muy interesante a la hora de estudiar la conservación o pérdida de mecanismos de diferenciación celular durante la progresión tumoral.

En consecuencia, estas líneas celulares son muy útiles como modelos de diferenciación celular, normal y tumoral. La línea celular HT29 fue establecida en 1975, derivada de células de adenocarcinoma de colon humano (Fogh J, 1975). Originalmente fue aislada a partir del cáncer de colon de una mujer caucásica de 44 años de edad.

A nivel morfológico, los cultivos de esta línea celular son heterogéneos y contienen subpoblaciones de células con diversa capacidad de diferenciación. Así pues, en condiciones estándar de cultivo, la población HT-29 contiene más de un 95% de células morfológicamente indiferenciadas: durante el crecimiento hacia postconfluencia, las células se van apilando y no se polarizan, formando multicapas, y no expresan marcadores de diferenciación característicos de células del epitelio intestinal adultas.

Sin embargo, el 5-10% restante de la población total desarrolla características diferenciadas: expresan enzimas como la aminopeptidasa N (APN), dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV), antígeno carcinoembrionario (CEA), la glicoproteína membranal MUC1 así como otras mucinas (Lesuffleur, T. et al., 1990).

III.1.4. Línea celular HepG2

Es una línea permanente que se deriva del tejido del hígado de un varón caucásico de 15 años de edad con un carcinoma hepatocelular bien diferenciado. Estas células son epiteliales en su morfología y secretan una variedad de proteínas plasmáticas importantes, por ejemplo, albúmina, transferrina y el fibrinógeno proteínas de fase aguda, alfa 2-macroglobulina, la alfa 1-antitripsina, la transferrina y el plasminógeno (Figura 8).

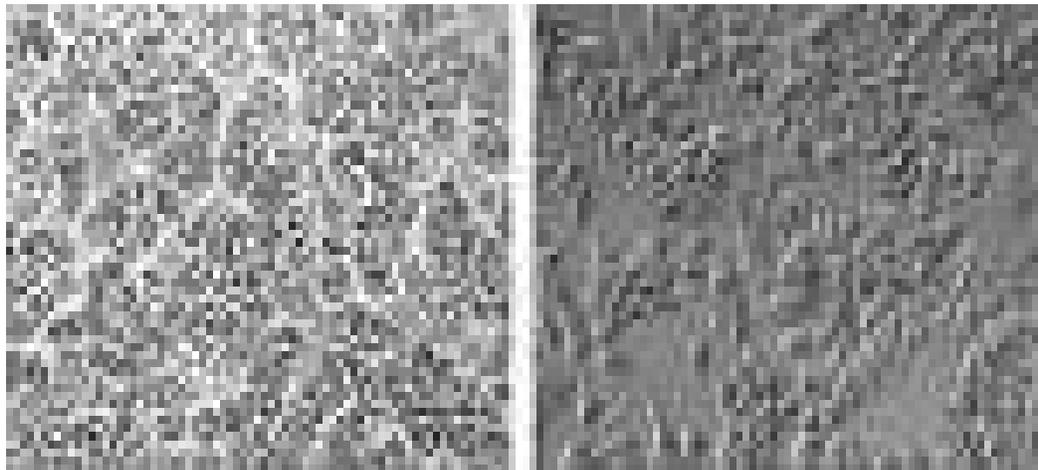


Figura 8. Morfología típica celular de un cultivo de células de carcinoma hepatocelular humano HepG2.

Las células HepG2 constituyen un modelo *in vitro* para el estudio de polarizado hepatocitos humanos. Debido a su alto grado de diferenciación morfológica y funcional *in vitro*, las células HepG2 son un buen modelo para estudiar el tráfico intracelular y la dinámica de proteínas de la membrana canalicular y sinusoidales, y los lípidos hepáticos humanos *in vitro*.

Esto puede ser importante para el estudio de enfermedades hepáticas humanas que son causadas por una incorrecta distribución subcelular de las proteínas de superficie celular, por ejemplo, defectos del transporte hepato-canalicular, como son el síndrome de Dubin-Johnson, la progresiva colestasis intra-hepática familiar (PFIC) y la hipercolesterolemia familiar.

Las células HepG2 se utilizan también como un sistema modelo para estudios de metabolismo hepático y toxicidad de xenobióticos, detección de citoprotectores, anti-genotóxicos (del medio ambiente y la dieta) y agentes cogenotóxicos.

III.2. Subcultivos celulares

Las líneas celulares fueron mantenidas en cultivos iniciales, en placas y en flascos, según población celular existente. El medio de cultivo empleado fue DMEM conteniendo glucosa (4,5 g/L) y L-glutamina de la casa comercial PAA.

Este medio era suplementado de forma distinta según la línea celular: los cultivos de melanoma (B16-F10) contenían adicionalmente suero bovino fetal (FBS) al 10% y gentamicina al 0,5%, por otro lado, los cultivos de células de músculo liso de ratón (A10), adenocarcinoma de colon (HT29) y carcinoma hepatocelular humano (HepG2), contenían suero bovino fetal (FBS) al 10% y estreptomycin/penicilina al 1%.

Las células se mantenían incubadas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y 95% de humedad. Los diferentes subcultivos se realizaron en condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar.

Cuando las células se encontraban próximas a la confluencia (90% aproximadamente), eran subcultivadas: primero se les retiraba el medio, seguidamente se lavaban 3 veces con PBS (tampón fosfato salino), luego, se despegaban del soporte por incubación con tripsina-EDTA (0,25% de Tripsina, 1mM de EDTA, Sigma) durante 3-5 minutos en una estufa.

Posteriormente, se inactivaba la tripsina con medio de cultivo suplementado con FBS y se recogía, en tubos de centrifuga, la solución resultante. A continuación, se centrifugaba a 1500 rpm durante 5 minutos y el pellet de células obtenido era resuspendido vigorosamente en 1 mL de medio de cultivo, con objeto de separar las células bien, para finalmente sembrarlas en diferentes placas según los diferentes ensayos a realizar.

III.3. Almacenamiento celular y descongelación

Las líneas celulares fueron congeladas en criotubos con FBS y un 10% de DMSO (dimetil sulfóxido). La congelación fue gradual: 1 hora a 4°C, 2 horas a -20°C, y finalmente, se almacenaban a -80°C. Para la descongelación, los criotubos se descongelaban rápidamente y se diluían en medio de cultivo, posteriormente eran incubadas a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO₂.

III.4. Preparación del ácido maslínico

El ácido maslínico empleado fue obtenido a partir de restos de molturación de la aceituna (*Olea europaea*). El suministro de este compuesto natural fue ofrecido por la empresa Biomaslinic, S.L. El extracto correspondía al compuesto purificado al 98%. Asimismo, se utilizó en las mismas condiciones la sal sódica del compuesto.

El ácido maslínico y la sal sódica se disolvían previamente para su uso, a una concentración de 10 mg/mL en 50% de DMSO y 50% de PBS. La solución stock se almacenaba en frío a -20°C. Posteriormente, esta solución se diluía en el medio de cultivo celular hasta alcanzar las concentraciones necesarias para cada tratamiento.

III.5. Tratamientos *in vitro*

Estos ensayos fueron realizados utilizando diferentes agentes y situaciones antioxidantes, tales como el tratamiento con peróxido de hidrógeno, nitropusiato sódico y privación de suero durante el cultivo celular.

III.5.1. Condiciones de estrés celular

Uno de los objetivos de este estudio es determinar la posible capacidad del AM como agente antioxidante. Para ello, en primer lugar lo que se hizo fue estresar a las células con diferentes condiciones y/o agentes oxidantes. Estos tratamientos fueron:

Tratamiento con H₂O₂: El peróxido de hidrógeno es un compuesto capaz de actuar ya sea como agente oxidante o como reductor. El H₂O₂ fue disuelto en el medio de cultivo de las líneas celulares. Las concentraciones empleadas se realizaban extemporáneamente antes de su uso, para evitar que la degradación del compuesto.

Tratamiento con SNP: Nitroprusiato de sodio. Este compuesto es un donador de óxido nítrico (NO) (Zhao y Majewskiet, 2008). Se preparaban las diluciones, directamente antes de adición en el medio de cultivo (extemporáneo).

Cultivo celular sin factores de crecimiento (FBS): Otra condición oxidante en los experimentos fue retirar el FBS a las dos líneas celulares estudiadas en los periodos de tiempo ensayados. Las células B16-F10 y A10 les fueron retirados durante 24 h los factores de crecimiento.

Las células HT29 y HepG2 también fueron sometidas a la ausencia de FBS durante 24 h antes del tratamiento con AM. La puesta a punto del método se realizó un estudio de dosis de compuestos y de tiempos de incubación.

III.6. Contaje celular

Los contajes celulares fueron realizados en la cámara de Neubauer (Figura 9).

Para el contaje se cubrió la cámara con un cubreobjetos y, se introdujo la disolución celular, hecha en PBS y Trypan Blue, por capilaridad entre la cámara y el cubreobjetos, en cada una de las dos zonas de contaje. Posteriormente, se procedió al contaje de células mediante el uso del microscopio a un aumento adecuado.

Este contaje permitía establecer el volumen celular a sembrar, en los cultivos de siguientes ensayos. La formula de valoración del número de células usada fue:

$$\text{Partículas por } \mu\text{L} = \text{Partículas promedio} \cdot \text{dilución} \cdot \text{superficie contada (mm}^2\text{)} \cdot \text{profundidad de cámara (mm)}$$

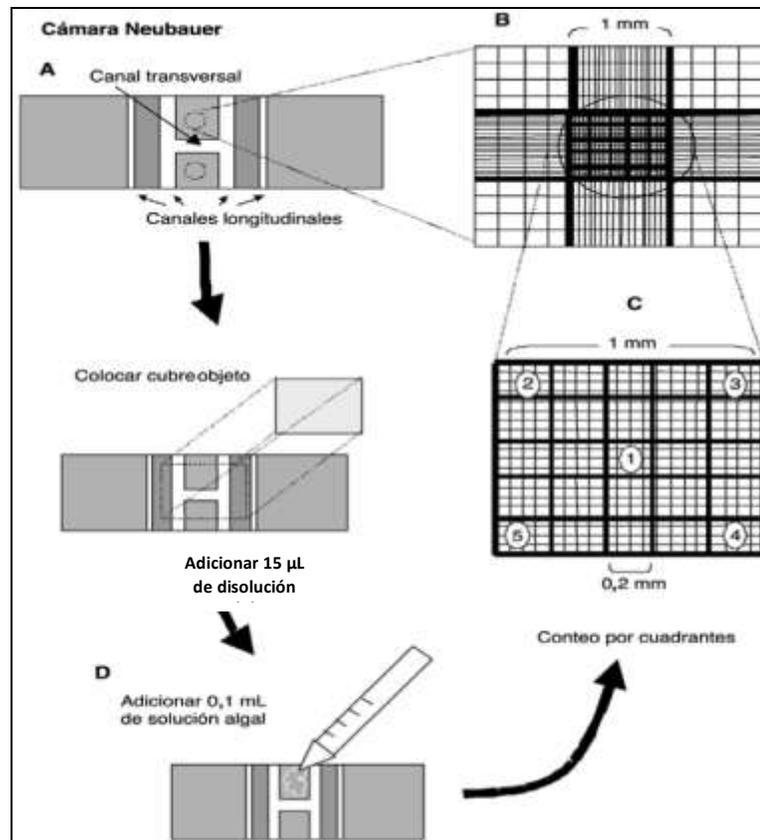


Figura 9. Esquema de uso de la cámara de Neubauer.

III.7. Estudio de viabilidad celular (MTT)

Fue realizado un ensayo de viabilidad con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) según el método colorimétrico analítico-cuantitativo descrito por Mosmann (1983) basado en la reducción de sales sódicas de tetrazolium a formazán.

El MTT es una sal de tetrazolium blanco amarillenta que es transformada en las mitocondrias de las células con capacidad metabólica a formazán, compuesto azul oscuro con

un máximo de absorbancia a 570 nm proporcional al número de células viables. Esta reacción tiene lugar cuando el MTT acepta electrones de un agente reductor o de determinadas coenzimas (tales como el NADH y el NADPH), pudiendo ser cuantificado por colorimetría (Mosmann, 1983; Pauwels y col., 1988).

Los tratamientos se realizaron para determinar la concentración de compuesto a la que se produce una inhibición del crecimiento del cultivo de un 50 % o IC50 (inhibitory concentration of 50%), en cada línea celular bajo condiciones de estrés celular y presencia de compuestos oxidantes. Con los resultados obtenidos se realizaron las diferentes curvas de citotoxicidad en las líneas celulares anteriormente descritas y los distintos tratamientos *in vitro*.

III.7.1. Tratamiento de ácido maslínico con y sin factores de crecimiento (FBS)

Para estos ensayos de citotoxicidad, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos con 0,31 cm²/pozo. Se sembraron en total 1·10⁵ células/pozo de B16-F10, 1,5·10⁵ de A10, 6·10³ de HT29 y 15·10³ de HepG2. Los tipos celulares se hicieron crecer en 200 µL de DMEM suplementado según las condiciones correspondientes a cada tipo celular.

Tras 24 horas de la siembra se retiró el medio, añadiendo nuevo medio DMEN suplementado con el antibiótico correspondiente al tipo celular, introduciendo dos nuevas condiciones: con suero bovino fetal y sin él. A los dos medios de cultivo (con y sin FBS) se le añadieron distintas concentraciones de ácido maslínico que variaron desde 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75 a 100 µg/mL para las células B16-F10, A10, HT29 y HepG2.

Los tiempos de incubación fueron de 24h para todos los casos. La equivalencia de estas concentraciones en molaridad, en función del peso molecular del AM (471,7 g/mol) son las siguientes: 0; 11; 21; 32; 42; 53; 63; 74; 85; 105; 158; 211 mM. De aquí en adelante, utilizaremos una unidad de medida u otra en función de los resultados obtenidos y según con el tratamiento que se las compare, para un mejor entendimiento.

III.7.2. Tratamiento con H₂O₂

El ensayo de citotoxicidad con H₂O₂ se realizó en placa de 96 pocillos. Se sembraron en total 1x10⁵ células/pozo de B16-F10 y 1,5x10⁵ células/pozo de A10. El volumen final fue de 200 µL.

Tras 24 horas de la siembra se retiró el medio, añadiendo nuevo medio con distintas concentraciones de H₂O₂ por pocillo: 0; 0,06; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,75; 1,05; 1,5; 1,95; 2,55; 3 mM, hasta un volumen final de 200 µL. Las células fueron incubadas con estas concentraciones de peróxido durante 24h

III.7.3. Tratamiento con SNP

En este caso se sembraron 1·10⁵ células/pozo de B16-F10 y 1,5·10⁵ células/pozo de A10. Tras 24 horas de la siembra se retiró el medio y se añadió nuevo medio DMEN con distintas concentraciones de SNP: 0; 0,017; 0,034; 0,05; 0,067; 0,084; 0,101; 0,117; 0,134; 0,168; 0,252; 0,336; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; y 0,9 mM. El volumen final fue 200 µL. Las células fueron incubadas con las distintas concentraciones de Nitroprusiato durante 24h.

III.7.4. Obtención de la IC₅₀

A cada tratamiento realizado, se le retiró el todo el medio de cultivo añadiendo nuevo medio DMEN con MTT a una concentración final de 0.5 mg/mL, durante 1h en condiciones de esterilidad, en un incubador humidificado y bajo una atmósfera del 5% en CO₂.

Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio con MTT y se solubilizó el formazán incorporado por las células, con 100 µL de DMSO. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas tipo ELISA. (ELx800, Universal Microplate Reader, BIO-TEK Instruments, INC.)

Los resultados se mostraron como porcentaje de células vivas respecto al control. Estos valores fueron determinados como porcentaje de absorbancia respecto al valor de

absorbancia control para cada concentración de compuesto en cada una de las líneas celulares, ya que los valores de absorbancia se encuentran en proporción directa con el número de células viables.

Con estos resultados se realizaron las diferentes curvas de citotoxicidad en las líneas celulares anteriormente descritas y, se determinó la concentración de compuesto a la que se produce una inhibición del crecimiento del cultivo de un 50 % o IC_{50} (*inhibitory concentration of 50%*). Las concentraciones de ácido maslínico empleadas en los siguientes ensayos fueron iguales e inferiores a esta IC_{50} .

III.8. Estudio viabilidad FDA/IP

III.8.1. Cuantificación celular y determinación de la viabilidad por doble marcaje fluorescente

III.8.1.1. Fundamento

La fluorocromasia es una prueba positiva para células viables en las que el diacetato de fluoresceína (FDA), un éster no polar, atraviesa la membrana y se hidroliza por acción de las esterasas intracelulares para producir fluoresceína, un compuesto polar que queda capturado dentro de las células en división. Este compuesto emite fluorescencia verde al irradiarlo con luz azul.

El yoduro de propidio (IP) en cambio, solamente atraviesa la membrana de células muertas o muy dañadas, se intercala en los ácidos nucleicos y se forma así un complejo que emite fluorescencia roja brillante en el núcleo de estas células.

III.8.1.2. Técnica

Se prepararon los reactivos FDA y IP. FDA: Se prepara una solución madre de 2,4 mg/mL de FDA en acetona (conservar 4°C). La concentración de trabajo se obtuvo a partir

de una dilución 1/250 en PBS, de la solución madre de FDA siendo la concentración final 0,46 μM . IP: solución de stock (1 mg/mL en PBS), concentración final de 750 μM .

Las células fueron despegadas de la placa mediante tripsinización (5', 37°C), recogidas con PBS y centrifugadas. El pellet resultante se resuspendió con 465 μL de PBS. Se pasaron a un tubo de medida para citómetro. Posteriormente, en oscuridad, se adicionaron 5 μL de IP y 10 μL de FDA (en ese orden). Rápidamente se cuantifico en un citómetro de flujo el porcentaje de células vivas y muertas.

III.9. Estudio de la actividad celular por citometría de flujo (1, 2, 3 DHR)

El estudio de actividad celular, consistió en medir H_2O_2 intracelular mediante el uso de 1, 2, 3 Dihidrorodamina (DHR), en un citómetro de flujo. Para los ensayos de actividad celular por citometría de flujo, las células fueron sembradas en placas de 12 pozos de 3,5 cm^2 /pozo. Se sembró un total de $1,5 \cdot 10^7$ células/pozo de B16-F10 y $4 \cdot 10^7$ células/pozo de A10. El volumen final fue de 2 mL/pozo, y se incubaron durante 24 horas.

Tras la siembra, se añadió SNP en 10 de los pocillos, a una concentración final de 100 μM y a uno de los pocillos se le añadió el doble de esa concentración, es decir, 200 μM de SNP. Esto se realizó tanto en las placas de B16-F10 como en las de A10. Tras 3 horas de incubación bajo condiciones de esterilidad, se agregó 50 μL de DHR a una concentración de 0,2 mM a dos pocillos, uno con SNP a 200 μM (primer control positivo) y otro con SNP a 400 μM (segundo control positivo). Se incubó el cultivo nuevamente en las mismas condiciones durante 30 minutos y posteriormente se retiraron las células a estos dos pocillos. A los 8 pocillos restantes se les retiró el medio con SNP y se les añadió medio fresco con ácido maslínico hasta concentraciones finales de 10,6; 21,6; 42,3 y 84,6 μM . Este ensayo se realizó por duplicado.

Tras 24 horas de incubación, se agregó a los 8 pocillos 50 μL de DHR a una concentración de 0,2 mM.

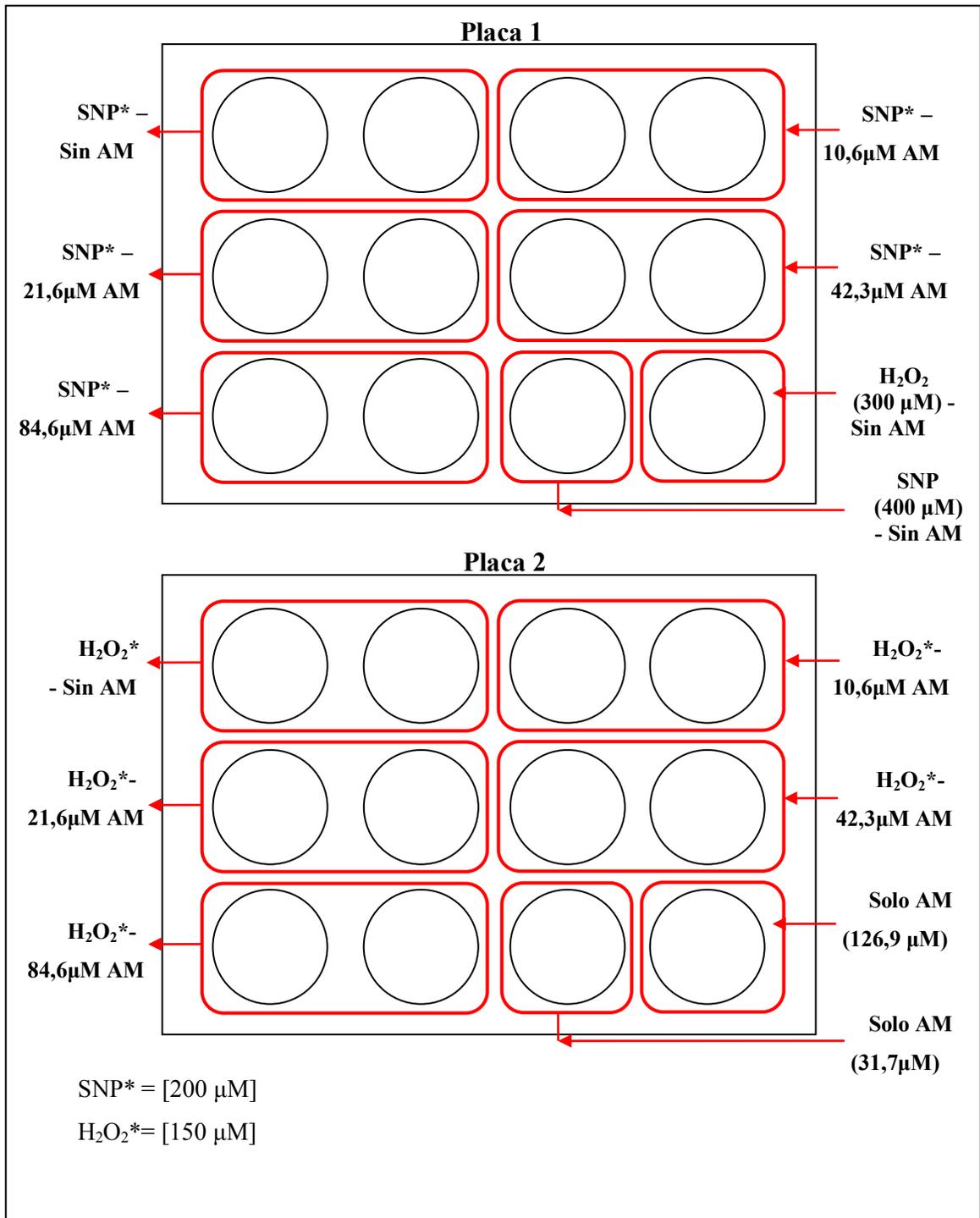


Figura 10. Distribución de tratamientos en placas de 12 pocillos, dos placas por cada línea celular (B16-F10 y A10)

Se incubó el cultivo nuevamente durante 30 minutos y se procedió según protocolo de citometría (Ver figura 10 – Placa 1). Además de SNP, como agente causante de condiciones oxidantes en nuestras líneas celulares, se utilizó H₂O₂. El ensayo fue realizado de igual modo que el anterior, pero cambiando las concentraciones de H₂O₂, ya que este afecta a las células de modo distinto al SNP. A los cultivos de B16-F10 y A10 se les añadió un volumen de H₂O₂ hasta una concentración final de 150 µM en 10 pocillos y 300 µM en uno sólo de los pocillos (ver figura 10 – Placa 1 y 2).

Tras 3 horas de incubación bajo condiciones de esterilidad, se agregó 50 µL de DHR a una concentración de 0,2 mM a dos pocillos con H₂O₂ a 150 µM (primer control positivo) y al pocillo con H₂O₂ a 300 µM (segundo control positivo). Se incubó el cultivo nuevamente en las mismas condiciones durante 30 minutos y posteriormente se retiraron las células a estos cuatro pocillos, para medir DHR en el citómetro. A los 8 pocillos restantes, tras esas 3 h de incubación con el agente estresante, H₂O₂ se les retiró el medio y se les añadió medio fresco, además de AM hasta concentraciones finales de 10,6; 21,6; 42,3 y 84,6 µM.

En los dos pocillos restantes, se realizaron pruebas de actividad por DHR a concentraciones altas de AM, de este modo, se añadió un volumen de AM hasta una concentración final de 31,7 µM y de 126,9 µM respectivamente, siendo los controles negativos (ver figura 10 – Placa 2). Tras 24 horas de incubación, se agregó a los pocillos restantes, 50 µL de DHR a una concentración de 0,2 mM. Se incubó el cultivo nuevamente durante 30 minutos y se retiraron las células de estos pocillos.

El procedimiento de retirar las células, después de la incubación estéril con DHR durante 30 minutos a una atmósfera de 5% de CO₂ y 37°C, consistió en primer lugar, en retirar el medio de los pocillos, realizar un lavado con PBS (500 µL) y tripsinizar con un volumen de 250 µL durante 5 minutos.

En segundo lugar, se recogieron las células tripsinizadas y se colocaron en tubos de citómetro, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos para luego lavar el pellet celular nuevamente con PBS y volver a centrifugar.

Finalmente, se resuspendieron las células en 1 mL de medio DMEN para realizar las medidas de actividad celular por citometría de flujo.

III.10. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

III.10.1. Fundamento

La citometría de flujo es uno de los métodos más específicos en el estudio integrado de los eventos morfológicos y moleculares ocurridos durante la muerte y proliferación celular. En teoría estos métodos muestran de forma simultánea información sobre la morfología, fenotipo, estatus de la cromatina y DNA e incluso la expresión intracelular de proteínas, habiendo sido marcadas previamente con un fluoróforo. Lo que hace posible determinar el mecanismo de muerte celular y la posición del ciclo celular en las que las células se encuentran. Todo ello hace posible determinar la aparición de distintas poblaciones celulares.

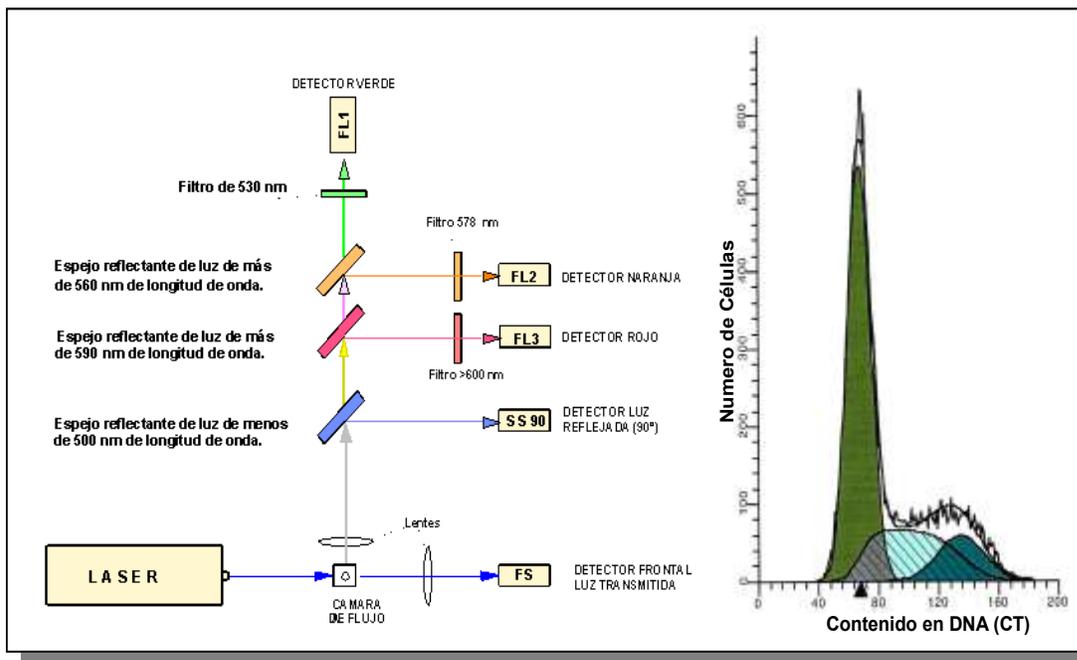


Figura 11 (Derecha) Esquema de detección de las distintas intensidades de fluorescencia por un citómetro tipo FACS, en el que pueden detectarse hasta 5 señales diferentes provenientes de la misma partícula (FS, SS, FL1, FL2, FL3). (Izquierda) Histograma del ciclo celular de una población normal de células.

En el análisis del ciclo celular, la cantidad de yoduro de propidio (IP) incorporado en cada célula es proporcional a su contenido en DNA para cada una de las diferentes fases del ciclo celular. La intensidad debida al IP incorporado puede ser cuantificada por citometría (Figura 11).

Se han desarrollado modelos matemáticos para establecer el porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) a partir de los datos citométricos. La medida del contenido en DNA se ha utilizado también para determinar el grado de haploidía de las células malignas, así como su grado de proliferación según el porcentaje de células que se encuentran en fase S.

En una población de células normales, el porcentaje de células en fase G0/G1 se encuentra cercano al 90%. En el estadio G0/G1 del ciclo celular la carga cromosómica está formada por el número de cromosomas propio de la especie a la que la población celular pertenece, en el resto de fases se está adquiriendo material cromosómico o se ha alcanzado la cantidad doble para entrar en mitosis, estas son las fases S y G2/M.

Por lo que un histograma representativo de una población normal posee un pico alto a un valor de 2C correspondiente a G0/G1, una fase de meseta correspondiente a la fase S, en la que se encuentran sintetizando DNA y un tercer pico G2/M en el que las células se encuentran en el estadio próximo a la mitosis.

Además de la determinación cuantitativa del contenido en DNA, el citómetro de flujo proporciona otras informaciones cualitativas obtenidas por los valores y ángulos de dispersión de la luz desviada por cada célula al pasar por el haz lumínico de rayos láser. Estos son los parámetros FS (forward scatter) y SS (side scatter)

El parámetro FS (forward scatter), que determina la dispersión frontal, es proporcional al tamaño relativo de la célula, así como a la forma o heterogeneidad celular. Se detecta a lo largo del eje del rayo incidente en dirección delantera a ángulos de desviación bajos, que oscilan entre 1° y 10°.

El parámetro SS (side scatter), que determina la dispersión lateral, es proporcional a la granulosis de la célula o complejidad interna, siendo detectado a un ángulo de 90° del eje del haz de luz incidente.

III.10.2. Técnica

El ciclo celular fue analizado por citometría de flujo, utilizando un contador activado por fluorescencia (FACS, fluorescence activated cell sorter). Mediante este análisis podemos determinar el número de células en cada uno de los tres estados del ciclo celular: G0/G1, S y G2/M (Lodish y col., 1995).

Los ensayos se realizaron a tiempos y concentraciones diferentes. Los tiempos estudiados fueron: 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas de incubación y las concentraciones de ácido maslínico correspondieron a la IC₅₀; IC_{50/2}; IC_{50/4} e IC_{50/8}.

El procedimiento consistía en incubar el número de células deseado con medio y FBS durante 24 h, transcurrido ese tiempo se les cambiaba el medio por uno fresco sin FBS para detener o arrear el ciclo celular, y, a partir de ahí, se les iba añadiendo las diferentes dosis de ácido maslínico adecuadas a cada tiempo estudiado.

Tras las distintas incubaciones, las células fueron lavadas con el medio PBS y tripsinizadas siendo recogidas por centrifugación a 500 g. El pellet fue resuspendido en un total de 500 µL de TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM), seguidamente se añadió 25 µL de solución de yoduro de propidio a 1 mg/mL (IP) y se les adicionó 500 µL de solución de Vindelov/ IP (Tris 10 mM, NaCl 10 mM, RNasa 10 µg/mL, IP 50 µg/mL, Igepal 0.01%), siendo la concentración final de IP 100 µg/mL.

Tras incubar las muestras durante 1 h a 4°C, se analizaron por citometría de flujo a 488 nm. El análisis FACS fue realizado en un citómetro de flujo Epics XL (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA).

El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular fue calculado utilizando el programa Multicycle (Phoenix Flow System, San Diego, CA, USA). El ensayo fue realizado tres veces con tres réplicas por experimento.

III.11. Preparación de los extractos citosólicos

Para la obtención de los extractos citosólicos para posteriores determinaciones, se procedió de la siguiente forma: se recogieron las células mediante scrapper en tubos de centrifuga debidamente rotulados.

Posteriormente se realizó una centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante, se realizó un lavado con PBS y se volvió a centrifugar. Finalmente se retiró el sobrenadante y se añadió 0,5 mL de tampón de lisis al pellet y se resuspendió.

Para romper las membranas celulares, se procedió a sonicar la solución celular durante 5 minutos en medio frío (agua y hielo). Después de este tiempo, las soluciones correspondientes a los distintos extractos citosólicos se almacenaron a -80°C . Para su uso, se realizaron diluciones hasta alcanzar las concentraciones de trabajo.

Los tratamientos utilizados para los extractos proteicos se dividieron en partes.

- 1.** Extractos relacionados con el estrés por factores de crecimiento: Se hicieron crecer las células de B16-F10 y A10 en presencia de DMEN suplementado con antibiótico y FBS durante 24 horas, luego se cambió el medio de cultivo en presencia o ausencia de FBS durante 8 horas. Posteriormente se añadió AM con distintas concentraciones según el IC_{50} previamente obtenido, durante 24 horas. Atendiendo a las IC_{50} obtenidas, los tratamientos elegidos para realizar el resto de ensayos experimentales se detallan a continuación.

Las células de B16-F10 crecidas en ausencia de FBS presentaron concentraciones de AM correspondientes a 0, $\text{IC}_{50/2}$, $\text{IC}_{50/4}$, $\text{IC}_{50/8}$ y $\text{IC}_{50/16}$. Las de B16-F10 que crecieron en presencia de FBS presentaron concentraciones de AM de 0, IC_{50} ,

IC_{50/2}, IC_{50/4} y IC_{50/8}. En cuanto a las A10, tratadas durante 8 horas en ausencia de FBS se les agregó concentraciones de AM correspondientes a 0, IC₅₀, IC_{50/2}, IC_{50/4} y IC_{50/8}; por su parte las A10 en presencia de FBS tenían concentraciones en el medio, correspondientes a 0; 106 µM; 216 µM; 423 µM y 634 µM de AM, debido a que el AM no mostró efecto citotóxico sobre estas células y no pudimos conseguir la IC₅₀ correspondiente.

2. Tratamientos relacionados con el estrés por presencia de SNP y H₂O₂: Se hicieron crecer las células de B16-F10 y A10 en presencia de DMEN suplementado con antibiótico correspondiente y FBS durante 24 horas, luego se añadió al medio de cultivo un volumen de SNP en 5 placas de B16-F10 y 5 de A10 hasta alcanzar una concentración de 200 µM y un volumen de H₂O₂ en otras 5 placas de B16F0 y 5 de A10 hasta una concentración de 150 µM, durante 3 horas.

Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se añadió nuevo con presencia de AM a distintas concentraciones, durante 24 horas. Las células de B16-F10 y A10 presentaron concentraciones de AM correspondientes a 0; 10,6 µM; 21,6 µM; 42,3 µM y 84,6 µM durante 24 horas, para tratamientos con SNP y peróxido de hidrógeno. Se usó un control negativo, únicamente con AM.

3. Extractos relacionados con el efecto proliferativo del AM en ausencia o presencia de los factores de crecimiento (FBS). Se hicieron crecer las células de HT29 y HepG2 en presencia de DMEN suplementado con antibiótico y FBS durante 24 horas, luego se cambió el medio de cultivo en presencia o ausencia de FBS durante 24 horas.

Posteriormente, se añadió AM con distintas concentraciones según el IC₅₀ previamente obtenido, durante 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas. Las concentraciones de AM utilizadas fueron las correspondientes a 0, IC₅₀, IC_{50/2}, IC_{50/4}, IC_{50/8}.

III.12. Determinación de la concentración de proteínas por el método de BCA

La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método BCA (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) para placas ELISA de 96 pocillos, a partir de los extractos citosólicos. En primer lugar, se preparó una curva estándar con BSA (Bovine Suerum Albumin) a distintas concentraciones que oscilaban de 0 a 2 mg/mL.

A continuación, se diluyeron las muestras de extractos proteicos en agua destilada, de forma que la concentración de las mismas estuviese dentro del rango de la recta patrón.

Por último, se les añadió la mezcla del reactivo A: 1% de bizinconinato sódico (BCA-Na₂), 2% Na₂CO₃·H₂O, 0.16% tartrato sódico, 0.4% NaOH, 0.95% NaHCO₃, pH 11.25, y del reactivo B: 4% CuSO₄·5H₂O en una proporción 50:1.

Las placas fueron incubadas en agitación constante a 37°C durante 30 minutos. A continuación, se leyó la absorbancia a 562 nm en un lector de placas ELISA (BioTEK).

III.13. Actividades enzimáticas antioxidantes

III.13.1. Actividad superóxido dismutasa (SOD, E.C. 1.15.1.1)

La actividad SOD se determinó por el método de McCord y Fridovich (1969), basado en el cambio de absorbancia a 550 nm, provocado por la inhibición del proceso de reducción del citocromo C en presencia de SOD.

La reducción del citocromo C es producida por acción de radicales superóxido, generados por el sistema enzimático xantina-xantina oxidasa (XOD). Sin embargo, la reacción de reducción del citocromo C se inhibe en presencia de SOD, ya que este enzima retira los radicales superóxido formando peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.

Los reactivos utilizados en este ensayo fueron:

- Tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8.
- Solución de EDTA 0.1 mM.
- Solución extemporánea de xantina 1 mM (disuelta con calentamiento).
- Solución extemporánea de citocromo C 1 mM (protegida de la luz).
- Solución extemporánea de xantina oxidasa comercial (XOD) 1 UI/ml.
- Ditionito sódico (hidrosulfito sódico).

Para realizar el análisis fue necesario preparar un volumen total de 30 mL de “solución de reacción” se que contenía: 26,69 mL de Tampón fosfato potásico (50 mM pH 7.8, EDTA 0.1mM), 2,9 mL de Xantina (1 mM) y 0,406 mL de Citocromo C (1 mM). Esta solución, protegida de la luz y mantenida a 25 °C, es llevada a saturación de oxígeno mediante un aireador, durante 45 minutos, a fin de conseguir la total oxidación del citocromo C. Se realizaron dos tipos de medidas:

Reacción control: A 195 µl de la “solución de reacción” se le añadieron 5 µl de la solución de XOD, la cual inició la reacción de reducción del citocromo C que fue seguida mediante lectura del cambio de absorbancia a 550 nm. Para aceptar los resultados de la reacción control, los valores obtenidos debían encontrarse entre 0.023-0.028 DO/minuto para d = 1 cm (0,014-0,017 para lector de placas con d 0 0,6).

Reacción problema: Se añadieron las siguientes cantidades de reactivos: 150 µl de EDTA, 30 µl de Xantina, 5 µl de Citocromo C y 5 µl de XOD, cuyas concentraciones por pocillo de las microplacas fue de 0.079 mM, 0.090 mM, 0.012 mM y 0.026 UI/mL respectivamente. La adición de la solución de XOD inició la reacción. Se añadieron posteriormente 10 µl de extracto.

La actividad enzimática específica fue expresada en U/mg de proteína. Para el cálculo de dicha actividad se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\Delta\text{DO}/\text{min} (\text{control}) - \Delta\text{DO}/\text{min} (\text{problema})}{\Delta\text{DO}/\text{min} (\text{control})} \cdot 100$$

Las unidades de actividad específica se calcularon de acuerdo con la siguiente expresión:

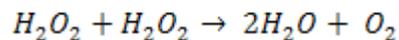
$$U\ SOD/mg\ proteína = \frac{\% \text{ Inhibición}}{50\%} \cdot \frac{f}{V_e \cdot P}$$

Donde:

- DO/min: incremento de densidad óptica por minuto
- f: factor de corrección por dilución del extracto
- V_e : volumen del extracto añadido en mL
- P: mg de proteína por mL

III.13.2. Actividad Catalasa (CAT, E.C. 1.11.1.6)

Para la determinación de la actividad catalasa, se siguió el método descrito por Aebi (1984), basado en la lectura, a 240 nm, del decremento en la absorbancia producido por la disminución de la concentración del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), obteniendo así la actividad catalítica de la enzima. La actividad catalítica se describe en la siguiente fórmula:



Los reactivos utilizados en este ensayo se basaron simplemente en una solución extemporánea de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 10.5 mM en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.0. Esta solución contó con un volumen de 190 μ l por pozo en una placa de 96 pocillos. Fue añadido 10 μ l de extracto por pocillo. Se midió el decremento de densidad óptica (D.O.) a 240 nm, durante 3 minutos, cada 12 segundos, a 25 °C de temperatura.

La actividad específica del enzima catalasa fue expresada en U/mg de proteína. Para el cálculo de dicha actividad se utilizó la siguiente fórmula:

$$U/mg \text{ proteína} = (\mu mol/min)/mg \text{ proteína} = \frac{(\Delta DO/\Delta t) \cdot V_t \cdot f}{\epsilon_{240} \cdot 10^3 \cdot 10^{-6} \cdot V_e \cdot d \cdot P}$$

Donde:

- $\Delta DO/\Delta t$: decremento de densidad óptica/minuto
- V_t : volumen total de reacción en ml
- f: factor de corrección por dilución del extracto
- ϵ_{240} = coeficiente de extinción molar del H_2O_2 ($39.58 M^{-1} \times cm^{-1}$)
- 10^3 : factor de conversión de litro a mililitro
- 10^{-6} : factor de conversión de mol a μmol
- V_e : volumen del extracto añadido en ml
- d: longitud de paso de luz. Para las microplacas el valor es 0.6 cm
- P: mg de proteína por ml.

III.13.3. Glutación peroxidasa (GPX, E.C. 1.11.1.9)

Para determinar la actividad glutation peroxidasa (GPX) se utilizó el método de Flohé y Günzler (1984), basado en una medida indirecta de la actividad mediante la lectura a 340 nm del decremento en la absorbancia producido por la oxidación del NADPH, utilizado para regenerar el glutation reducido (GSH) a partir del glutation oxidado (GSSG) obtenido por la acción de la glutation peroxidasa.

Los reactivos utilizados en este ensayo fueron:

- Tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.1.
- Solución de azida sódica 15.5 mM (inhibe la actividad catalasa).
- Solución de EDTA 3.9 mM.

- Solución extemporánea de glutathion reducido (GSH) 25.8 mM.
- Solución extemporánea de NADPH 1.5 mM.
- Solución extemporánea de glutathion reductasa (GR) 9.7 UI/ml.
- Solución extemporánea de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 1 mM.

Todas las soluciones fueron preparadas diluyendo los reactivos en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.1.

Se realizó un cóctel conteniendo todos los reactivos en la proporción indicada dejando aparte el peróxido de hidrógeno. Por pocillo en placa de 96, se añadió un volumen de las soluciones de: 50 µl de azida sódica, 50 µl de EDTA, 30 µl de GSH, 30 µl de NADPH, 20 µl de GR, 10 µl H₂O₂, con concentraciones de 3.88 mM, 0.97 mM, 3.87 mM, 0.22 mM, 0.97 UI/mL y 0.05 mM, respectivamente. Se añadió finalmente, 10 µl de extracto por pocillo.

La actividad específica del enzima glutathion peroxidasa fue expresada en mU/mg de proteína. Para el cálculo de dicha actividad se utilizó la fórmula descrita para la catalasa pero con el coeficiente de extinción molar para el NADPH a 340 nm $\epsilon_{340} = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

III.13.4 Glutathion reductasa (GR, E.C. 1.6.4.2)

La actividad glutathion reductasa (GR) fue determinada por el método modificado de Carlberg y Mannervik (1975). Para ello, se realizó una lectura a 340 nm del decremento en la absorbancia producido por la oxidación del NADPH utilizado por la GR, en el paso de glutathion oxidado (GSSG) a glutathion reducido (GSH). Los reactivos utilizados en este ensayo son:

- Tampón fosfato sódico 0.1 M pH 7.5, EDTA 1
- Solución extemporánea de NADPH 0.7 mM (en Tampón fosfato sódico 0.1 M pH 7.5, EDTA 1 mM)
- Solución extemporánea de glutathion oxidado (GSSG) 3.25 mM (Tampón fosfato sódico 0.1 M pH 7.5, EDTA 1 mM).

Se añadió por pocillo en placas de 96, 180 μl de NADPH y 10 μl de GSSG. Posteriormente, se añadió 10 μl de extracto y se procedió a la lectura.

La actividad específica del enzima glutation reductasa fue expresada en mU/mg de proteína. Para el cálculo de dicha actividad se utilizó la fórmula descrita para la catalasa pero con el coeficiente de extinción molar para el NADPH a 340 nm $\epsilon_{340} = 6.22 \times 10^3 \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

III.13.5. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49)

La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) cataliza una reacción de oxido-reducción con la consecuente formación de equivalentes de reducción en forma de NADPH, los cuales pueden ser determinados midiendo la absorbancia a 340 nm.

Para su determinación se siguió una modificación del método descrito inicialmente por Lupiáñez, basado en la variación de la D.O. asociada a la aparición de NADPH, como consecuencia de la actividad de este enzima (Lupiáñez y col., 1987; Peragón y col., 1989).

Cabe destacar que la medida corresponde a la suma de las actividades G6PDH y 6PGDH (para discriminar entrambas, tendríamos que haber usado 6PG). La concentración de sustrato fue 5 mM. El ensayo siguió el orden establecido en la tabla 2.

Tabla 1. Volumen de reactivos para el ensayo de Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

Reactivos	Concentración en pocillo (mM)	Volumen de reactivo (μL)
T. Hepes 58,8 mM pH 7,6	50	110
Mg Cl ₂ 20 mM	2	20
NADP ⁺ 8 mM	0,8	20
H ₂ O destilada	-	10
Extracto	-	20
Sustrato (G6P)	Variable	20

La actividad específica se expresa en miliunidades (mU) de enzima por mg de proteína (mU/mg), o bien, en nmoles de sustrato transformado por minuto y por mg de proteína, y viene dada por la siguiente expresión:

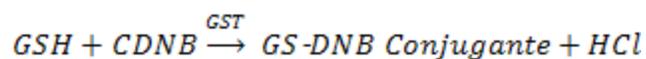
$$AE(mU/mg) = \frac{\Delta DO/min \times Vt \times 10^9}{\epsilon \times d \times v \times P}$$

Donde:

- **$\Delta DO/min$** : incremento o disminución de densidad óptica por minuto.
- **Vt** : volumen total de cubeta (0,2 mL)
- **ϵ** : coeficiente de extinción molar. El coeficiente es distinto según la enzima, así para: G6PDH $\rightarrow \epsilon$ (NADPH: $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$)
- **d** : espesor de disolución que tiene que atravesar la luz. Para microplacas de 96 pocillos: 0,6 cm.
- **v** : volumen de extracto en mL
- **P** : concentración de proteínas del extracto (mg/mL)
- **10^9** : factor de conversión de mol a nanomoles

III.13.6. Glutación S-Transferasa (GST, EC 2.5.1.18)

El estudio se basa en la reacción descrita a continuación:



Para realizar el análisis enzimático de la enzima GST, el medio de reacción debía contener los sustratos de esta enzima (reacción bisustrato) que son el glutatión reducido (GSH) y el 1-cloro-2,4-dinitrobeneno (CDNB).

A este medio se le añadía la muestra que contenía la enzima GST, catalizando de esta manera la reacción entre ambos sustratos y además formando gradualmente el producto de la reacción (GS-DNB) en función del tiempo.

Este producto fue medido a una longitud de onda (λ) de 340 nm, mediante un espectrofotómetro. El ensayo fue realizado con los volúmenes descritos en la tabla 3.

Tabla 2. Volumen de reactivos para el ensayo de Glutación S-Transferasa

Cubeta	Volumenn
Tampón de ensayo 0.2 M (μ l)	500
H ₂ O (μ L)	380
Muestra diluida (μ L)	20
GSH 20 mM (μ L)	50
CDNB 2 mM (μ L)	50

Una vez con el espectrofotómetro preparado (longitud de onda seleccionada = 340 nm) añada el CDNB a la primera cubeta, tape la boca de la cubeta con Parafilm y mezcle por inversión. Rápidamente introduzca la cubeta en el portacubetas del espectrofotómetro, ajuste el autocero e inmediatamente empiece a tomar lecturas de absorbancia cada 15 segundos hasta un total de 120 segundos, para poder calcular el incremento de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$).

III.14. Determinación de los niveles de expresión de proteínas por “Western blotting”

Se determinaron los niveles de expresión de las proteínas catalasa, G6PDH, SOD, CAT y GST, relacionadas con el estrés celular, moesina, β -actina, y villina 1 relacionadas con el citoesqueleto, y la expresión de las proteínas p-Akt, p-I κ B- α , relacionadas con la proliferación celular. Todas ellas se realizaron mediante ensayos de “Western blotting” utilizando anticuerpos específicos frente a cada una de esas proteínas.

La técnica de “Western blotting” consiste en la detección de la proteína de interés del total de proteínas del tejido en cuestión. Su procedimiento se encuentra resumido en la figura 12.

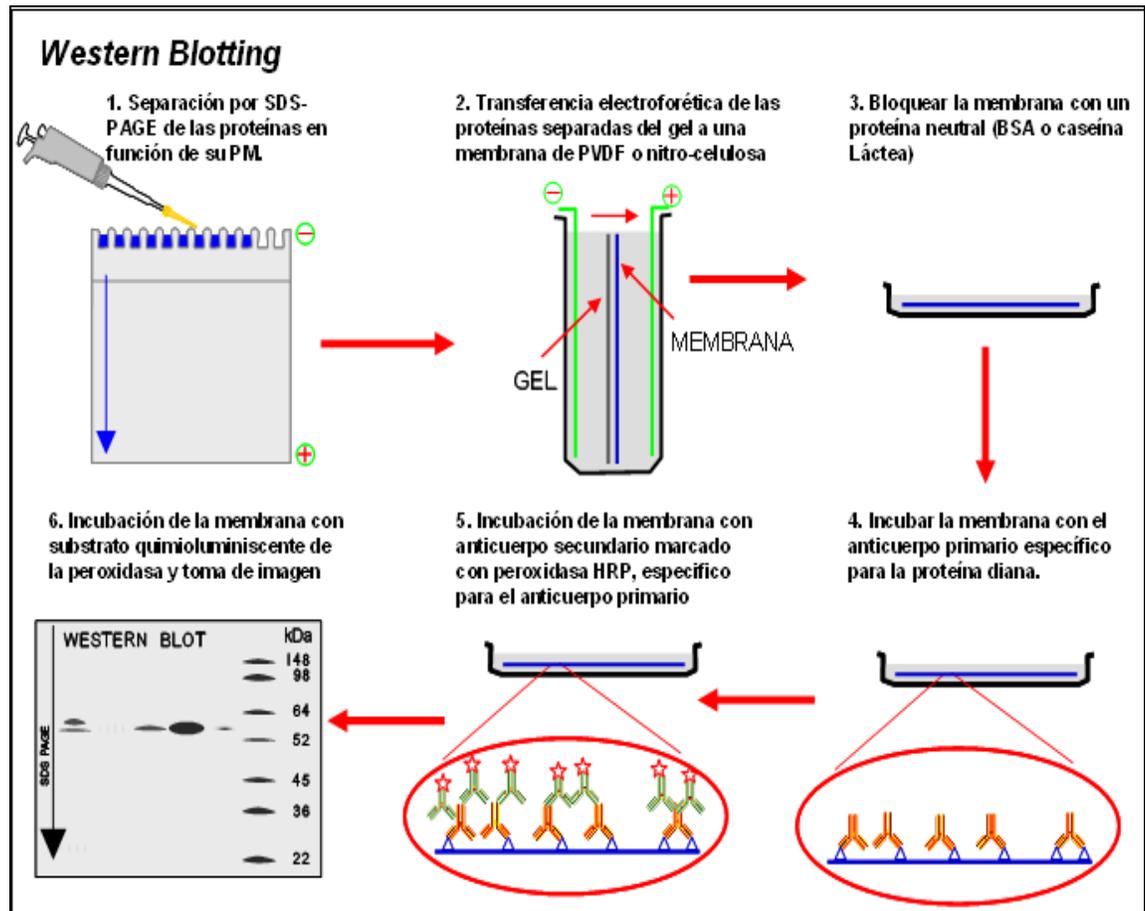


Figura 12. Procedimiento completo de la técnica “Western blot”, en el que se hace hincapié en los pasos determinantes del proceso: transferencia, bloqueo, hibridación con los anticuerpos primario secundario y revelado

Posteriormente las proteínas se transfieren a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno) desde el gel. De allí se inicia la detección inmunológica de la proteína específica mediante la incubación con anticuerpos específicos y se revela por autorradiografía

III.14.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

Con los extractos proteicos celulares, obtenidos con anterioridad, se realizó una electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Los reactivos utilizados en los ensayos de electroforesis fueron:

- Acrilamida: 40%
- TEMED: 100%
- Persulfato amónico (APS) en agua ultrapura al 10% (p/v): 0,1g/mL
- Tampón del gel concentrador (1X): Tris-HCl 0,25M/ pH 6,8 y SDS 0,2%
- Tampón del gel separador (1X): Tris-HCl 0,75M/ pH 8,8 y SDS 0,3%
- Tampón de electroforesis (10X): Gly 129M/ Tris 0,25M/ SDS 1%
- Tampón de carga 5X: 3,3mL tampón del gel concentrador/ 1g SDS/ 77,1mg DTT 1M/ 5mL glicerol 100% y 1,7mL agua miliQ.
- Solución de tinción: 0,5 g Azul Comassie G-250, 100 mL ácido acético glacial, 212 mL isopropanol 95% y 688 mL agua destilada.
- Solución de decoloración: 450 mL metanol, 100 mL ácido acético glacial y 450 mL agua destilada.

Los geles fueron preparados para electroforesis vertical de tipo discontinuo en un sistema de montaje del tipo Mini-Protean Tetra cell (Bio-Rad). Primero se preparaba el gel inferior de 1,5 mm de grosor añadiendo los volúmenes apropiados de reactivos, en el mismo orden y tal como se recoge en la tabla 4.

Tabla 3. Protocolo para la preparación de geles para la SDS-PAGE

	Gel Concentrador (4%)	Gel Separador (10 %)	Gel Separador (12 %)
H₂O miliQ	1,950 mL	7,35 mL	6,6 mL
Tampón gel separador	---	3,75 mL	3,75 mL
Tampón gel concentrador	2,5 mL	--	--
Acrilamida 40%	0,5 mL	3,75 mL	4,5 mL
Persulfato amónico (APS)	40 µL	120 µL	120 µL
TEMED	10 µL	30 µL	30 µL

En primer lugar, se añade agua miliQ, el tampón correspondiente al gel y la acrilamida, posteriormente el TEMED y el APS, acto seguido, se agitaba la mezcla rápidamente y se vertía por el espacio que queda entre los dos cristales. Se dejaba polimerizar, poniéndole un frente de aproximadamente 0,5 mL de isopropanol para evitar deformaciones, y concluida la polimerización del gel separador, se retiraba el isopropanol y se añadía el gel concentrador al 4% (siguiendo el mismo protocolo de actuación que para el gel separador), colocando a su vez un peine de plástico, para formar los pocillos donde se añadiría la muestra. Una vez polimerizado, se retira el peine con cuidado y se lavaban los pocillos.

Las muestras correspondientes se mezclaban con tampón de carga (5X) y se sometían al baño maría a 95°C durante 5 minutos. Después se conservaban a 4°C hasta su carga.

Se calculaba el volumen de muestra a cargar en cada pocillo con el fin de que en todas las muestras cargadas en un mismo ensayo hubiese la misma cantidad de proteína.

Una vez cargadas las muestras en los pocillos, se vierte tampón de electroforesis dentro de la cubeta de electroforesis y se conecta la cubeta a la fuente de alimentación. La electroforesis se desarrolla a voltaje constante empezando con 100 V hasta que el frente de electroforesis penetra totalmente en el gel inferior subiendo a 200 V hasta el final de la electroforesis. Cuando el frente del colorante llegaba aproximadamente a 1 cm del final del gel, se detenía la electroforesis. Todo el proceso se desarrollaba a temperatura ambiente.

III.14.2. Transferencia

Una vez completada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno o PVDF a la cual se quedaban unidas. De esta manera se inmovilizaban las proteínas y se facilitaba la accesibilidad a dichas proteínas por parte de

los anticuerpos. Previo a esto, se realizaba la activación de la membrana, utilizando para ello, metanol y agua.

La transferencia de las proteínas del gel a la membrana se llevaba a cabo mediante dos técnicas de electrotransferencia: la semiseca, con un equipo de Bio-Rad y la húmeda. En el sistema de electrotransferencia semiseca, se utilizaron equipos “semi-dry Trans blot SD” de Bio-Rad para las proteínas GST y SOD, y el sistema de electrotransferencia húmeda utilizó los equipos Mini Protean tetra cell system (Bio Rad) para las proteínas G6PDH y catalasa.

Los reactivos usados en este ensayo fueron:

- Tampón de transferencia (1X): Tris 25 mM/ Gly 192 mM y 20% (v/v) metanol.
- Papel absorbente o de filtro “Whatman 3MM” o equivalente
- Membrana de PVDF (“Hybond” de Amershan-Pharmacia).
- Metanol 100%.

En primer lugar se equilibraba el gel con el tampón de transferencia durante 5 min, separando el gel concentrador del gel separador. Las membranas, antes de ser utilizadas, se activaron en metanol 100% durante 15 segundos y posteriormente se sumergieron en agua miliQ durante 2 minutos; finalmente, se colocan en tampón de transferencia, hasta su transferencia en el equipo.

Para montar la transferencia semiseca se colocaba sobre la placa del equipo de transferencia (ánodo), el “sandwich” compuesto por papel Whatman, membrana, gel y papel Whatman, en ese orden. Se conectaba la fuente a la corriente y se llevaba a cabo la transferencia a 60 mA por membrana (8,5x6 cm), durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se desconectaba la fuente de alimentación y se desensambla el montaje cuidadosamente. Se marcaba la orientación de la membrana en el mismo sentido en que estaba marcado el gel.

Por otra parte la transferencia húmeda se llevaba a cabo mediante el ensamblaje de un sándwich, donde la transferencia de las proteínas del gel a la membrana ocurría por la acción de la corriente eléctrica que atravesaba de polo negativo a polo positivo en orden, la almohadilla de soporte (1), el papel Whatman (1), gel, membrana de PVDF, papel Whatman (2) y la almohadilla de soporte (2). Este sándwich se coloca inmerso en tampón de transferencia en un recipiente mantenido a 4°C, a 100 mA, durante 1 hora. Posteriormente, se retiraba la membrana procediendo de forma similar a la transferencia semiseca.

Para comprobar que la transferencia ocurría con éxito, se teñían las membranas con Rojo Ponceau (Sigma Aldrich, St Louis, MO (USA)). Para ello se activaban las membranas en metanol 100% durante 15 segundos y luego en agua miliQ durante 2 minutos, y de allí se teñían con rojo hasta observar las calles de las proteínas.

III.14.3. Inmunoblotting

Las proteínas específicas se detectaron por incubación con anticuerpos que reaccionan específicamente con la proteína-antígeno inmovilizada en la membrana. Esta detección inmunológica se llevó a cabo en varias etapas.

En primer lugar, se utilizó un anticuerpo específico de la proteína a detectar o anticuerpo primario, posteriormente un anticuerpo secundario conjugado que reconoce al anticuerpo primario y además está unido a peroxidasa.

La peroxidasa hace posible la detección y localización del complejo antígeno-anticuerpo por autorradiografía después de la incubación con un sustrato (“Lumigen PS-3”) que al ser transformado por la enzima, genera un compuesto quimioluminiscente. Los reactivos utilizados en este ensayo fueron:

- Tampón de lavado TBS (1X): 132 mM NaCl, 20 mM Tris a pH 7,5.
- Tampón de lavado TBS-T (1X): TBS con 0,1% (v/v) Tween-20.

- Solución de bloqueo: TBS-T y 5% (p/v) leche desnatada en polvo (La Asturiana).

Después de la transferencia, se procedía al bloqueo de las membranas. Se añadía un volumen de solución de bloqueo que recubría la membrana y se mantenía en agitación suave a temperatura ambiente durante 4 horas.

A continuación se eliminaba la solución de bloqueo y se realizaban tres lavados de las membranas con TBS 1X durante 10 min. Después de eliminar el tampón de lavado se incubaban las membranas con la solución de anticuerpo primario, durante toda la noche en la cámara fría (4°C). La concentración de anticuerpo primario correspondió a 1:1000 y 5% leche en TBS-T (0,1%) para todas las proteínas ensayadas, excepto para G6PDH que fue 1:5000.

Acabada la incubación, se recuperaba el anticuerpo primario y se lavaban las membranas 3 veces con TBS-T (0,1%) durante 5 minutos. La agitación era vigorosa y a temperatura ambiente. Se eliminaba el tampón de lavado y se añadía la solución de anticuerpo secundario con diluciones 1:10000 y 3% leche en TBS-T (0,1 %) en todos los casos.

La incubación se realizaba en agitación suave y a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, se eliminaba el anticuerpo secundario y se hacían 3 lavados en TBS-T (0,1%) de 5 minutos cada uno de ellos. Luego se procedía al revelado de las membranas.

III.14.4. Revelado

El anticuerpo secundario estaba unido a peroxidasa. La peroxidasa cataliza la oxidación del luminol que pasa a un estado excitado, el cual emite energía luminosa cuando vuelve a su estado inicial. Esta puede ser captada por autorradiografía, en una película fotográfica. La disolución para la detección de quimioluminiscencia es preparada a partir de 3 mL de

Luminol, 30 μL de Cumárico y 0,9 μL de peróxido de hidrógeno, en un envase frío y protegido de la luz. Esta cantidad era suficiente para dos membranas.

Disolución de fijación: Fijador marca ILFORD, en proporción $\frac{1}{4}$ (v/v) en agua destilada. El revelador y el fijador deben mantenerse en oscuridad, si están diluidos.

Las membranas se escurrían y se disponían sobre una superficie limpia y plana. Sobre ellas se aplicaba la mezcla de detección, preparada previamente, que las recubría por completo y se mantenía 5 minutos. Se eliminaba el exceso de solución de revelado y se pasaban a un “cassette” de autorradiografía, entre un plástico transparente.

Sobre las membranas se colocaba una película sensible y se mantenían en contacto un tiempo de exposición variable (entre 5 y 15 minutos) dependiendo de la intensidad luminosa. Para el revelado de la película se sumerge ésta en el revelador de películas autorradiográficas de ILFORD en proporción (1/9) (v/v) en agua destilada, hasta que aparezcan las bandas. Se pasa la película al fijador marca ILFORD, en proporción $\frac{1}{4}$ (v/v) en agua destilada, y, por último, se lava con agua miliQ y se deja secar.

Las imágenes se escanearon y fueron analizadas y cuantificadas utilizando el programa Multi Gauge (Fuji Film Europe, TK Tilburg, Holanda). Todos los westerns fueron cuantificados mediante el procedimiento “Profile” del programa, restando el fondo de la película. El estudio de activación o inducción de las distintas proteínas se realizó refiriendo las intensidades normalizadas de cada una de las muestras. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de densidad óptica (U.A.).

III.15. Expresión proteómica HT29

El procedimiento seguido en este trabajo para el análisis del *patrón de expresión de proteínas de HT29* se puede dividir en cinco etapas:

- 1) Preparación de las muestras.
- 2) Separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional (2-DE).

- 3) Tinción de los geles, análisis de las imágenes y elección de los las proteínas de interés.
- 4) Digestión con tripsina de las proteínas seleccionadas y determinación de la masa molecular o secuencia parcial de espectrometría de masas (MS).
- 5) Identificación de las proteínas analizadas e interpretación de los resultados.

La secuencia de acciones se resume en la Figura 13.

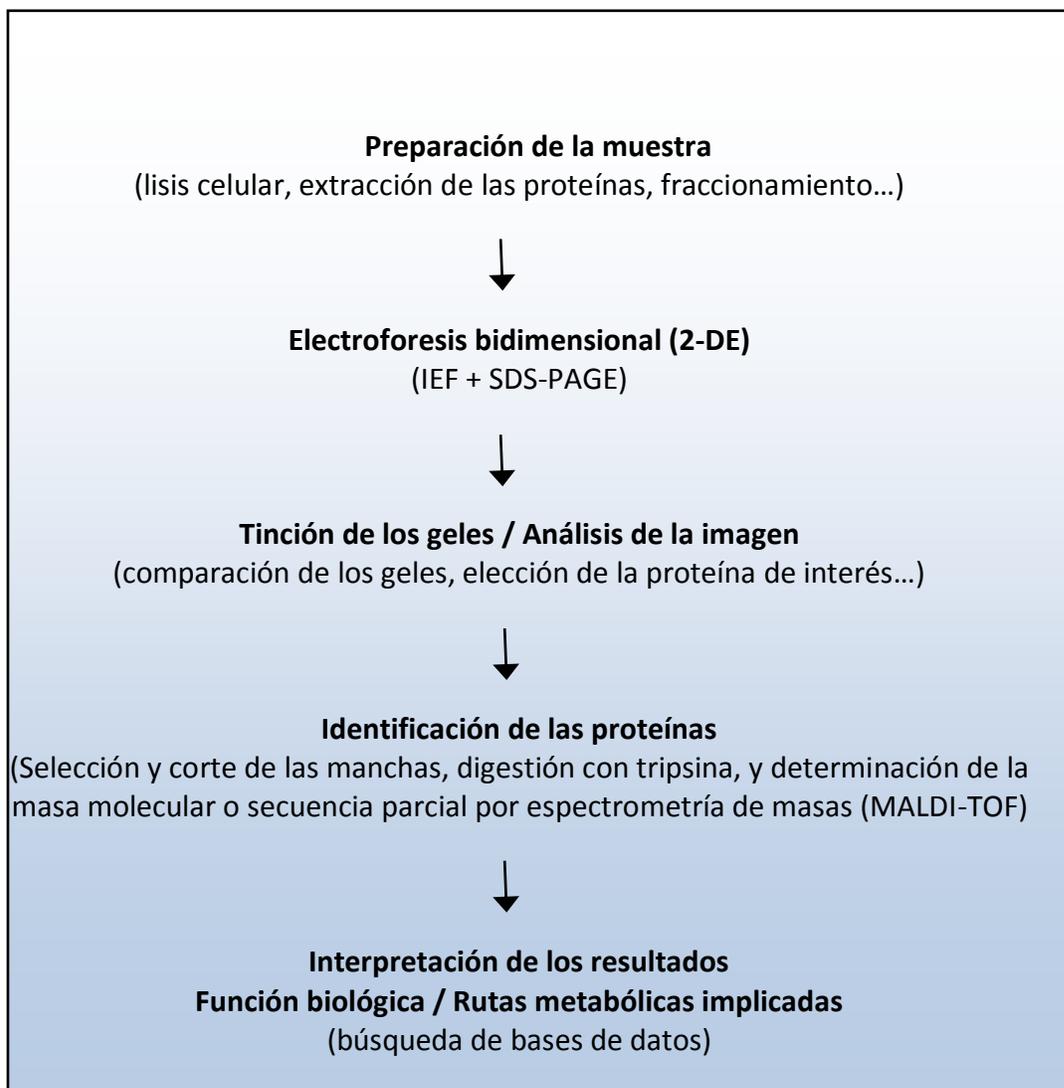


Figura 13: Esquema del procedimiento experimental seguido en el estudio de proteómica realizado basado en 2-DE y HPLC-MS.

III.15. 1. Preparación de la muestra

III.15.1.1. Fundamento

La preparación de la muestra es el paso más importante para la obtención de geles bidimensionales donde es posible identificar un elevado número de proteínas de forma individualizada. La finalidad de la optimización de los protocolos de extracción de proteínas es visualizar el mayor número de proteínas posible, para lo cual es necesario separar físicamente cada una de las proteínas que forman parte de los complejos y agregados presentes en las células.

Durante el proceso de preparación de las muestras es importante eliminar el mayor número posible de compuestos que puedan provocar algún tipo de interferencia o fenómeno indeseado, como sales, polisacáridos, fenoles (Rabilloud et al., 1997).

III.15.1.2. Reactivos

- Tampón de extracción de las proteínas, pH 8:
- Urea 8 M
- DTT 20 mM
- Tris-HCl 100 mM
- SDS 1%(p/v)
- PMSF 0,75 mM en isopropanol
- 2-D Clean-up Kit de GE Healthcare, ref.: 80-6484-51
- Sistema para la determinación de la concentración de proteínas: CB-X Assay de GBiosciences.

III.15.1.3. Técnica

Para el estudio de proteómica se *pellet de células HT29* congelado a -80°C . El tampón de extracción de la proteína consistía en urea 8 M, DTT 20 mM, Tris-HCl 100 mM, SDS 1% y

PMSF 0,75 mM disuelto en isopropanol, pH 8. La cantidad exacta de tampón *fue de 0,5 mL* de tampón de extracción de proteína. Se utilizaron 3 réplicas por tratamiento experimental. Las muestras disueltas en el tampón se mantuvieron 1 hora a Tª ambiente y en agitación moderada a intervalos de 15 minutos.

Posteriormente, se centrifugaron a 10000g, a 4°C, 15 minutos. El precipitado se desechó, y con el sobrenadante se prepararon alícuotas de 200 µL. Con una de las alícuotas se determinó la concentración de proteínas mediante el sistema CB-X de GBiosciences (Ref. 786-12XT).

Para la realización de los estudios de proteómica se contó con la asistencia técnica de la Unidad de Proteómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba que es miembro del “ProteoRed network” Instituto Nacional de Proteómica.

III.15.2. Electroforesis bidimensional (2-DE)

III.15.2.1. Fundamento

La electroforesis bidimensional es una técnica de alta resolución, capaz de resolver mezclas complejas de proteínas en un único evento experimental. Se trata de la técnica más eficiente para conseguir la separación e individualización de proteínas pudiendo separar incluso miles de proteínas en un único gel bidimensional.

Esta técnica consiste en la aplicación sucesiva de dos técnicas de separación, un isoelectroenfoque (primera dimensión) y un SDS-PAGE (segunda dimensión). En la primera, las proteínas se separan de acuerdo con su punto isoeléctrico (pI), y en la segunda, según su masa molecular.

El desarrollo de gradientes inmovilizados y preestablecidos de pH (“IPG Immobilized pH gradient strips”) ha contribuido sustancialmente a la gran acogida de esta técnica (Görg et al., 1988a y b). Estos gradientes de pH inmovilizados han dado lugar a una gran

reproducibilidad entre experimentos, permitiendo una mejor comparación entre los resultados obtenidos.

En la actualidad es posible disponer de un amplio margen de gradientes de pH con extremos comprendidos entre pH 3,0 a pH 12,0. Esto permite al investigador incrementar mucho la capacidad de resolver el elevado número de proteínas presente en una determinada muestra.

La aplicación de la técnica de electroforesis bidimensional en este trabajo ha permitido identificar un número elevado de proteínas reguladoras y estructurales involucradas en el citoesqueleto de estas células

III.15.2.2. Reactivos

- Tiras de isoelectroenfoque, Immobiline DryStrip Gels pH 3-10, 18 cm, GE Healthcare (Ref: 17-6002-44)
- Tampón de rehidratación:
 - Urea 8M
 - CHAPS 4% (p/v)
 - Azul de bromofenol (trazas)
 - Aceite mineral
- Acrilamida
- TEMED
- Persulfato amónico (PSAM)
- Tampón de equilibrado: Tris-HCl 375 mM, pH 8,8; urea 6 M; glicerol 20% (v/v); SDS 2% (v/v), hasta 250 mL.
- Tampón de electroforesis:
 - Tris 25mM
 - Glicina 192 mM
 - SDS 0,1% (p/v)
- Agarosa de sellado 0,5% (p/v) en tampón de electroforesis

III.15.2.3.Técnica

Para el desarrollo de la electroforesis bidimensional (2-DE) se empleó el sistema Protean IEF System (BioRad Laboratories) y el sistema de Electroforesis-2D Plus Dodeca Cell Protean[®] (BioRad Laboratories).

Para la primera dimensión, las muestras se colocan en contacto con tiras de isoelectroenfoque (IPG, strip) de 18 cm de longitud, con gradiente lineal inmovilizado de pH 3-10. Para mejorar la separación de las proteínas de la zona básica, el IEF se realizó por cup-loading. Esta técnica consiste en la aplicación de la muestra directamente sobre el extremo básico de la tira previamente hidratada.

Las tiras fueron hidratadas en tampón de rehidratación durante un periodo de 12-18 horas a 20°C. Posteriormente, se aplicaba el extracto proteico en la zona básica de la tira IEF y se recubría la tira con aceite mineral para evitar la evaporación y precipitación de la urea. El isoelectroenfoque se realizó a 20°C aplicando una corriente de 50 μ A/gel y según la rampa de voltajes descrita en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Programa de isoelectroenfoque de extractos de proteína total

Paso	Voltaje /V)	Tipo gradiente	Duración (h:min)	Voltios-hora (Vh)
1	50	Rampa rápida	6:00	--
2	500	Rampa lineal	1:30	--
3	1000	Rampa lineal	1:30	--
4	2000	Rampa lineal	1:30	--
5	4000	Rampa lineal	1:30	--
6	8000	Rampa lineal	2:00	--
7	8000	Rampa rápida	--	60000

Los geles de acrilamida empleados para la segunda dimensión se realizaron a una concentración de acrilamida del 11% (p/v). A esta solución de acrilamida se le añadió los catalizadores TEMED y persulfato amónico para iniciar la polimerización de la acrilamida.

A continuación, la mezcla de poliacrilamida se vertió en el recipiente de polimerización, donde previamente se habían colocado los cassettes de vidrio de un tamaño aproximado de 180x245x1 mm, en el interior de los cuales se forman los geles. Para mantener el gel humedecido y obtener un frente recto se añadió 2 mL de agua miliQ durante 1 h, tiempo aproximado de polimerización de los geles en cámara fría.

Para una buena separación de las proteínas según su peso molecular es necesario tratar a las proteínas isoelectroenfocadas con agentes desnaturalizantes, como el SDS, que al mismo tiempo que desnaturaliza y despliega las proteínas, se une a ellas de forma proporcional a su peso molecular dotándolas de carga negativa, con agentes reductores como el DTT que se encarga de reducir los puentes disulfuro y con agentes alquilantes como la iodoacetamida (IAA) que alquilará los grupos SH reducidos anteriormente y evitará su posterior oxidación.

Estos tratamientos constituyen la fase de equilibrado de las muestras (Thongboonkerd y Klein, 2004). De este modo, las tiras de IEF se pusieron en contacto con 5 mL de tampón de equilibrado conteniendo 2 g/100 mL de DTT durante 20 minutos en agitación y a continuación se equilibraron durante 20 minutos en agitación con 5 mL del mismo tampón de equilibrado, pero sustituyendo el DTT, por 2,5 g/100 mL de IAA.

Finalizada la polimerización de los geles y equilibrado de las tiras de IEF; hay que depositar las tiras de IEF equilibradas sobre la superficie de los geles de acrilamida. A continuación, en el extremo básico de la tira se colocó un aplicador impregnado con 5 μ L de marcadores de peso molecular que se usó como referencia para determinar la velocidad electroforética de las proteínas en el gel, y el conjunto se selló con agarosa al 0,5%.

Posteriormente, se colocaron los geles en la cubeta de electroforesis, se añadió el tampón de electroforesis. La separación electroforética se realizó en una etapa de 30 min. a 2,5 W/gel seguida de otra etapa de 5 horas a 12-17 W/gel, aproximadamente.

III.15.2.4. Análisis de la imagen

III.15.2.4.1. Fundamento

Tras la separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional, es necesario aplicar un método de tinción que sea capaz de revelar la presencia y posición de las diferentes especies proteicas en el gel de acrilamida.

Los geles bidimensionales, que contienen proteínas teñidas con alguno de los protocolos mencionados anteriormente, deben ser escaneados con la finalidad de obtener una imagen digital de los mismos. La obtención de esta imagen digital permite llevar a cabo una serie de análisis como son la detección de puntos (especies proteicas), eliminación del ruido de fondo, creación de geles promediados, estimación del punto isoeléctrico y peso molecular de cada uno de los puntos presentes, determinación de la intensidad de los puntos, cuantificación y comparación del patrón de manchas generado por diferentes geles.

Los resultados obtenidos con este tipo de análisis de las imágenes permiten la comparación cualitativa de los perfiles de expresión de proteínas e identificar los cambios en la expresión de proteínas como consecuencia de un tratamiento o condición experimental.

Después del análisis de las imágenes escaneadas de geles teñidos y de los puntos presentes en el gel es necesario recuperar los puntos (proteínas) de interés recortándolos de cada uno de los geles bidimensionales elaborados con ayuda de un bisturí para su procesamiento posterior.

III.15.2.4.2. Técnica

Una vez acabado todo el proceso de electroforesis, se procedía a la tinción de los geles con SYPRO Ruby (BioRad Laboratories, Ref. 170-3125). El SYPRO Ruby es un

fluorocromo que permite la detección de proteínas por fluorescencia. Es una técnica compatible con la espectrometría de masas y el revelado posterior con anticuerpos.

Los geles se depositan en cubetas de tamaño apropiado y se cubren durante 30 minutos con una disolución de fijación que contiene metanol 10% (v/v) y ácido acético 7% (v/v). A continuación los geles se incuban durante 3 horas con agitación en la disolución comercial de SYPRO Ruby.

Los recipientes de incubación se cubren completamente con papel de aluminio para evitar el contacto con la luz durante todo el proceso. Posteriormente los geles se aclaran con metanol al 10% (v/v)- ácido acético 7% (v/v) durante 60 min. Finalmente se lavan con agua antes de su visualización en el Sistema Fluor-S MAX2 Multimager de BioRad.

Las imágenes de alta resolución generadas se almacenaron en formato tiff. Para asegurar la reproducibilidad de la técnica y un análisis de resultados apropiado se realizaron 3 geles por tratamiento. Las imágenes se normalizaron respecto a todas las proteínas (spots) detectadas en todos los geles analizados. Para el análisis de las proteínas se utilizó el programa informático PDQuest (v7.1, Bio-Rad). Inicialmente, las proteínas que se detectan corresponden a una “sobre-expresión” de al menos 3 veces con respecto a cualquier otro punto de muestreo considerado.

III.15.2.5. Identificación de las proteínas analizadas

III.15.2.5.1. Fundamento

Las recientes mejoras introducidas en las técnicas de espectrometría de masas y el desarrollo de herramientas bioinformáticas permiten la identificación satisfactoria de un gran número de proteínas presentes en los tejidos incluso a bajas concentraciones (femtomolar) basándose en la información en forma de espectros masas de péptidos (peptide mass fingerprint-PMF-) obtenidos por digestión triptica de las proteínas recuperadas de geles de acrilamida (Shevchenko et al., 1996a; Shevchenko et al., 1996b).

En la actualidad existen dos técnicas de espectrometría de masas ampliamente utilizadas para el análisis de las proteínas en los geles bidimensionales. La primera es la espectrometría de masas mediante MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) y análisis de huellas peptídicas (PMF). La segunda técnica es la espectrometría de masas en tándem alimentada por un cromatógrafo de líquidos (LC/MS-MS). La ionización se realiza a presión atmosférica (API) mediante la generación de un electrospray (ESI).

El espectrómetro puede trabajar en modo masas-masas para fragmentar los péptidos ionizados previamente generados mediante digestión con tripsina en gel. Esta segunda fragmentación de péptidos parentales (secuenciación de novo) permite que las identificaciones de las proteínas de interés se realice en base a secuencias, que son más específicas que las huellas peptídicas (Taylor y Johnson, 1997; Taylor y Johnson, 2001). En este estudio se ha realizado la identificación de proteínas por huella peptídica utilizando un analizador de masas por MALDI/TOF-TOF.

La identificación de proteínas mediante la utilización de la técnica de MALDI-TOF y análisis del mapa peptídico resultante (peptide mass fingerprinting-PMF-) se ha convertido en una herramienta de trabajo fundamental y ampliamente aceptada en los estudios de identificación de proteínas y como complemento a la separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional (Wilm et al., 1996). Las proteínas recuperadas de geles de acrilamida son digeridas mediante el empleo de proteasas, generalmente tripsina, que actúan sobre sitios de corte específicos.

A continuación, se determina mediante espectrometría de masas, las masas de los fragmentos (péptidos) generados en la digestión con tripsina. Posteriormente, mediante la utilización de herramientas informáticas que son capaces de comparar los listados de masas generados de forma experimental con las masas teóricas resultantes de digerir con tripsina las secuencias disponibles en bases de datos se logra identificar la proteína de interés.

Las bases de datos pueden ser secuencias de aminoácidos o bien las secuencias de nucleótidos que codifican para cada una de las proteína). Se trata de una técnica que cuenta con una doble ventaja, su elevada sensibilidad y su elevado rendimiento para procesar un gran número de muestras en un breve espacio de tiempo.

Los componentes básicos del MALDI-TOF son cuatro: una fuente de iones que ioniza las muestras mediante la incidencia de un láser de nitrógeno con una longitud de onda de 337 nanómetros y genera iones en fase gaseosa en una cámara a vacío (MALDI), un analizador que separa los iones atendiendo a su ratio masa/carga (m/z) (TOF), un detector encargado de detectar los iones y un sistema de datos que se encarga de convertir la señal recibida por el detector en una gráfica en la pantalla.

La determinación de los ratios masa/carga de los péptidos generados como consecuencia de la digestión enzimática de las proteínas a estudio constituye una excelente prueba de la estructura e identidad de las proteínas, siempre y cuando disponga de una base de datos suficientemente amplia para el organismo estudiado. En esta técnica, las muestras digeridas con tripsina son embebidas en una matriz de bajo peso molecular que es capaz de absorber la energía de un haz de luz láser que incide sobre la muestra y que induce el proceso de ionización de los péptidos.

Los diferentes iones generados se separarán con su ratio masa/carga (m/z) en el interior de un tubo sometido a una diferencia de potencial. Los iones, en función de su relación m/z , alcanzarán una determinada velocidad que será proporcional al tiempo de vuelo del ión por el tubo. Esto es, los iones cuanto más pequeños, antes llegarán al detector. El detector situado al final del tubo de vuelo es capaz de medir el número de iones que alcanzan el detector en un momento determinado (intensidad).

Existen espectrómetros de masas que combinan dos analizadores TOF consecutivos separados por una cámara de fragmentación, son los MALDI/TOF-TOF. Estos equipos permiten hacer análisis de masas en tándem, es decir, permiten que un determinado péptido que ha pasado por el primer analizador de masas (TOF) pueda fragmentarse a su

vez y determinarse la masa de los péptidos secundarios generados (MS-MS). El análisis de los fragmentos completa la información inicial y puede incluso usarse para determinar la secuencia de determinados péptidos.

En nuestro caso, se han realizado fragmentaciones MS-MS de hasta doce péptidos de cada “spot”, según la calidad del espectro. Una vez obtenido el perfil de masas se compara con bases de datos que contienen información acerca de la secuencia genética de los organismos estudiados y de las proteínas que codifican.

La identificación satisfactoria de una proteína analizada mediante este proceso depende en gran medida de la cantidad de información existente de las proteínas estudiadas, del algoritmo utilizado para la búsqueda (que permite asociar una probabilidad que mide la efectividad de cada una de las búsquedas) y de la reproducibilidad de los experimentos elaborados.

III.15.2.5.2. Técnica

El procedimiento que se describe a continuación se empleó con aquellos “spots” que mostraron diferencias significativas entre tratamientos. En primer lugar, las proteínas de interés se recortaron o picaron del gel automáticamente en una estación Investigador ProPic (Genomic Solutions). Los fragmentos del gel resultante se digirieron con tripsina también de manera automática en una estación Progest (Genomic Solutions) con las siguientes condiciones:

- dos pasos de destinción de 30 minutos con 40% acetonitrilo/100 mM bicarbonato amónico;
- dos rondas de lavado con 25 mM bicarbonato amónico durante 5 minutos y 25 mM bicarbonato amónico/50% acetonitrilo durante 15 minutos, respectivamente;
- deshidratación con 100% acetonitrilo durante 5 minutos y secado de la muestra;

- hidratación con 10 μ L de tripsina a 12,5 ng/ μ L en 25 mM bicarbonato amónico durante 10 minutos a temperatura ambiente;
- y posterior digestión en microondas durante 10 minutos.

La digestión se detuvo añadiendo a cada muestra 10 μ L de una solución de TFA al 0,5% en agua. Los péptidos resultantes de la digestión con tripsina, se purificaron de manera automática en una estación Pro MS (Genomic Solutions), mediante una microcolumna de resina C18 (ZipTip, Millipore), eluyéndose directamente con una solución de matriz (5 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en 70% acetonitrilo/0,1% TFA) sobre la placa MALDI en un volumen de 1 μ L.

Tras la cocrystalización sobre la placa, las muestras se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF para obtener la huella peptídica (MS) en un espectrómetro 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems) equipado con extracción retardada y reflector en modo positivo. Se realizó calibración interna de los espectros utilizando las relaciones m/z de los péptidos resultantes de la autólisis de la tripsina porcina (M+H+=842,509; M+H+=2211,104), obteniéndose de esta manera una precisión en la medida de las m/z de ± 20 ppm. De cada muestra se obtuvieron espectros de fragmentación (MS/MS) de las 12 m/z más intensas.

III.15.2.6. Interpretación de los resultados

III.15.2.6.1. Fundamento

La identificación de las proteínas, enzimas y sus funciones catalíticas necesariamente desemboca en una discusión sobre los procesos biológicos y mecanismos moleculares implicados. Los continuos y rápidos avances en las técnicas y herramientas informáticas utilizadas para el estudio de conjuntos de proteínas y de los procesos bioquímicos implicados han arrojado una gran cantidad de información valiosa acerca del origen de diferentes alteraciones que pueden sufrir los organismos vivos.

Esto ha originado que algunos autores hayan manifestado la posibilidad de un cambio de una “era genómica” a una “era proteómica”. Sin embargo, a pesar de que la identificación de proteínas utilizando análisis de manchas que proceden de geles bidimensionales mediante espectrometría de masas se ha establecido como una herramienta ampliamente utilizada, la cantidad (y calidad) de las identificaciones obtenidas utilizando estas técnicas depende en gran medida de la existencia previa de bases de datos con gran parte de la información genética del organismo (tejido, células...) estudiado.

Por esta razón, existe una necesidad de secuenciar el mayor número de organismos posible y de aumentar el nivel de conocimientos sobre la naturaleza de las proteínas que codifican (Larsen y Roepstorff, 2000).

III.15.2.6.2. Técnica

Para la identificación de proteínas mediante huella peptídica (PMF) los espectros obtenidos en el análisis de MALDI-TOF se trataron ajustando una línea base, eliminando el ruido y realizando un deisotipado de los picos para generar un listado de valores que correspondían con los iones monoisotópicos de cada péptido detectado. Posteriormente, se realizó la búsqueda en la base de datos NCBI no restringida (National Center for Biotechnology Information, USA).

La búsqueda se realizó combinando los resultados de la huella peptídica (MS) con las posteriores fragmentaciones (MS/MS). Se realizó una búsqueda combinada (MS + MS/MS). Si las fragmentaciones eran buenas, el programa las tenía en cuenta para la búsqueda aumentando así el éxito en la identificación. Si no eran buenas, buscaba sólo por huella peptídica. Como motor de búsqueda se utilizó el programa MASCOT (Matrix Science, Londres, Reino Unido). Para realizar estas búsquedas se tuvieron en cuenta todos los grupos taxonómicos (no se pusieron límites en la categoría taxonómica), tripsina como enzima de digestión, las cisteínas se consideraron carbamidometiladas y se tuvo en cuenta

la oxidación de las metioninas, la formación de piroglutámico y la posible acetilación del extremo N-terminal.

En los informes obtenidos del motor de búsqueda aparecen los siguientes términos:

- “Protein score”. Es una puntuación que da el motor de búsqueda (MASCOT) a cada identificación, según un sistema probabilístico basado en la distribución de las masas de los péptidos según la masa de la proteína a la que pertenecen (sistema Mowse).
- “Protein score C.I. %”. Es el intervalo de confianza para el “protein score”. Cuanto más cerca esté de 100, más fiable es la búsqueda, pero para tener seguridad debe estar por encima del 99%.
- “Peptide count”. El motor de búsqueda busca coincidencias entre las masas de los péptidos experimentales y las masas de los péptidos teóricos. El número de péptidos que consigue emparejar es el denominado “peptide count”.
- En el caso de que las fragmentaciones de péptidos por MS-MS hayan sido buenas y las haya usado en la búsqueda aparecen otros dos parámetros:
 - “Total Ion Score”. Suma de los “protein score” de cada uno de los iones fragmentados.
 - “Total Ion Score C.I. %”. Intervalo de confianza para el “total ion score”. Por encima de un 95% ya sería significativo.

III.16. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Los efectos de los diferentes tratamientos sobre todos los parámetros estudiados se han examinado usando el análisis t-Student para comparaciones entre medias. Las diferencias fueron consideradas como significativas para $p < 0,05$.

III.17. Recursos técnicos e instrumentales

Para la realización del presente trabajo de investigación se utilizaron los recursos instrumentales, medios técnicos e informáticos existentes en el Departamento de

Bioquímica y Biología Molecular I, de la Universidad de Granada y, los Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Granada.

El ácido maslínico fue suministrado por la empresa “Biomaslinic” S.L. Se trata de una empresa de base Biotecnológica que desarrolla patentes de aplicación de productos procedentes del olivar (ácido maslínico, hidroxitirosol, ácido oleanólico...), dedicada a la extracción de dichos productos a nivel industrial y focalizada en la investigación y desarrollo de todos aquellos subproductos del olivar que puedan ser de aplicación en sectores relacionados con la mejora de la alimentación y la salud.

Este “Spin-Off” está altamente vinculada a la Universidad de Granada, pues en ella se gestaron la mayoría de las patentes nacionales e internacionales que BIOMASLINIC explota en la actualidad la Universidad de Granada. A su vez, la Empresa Biomaslinic, mantiene relaciones con diferentes instituciones y empresas como el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), Ministerio de Industria Turismo y Comercio, Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (a través de la Agencia de Innovación y Desarrollo de Andalucía), Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI), Empresa Nacional de Innovación (ENISA), Asociación Española de Bioempresas (ASEBIO), Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud de Granada.

Para la conservación de las muestras y reactivos, se emplearon frigoríficos Bauknech Designer Style y congeladores de -20°C y -80°C marcas Zanussi y Revco, respectivamente. Las pesadas de reactivos y demás productos se realizaron en balanzas de precisión Mettler Toledo AG245 (rango de pesada 101 g ± 0,0001 g).

Las centrifugaciones se llevaron a cabo utilizando una centrífuga refrigerada Kubota 5100 con un rotor RA/500, y una centrífuga Beckman TJB y una ultracentrífuga Beckman Optima™ LE-80K, U.S.A en un rotor de ángulo fijo TY-50.

El lector multiplacas Powerwave Instruments fue utilizado para todas las medidas espectrofotométricas. Es de la marca Bio-Tek. Con él se midieron todos los análisis

correspondientes a las concentraciones de metabolitos, actividades enzimáticas y viabilidad celular.

En la unidad de Servicios Técnicos de la Universidad de Granada se realizaron los ensayos de citometría de flujo. El citómetro empleado fue de la marca BDFACS Canto II ubicado en las propias instalaciones.

Para los ensayos de “Western-blot”, las electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE) se realizaron usando el sistema “Mini-Protean® 3 Cell” de Bio-Rad Laboratorios.

Las transferencias a membrana se hicieron con un equipo de electrotransferencia semiseca “Trans-blot® SD Semi-dry Electrophoretic Transfer Cell”. Como fuentes de alimentación se usó la PowerPac 200 y PowerPac 1000.

Las incubaciones de las membranas se han llevaron a cabo utilizando agitadores orbitales de la marca Heidolph Instruments, modelo Polimax 1040. Para el revelado por quimioluminiscencia se ha utilizó un “casete” de autorradiografía Hypercassette™ de Amershan Biosciences y películas para autorradiografía.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

Efecto del AM como antioxidante

IV.1. Estudio de viabilidad celular (MTT).

Con la intención de determinar la viabilidad celular en las líneas celulares A10 (células musculares lisas) y B16-F10 (células de melanoma de ratón), frente a la acción del ácido maslínico, condiciones estresantes y agentes oxidantes, fue realizado el ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium).

Los resultados se expresan como porcentaje de células vivas respecto al control, considerando éste como el 100% de la viabilidad celular.

IV.1.1. Tratamiento de ácido maslínico con y sin factores de crecimiento (FBS).

Los resultados se muestran en la (Figura 14).

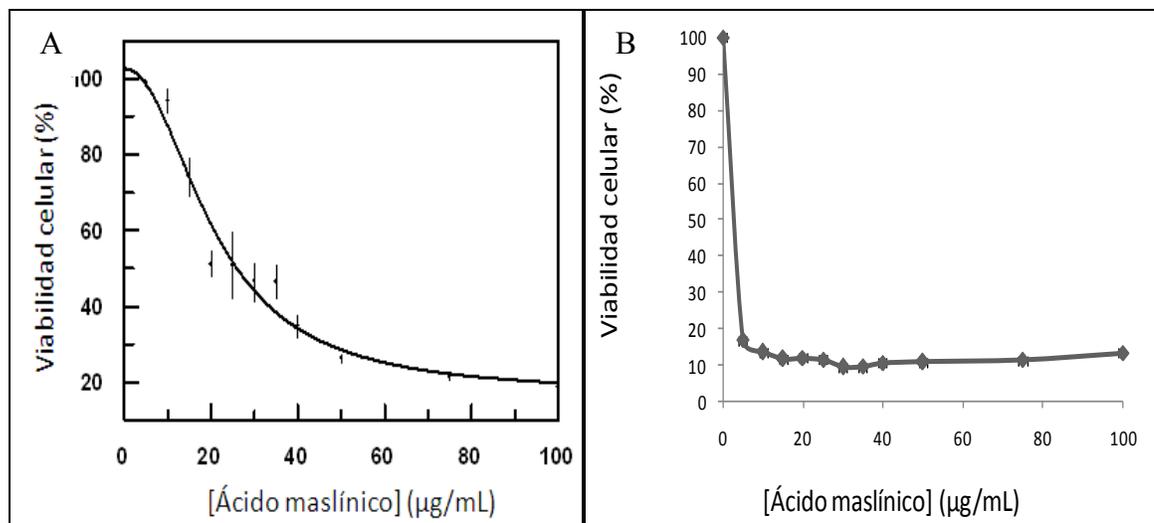


Figura 14. Efecto del ácido maslínico sobre la inhibición del crecimiento celular de B16-F10, tras 24 horas de tratamiento con AM (A) Con FBS y (B) Sin FBS. La inhibición fue analizada con el ensayo MTT.

El ensayo de MTT en este tratamiento fue realizado en placas de 96 pocillos, con concentraciones de ácido maslínico de 0; 0,011; 0,021; 0,032; 0,042; 0,053; 0,063; 0,074; 0,085; 0,105; 0,158; 0,211 mM.

Los resultados para B16-F10 muestran que el ácido maslínico induce un decremento dosis-dependiente en la viabilidad celular, en células que son capaces de acumular formazán después de 24 horas de tratamiento en presencia de suero bovino fetal y AM.

La concentración de ácido maslínico que produjo la inhibición del crecimiento del cultivo celular de B16-F10 con FBS, en un 50% (IC₅₀) fue de 20 µg/mL (42,3 µM)

Sin embargo, los resultados encontrados para esta misma línea celular y con las mismas concentraciones de AM, pero en ausencia de factores de crecimiento fueron notoriamente diferentes. A dosis bajas de AM (5 µg/mL u 10,5 µM) se observó que ya se inhibía más del 50% de la población (Figura 14B).

Estos mismos tratamientos se realizaron en una línea celular normal, A10. Los resultados se muestran en la Figura 15.

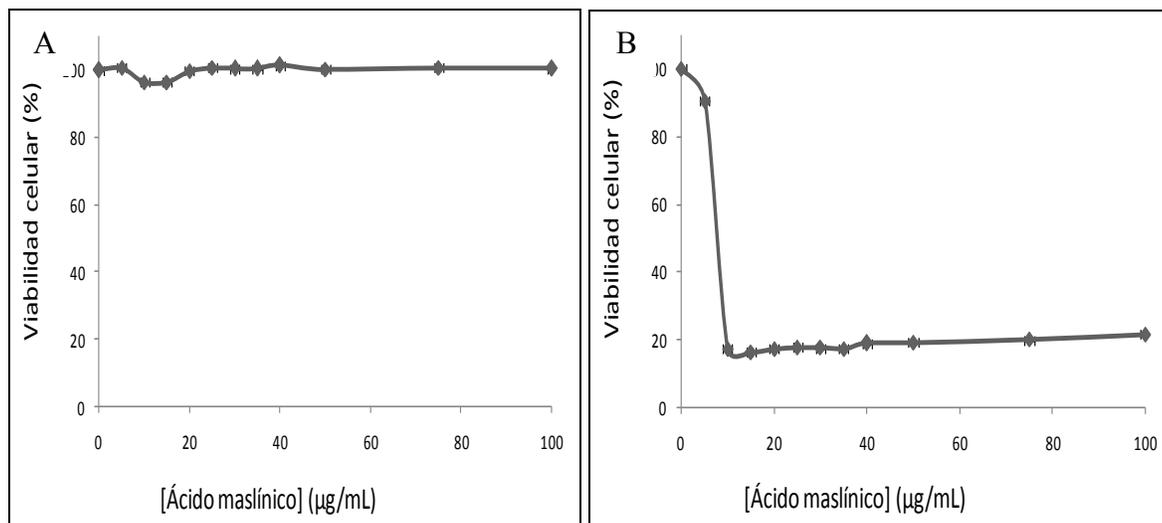


Figura 15. Efecto del ácido maslínico sobre la inhibición del crecimiento celular A10, tras 24 horas de tratamiento con AM (A) Con FBS y (B) Sin FBS. La inhibición fue analizada con el ensayo MTT.

Los resultados mostraron un decremento dosis-dependiente de la viabilidad de estas células, frente al tratamiento con ácido maslínico tras 24 horas, sólo en los ensayos en los que no se utilizó FBS (Figura 15B).

Las células cuando se les añadió FBS y AM no se vieron afectadas por las diferentes concentraciones de AM, inclusive a concentraciones elevadas de 100 µg/mL (0,211 mM), por lo cual la IC₅₀ en estas condiciones no pudo ser determinada (Figura 15A). La concentración de AM que produjo la inhibición del crecimiento del cultivo celular de A10 sin FBS, en un 50% (IC₅₀) fue de 12 µg/mL (25,4 µM) (Figura 15B).

IV.1.2. Tratamiento con H₂O₂

El ensayo de MTT en este tratamiento fue realizado en placas de 96 pocillos, con concentraciones de H₂O₂ de 0; 0,06; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,75; 1,05; 1,5; 1,95; 2,55; 3 mM. El medio de cultivo utilizado, en ambas líneas celulares, tenía presencia de FBS.

Los resultados para este tratamiento se muestran en la Figura 16.

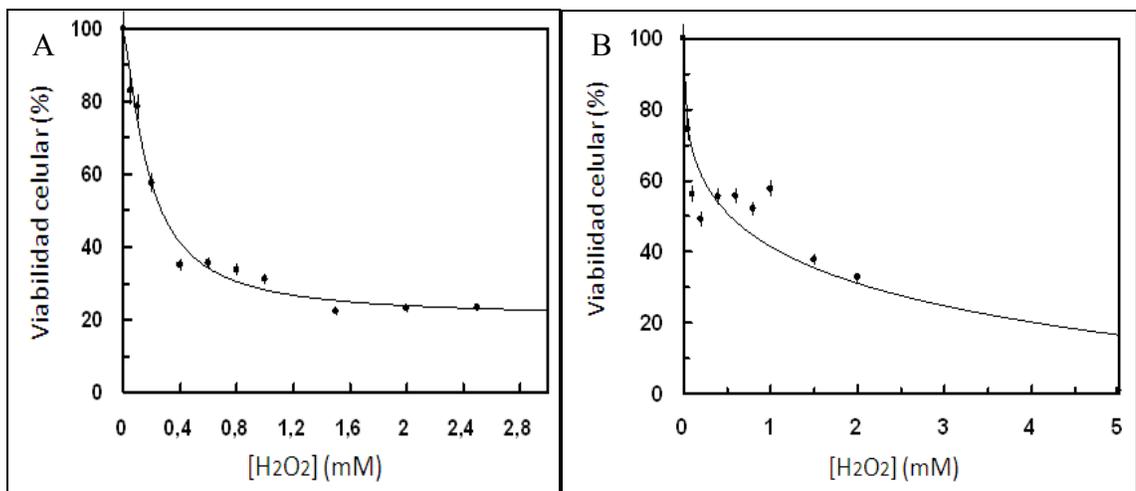


Figura 16. Efecto del H₂O₂ sobre la inhibición del crecimiento celular tras 24 horas de tratamiento. La inhibición fue analizada con el ensayo MTT. (A) Curva de viabilidad dosis-dependiente para B16-F10. (B) Curva de viabilidad dosis-dependiente para A10.

Los resultados para B16-F10 y para A10 indicaron que el H₂O₂ induce un decremento dosis-dependiente en la viabilidad celular (Figura 16A y 16B). El efecto del H₂O₂ en ambas líneas redujo la viabilidad celular a medida que se aumentaba la cantidad de éste.

La concentración de H₂O₂ que produjo la inhibición del crecimiento del cultivo celular de B16-F10 (Figura 16A) y del cultivo celular de A10 (Figura 16B) en un 50% (IC₅₀), fue de 0,20 mM. Esto nos sugería, que ambas líneas eran bastante sensibles al efecto del H₂O₂, es decir, se ven afectadas por él.

IV.1.3. Tratamiento con SNP

Este tratamiento fue realizado en placas de 96 pocillos, con concentraciones de SNP de 0; 0,017; 0,034; 0,05; 0,067; 0,084; 0,101; 0,117; 0,134; 0,168; 0,252; 0,336; 0,42; 0,5; 0,6; 0,7; 0,9 mM. El medio de cultivo para ambos tipos celulares tenía presencia de FBS.

Los resultados con este tratamiento se muestran en la figura 17.

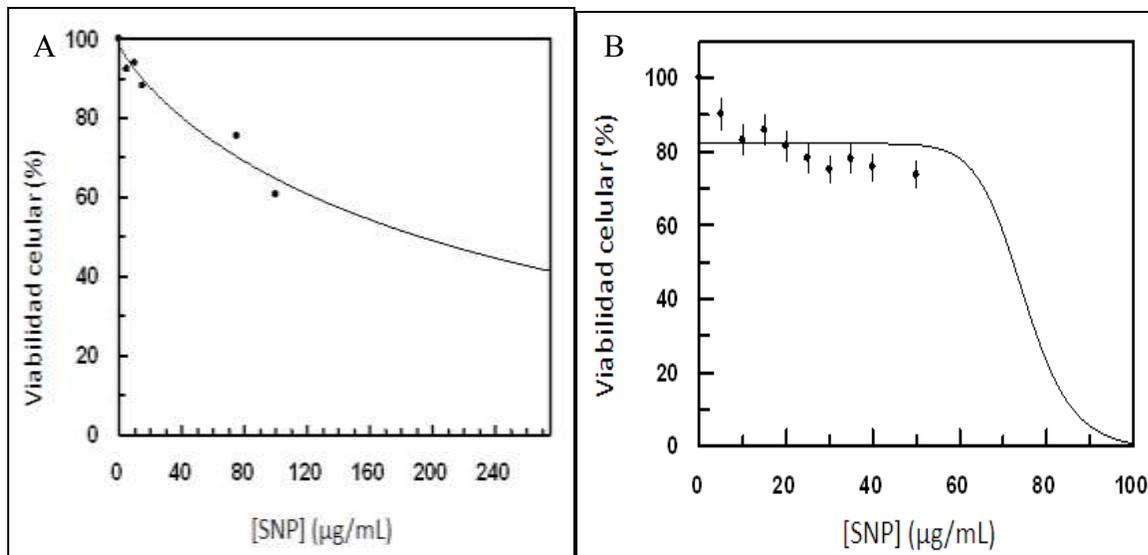


Figura 17. Efecto del SNP sobre la inhibición del crecimiento celular tras 24 horas de tratamiento. La inhibición fue analizada con el ensayo MTT. (A) Curva de viabilidad dosis-dependiente para B16-F10. (B) Curva de viabilidad dosis-dependiente para A10.

Los resultados para B16-F10 mostraron que el SNP provocó, de forma similar obtenidos con tratamientos anteriores, un decremento dosis-dependiente en la viabilidad celular tras 24 horas de tratamiento, pero esta vez de forma bastante lenta como se muestra en la figura 17A.

La concentración de SNP que produjo la inhibición del crecimiento del cultivo celular de B16-F10 en un 50% (IC₅₀), fue de 263 µg/mL (0,882 mM).

Por otra parte, para A10 se obtuvo que el tratamiento con SNP mostró un decremento mucho mayor en la viabilidad celular en comparación con las células B16-F10 (Figura 17B). La concentración de SNP que produjo la inhibición del crecimiento del cultivo celular de A10 fue de 74 µg/mL (0,248 mM).

El resumen de las concentraciones de ácido maslínico, H₂O₂ y SNP, que produjeron la inhibición del crecimiento de los cultivos celulares en un 50% (IC₅₀) y fueron usadas en los ensayos siguientes, se pueden observar en la tabla 6.

Tabla 6. Resumen de IC₅₀ determinados en los ensayos de MTT.

Tratamiento	IC ₅₀	
	B16-F10	A10
Con FBS	42,3 µM	sin efecto citotóxico incluso a 211 µM
Sin FBS	10,5 µM	25,4 µM
Con H ₂ O ₂	200 µM	200 µM
Con SNP	882 µM	248 µM

IV.2. Determinación de la concentración de proteínas por el método de BCA

La cuantificación de proteína celular se realizó por el método BCA, explicado en la sección de material y métodos.

Los resultados obtenidos en los tratamientos con presencia y ausencia de FBS en la línea celular B16-F10, se encuentran en la figura 18.

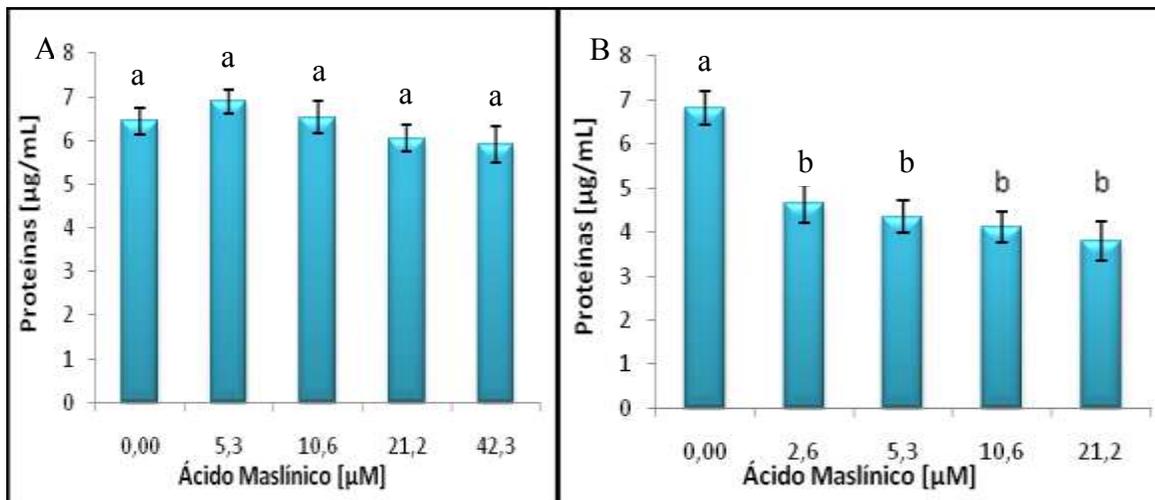


Figura 28. Efecto del AM en la concentración de proteínas de la línea celular B16-F10 A) Con FBS y B) Sin FBS. La concentración fue determinada mediante el método de BCA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

En ésta se puede observar que la concentración de proteínas no varía al aumentar la cantidad de AM en presencia de factores de crecimiento. Las concentraciones de AM empleadas fueron IC_{50} , $IC_{50/2}$, $IC_{50/4}$ e $IC_{50/8}$ sabiendo que la IC_{50} era $42,3 \mu M$ para estas células (Figura 18A).

Por el contrario, en ausencia de FBS, en esta misma línea celular, se observa que la concentración de proteínas disminuye de forma significativa con la adición de AM ($IC_{50/2}$, $IC_{50/4}$, $IC_{50/8}$ y $IC_{50/16}$) (Figura 18B).

A todas las dosis empleadas de AM se aprecia una reducción en la concentración de proteínas respecto al control, pero entre diferentes concentraciones de AM no se aprecian estas diferencias. La ausencia de suero provocó esta disminución.

Los resultados mostrados en la figura 19, corresponden a las células A10 en presencia y ausencia de FBS.

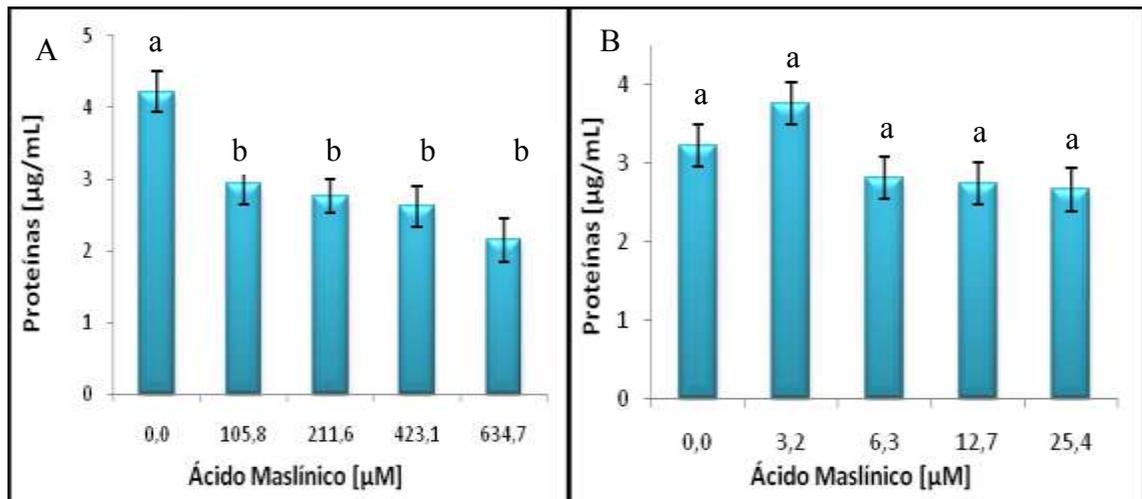


Figura 39. Efecto del AM en la concentración de proteínas de la línea celular A10 A) Con FBS y (B) Sin FBS. La concentración fue determinada mediante el método de BCA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se observa que la concentración de proteínas, en las células cultivadas en presencia de FBS decrece significativamente con la adición de AM (Figura 19A).

En este caso, las concentraciones de AM empleadas fueron más altas que en el resto de condiciones, ya que el AM no produjo ninguna variación en la viabilidad de estas células incluso a 211 µM (concentraciones altas de compuesto). Finalmente, las concentraciones empleadas fueron: 105,8; 211,6; 423,1; 634,7 µM

Por otro lado, la concentración de proteínas determinada en los tratamientos celulares sin FBS y presencia de AM (IC_{50} , $IC_{50/2}$, $IC_{50/4}$ y $IC_{50/8}$; $IC_{50}=25,4$ µM) mantiene un comportamiento estable sin verse efecto ninguno (Figura 19B), es decir, no se produjo ningún cambio en la concentración de proteínas a ninguna de las concentraciones ensayadas.

Los resultados obtenidos para las células B16-F10, tratadas con los agentes oxidantes SNP y H₂O₂, se encuentran en la Figura 20.

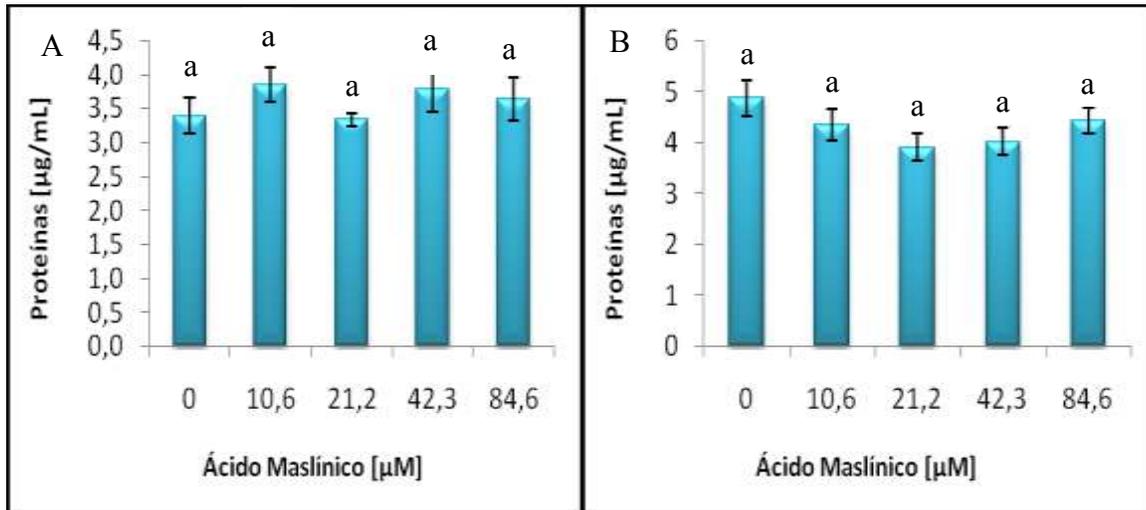


Figura 20. Efecto del AM en la concentración de proteínas de la línea celular B16-F10 A) Con H₂O₂ (150 µM) y B) Con SNP (200 µM). La concentración fue determinada mediante el método de BCA. Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05).

En la Figura 20A se muestran para la concentración de proteínas en células previamente estresadas con H₂O₂. La concentración empleada del mismo fue de 150 µM durante 3 h. Posteriormente se les adicionó el AM a diferentes concentraciones durante 24 h.

Los resultados encontrados nos dicen que la concentración de proteínas mantiene un comportamiento estable en todas las concentraciones de AM utilizadas.

De igual forma, en los tratamientos de SNP a concentraciones de 200 µM durante 3 h, se observa que no existe cambio en la concentración de proteína cuando añadimos ácido maslínico, a ninguna de las concentraciones utilizadas (10,6; 21,2; 42,3; 84,6 µM) (Figura 20B).

Por su parte, los resultados obtenidos en la línea celular A10, tratadas con los agentes oxidantes SNP y H₂O₂, se observan en la Figura 21.

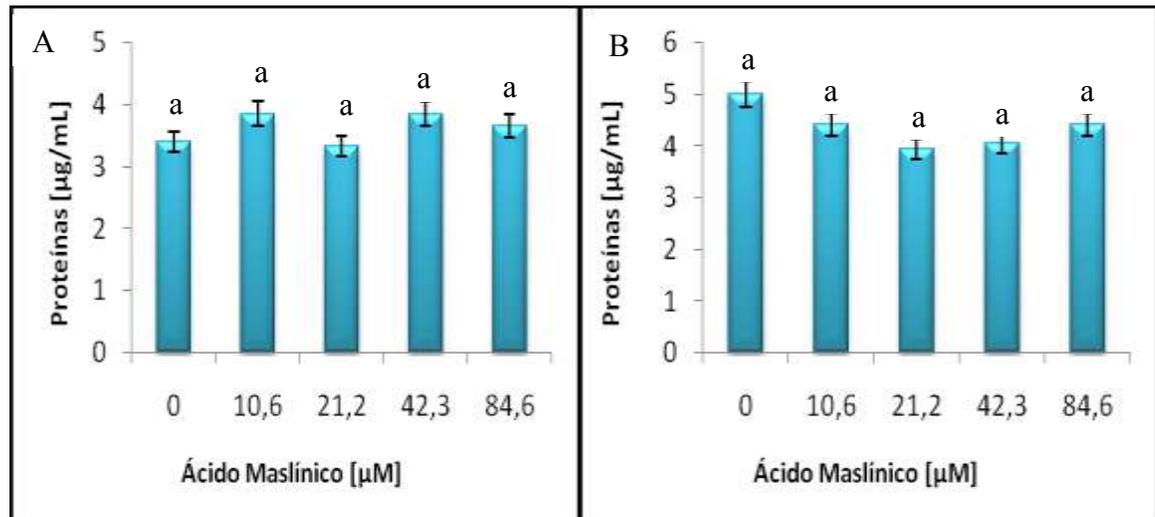


Figura 21. Efecto del AM en la concentración de proteínas de la línea celular A10 A) Con H₂O₂ (150 µM) y B) Con SNP (200 µM). La concentración fue determinada mediante el método de BCA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Pudimos observar que la concentración de proteínas, en células estresadas con H₂O₂, no presenta efecto alguno cuando se añadían dosis crecientes de AM. En presencia de SNP, observamos un comportamiento de la concentración de proteínas, similar al obtenido con el tratamiento con H₂O₂ (Figura 21B), ya que a ninguna concentración ensayada de AM varió significativamente la concentración de proteínas.

IV.3. Estudio de la actividad celular por citometría de flujo (1, 2, 3 DHR)

Este estudio consistió en medir el H₂O₂ intracelular mediante el uso del fluorocromo 1, 2, 3 Dihidrorodamina (DHR), en un citómetro de flujo. Tras la medida de cada tratamiento, se obtuvo un porcentaje de actividad celular en cada una de nuestras condiciones experimentales y líneas celulares empleadas.

Los resultados se presentan agrupados según los tratamientos que se querían comparar. En primer lugar, en las células B16-F10, inicialmente se realizó un control de los

agentes estresantes SNP y H₂O₂, con objeto de observar las diferentes actividades celulares en respuesta a un agente y a otro. Los ensayos se realizaron a dosis fijas de SNP y H₂O₂ de acuerdo con los resultados obtenidos de MTT y lo que se varió fueron los tiempos de incubación (3 y 24 h), con objeto de conocer además del efecto dosis, el efecto tiempo.

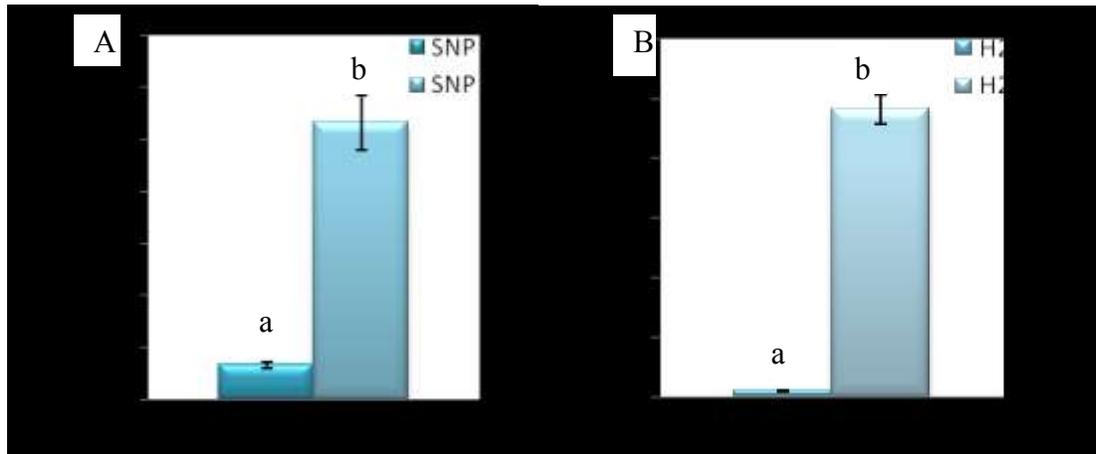


Figura 22. Variaciones de la actividad celular de B16-F10 durante el tratamiento de compuestos estresantes, posterior a su aplicación en cultivo a 3 y 24 horas (A) Efecto del SNP [200 μM]. (B) Efecto del H₂O₂ [150 μM]. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los resultados mostraron que la actividad celular aumentaba de manera significativa con el tiempo (de 3h a 24 h) a una concentración fija de 200 μM de SNP (Figura 22A). De igual forma, pero en presencia de H₂O₂ a una dosis de 150 μM, la actividad celular aumenta en función del tiempo, ya que a 24 horas, la actividad celular detectada por DHR es mucho mayor que a 3 h. (Figura 22B).

Para poder visualizar el efecto correctamente de los compuestos oxidantes, se realizó además, un estudio de la actividad DHR en función de la concentración de compuesto utilizado. De este modo, se sabría cómo se afectan nuestras líneas celulares en función de la cantidad de compuesto y en función del tiempo de exposición al mismo.

Los resultados encontrados para la línea tumoral B16-F10 se muestran en la Figura 23A. En ella se puede observar que a medida que la concentración de SNP aumenta, se incrementa significativamente la actividad celular en un 20%. Por otro lado, cuando aumentamos la concentración de H₂O₂ en el cultivo celular de 150 μM hasta tres veces esta concentración (300 μM) observamos también un aumento en la actividad celular (Figura 23B).

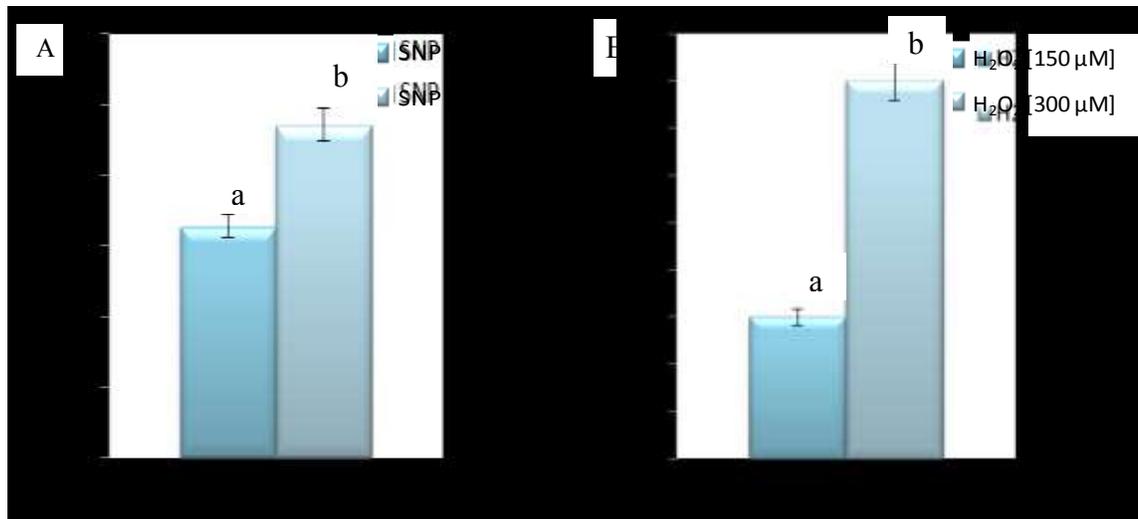


Figura 23. Variaciones de la actividad celular de B16-F10 durante el tratamiento de 3 horas con compuestos estresantes, a diferentes concentraciones. (A) Efecto del SNP [200 μM] y [400 μM]. (B) Efecto del H₂O₂ [150 μM] y [300 μM]. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Las distintas concentraciones de AM también afectaron a la actividad celular dependiendo del agente estresante utilizado. En la Figura 20A se observa el comportamiento de las células B16-F10 a una concentración fija de SNP y a concentraciones crecientes de AM. Los resultados mostraron que al añadir AM a las células estresadas inicialmente con 200 μM de SNP, se producía aumento significativo de la actividad celular a las concentraciones de 10,6 μM y de 21,6 μM de AM, sin embargo, este incremento no fue significativo entre ambas concentraciones.

A concentraciones más elevadas de ácido maslínico (42,3 μM y 84,6 μM) se observa una reducción significativa de la actividad celular en presencia de SNP con respecto a los

tratamientos anteriores en donde la concentración de AM era menor (Figura 24A). Sin embargo, si comparamos estas actividades celulares con la actividad obtenida con SNP sin AM, vemos que el estrés sigue estando presente en todas las concentraciones de AM empleadas.

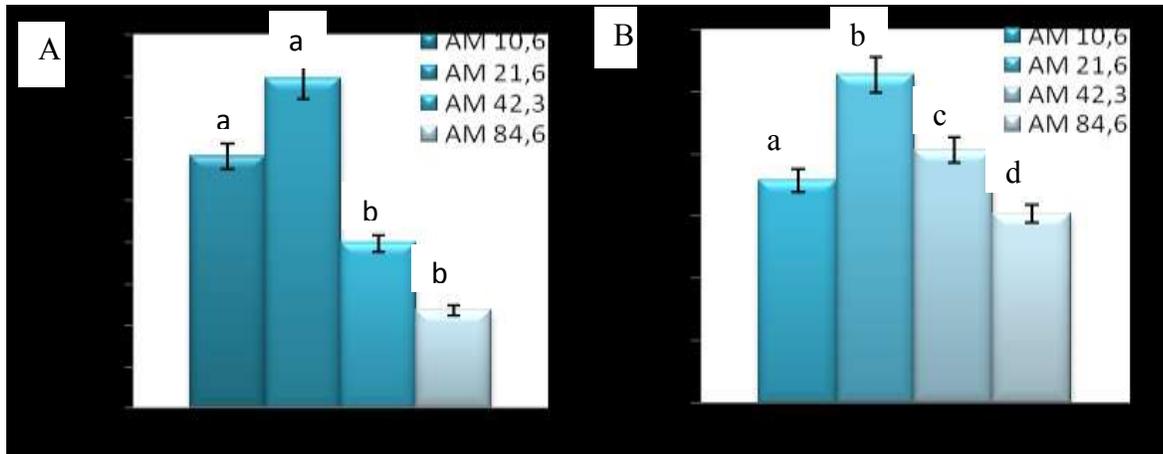


Figura 24. Variaciones de la actividad celular de B16-F10 durante el tratamiento con agentes estresantes y AM a diferentes concentraciones. (A) Efecto del SNP [200 µM]. (B) Efecto del H₂O₂ [150 µM]. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por otra parte, las células tratadas con una concentración fija de H₂O₂, mostraron un aumento significativo a la concentración de AM de 21,6 µM (IC_{50/2}) con respecto a la concentración de 10,6 µM. A concentraciones mayores de ácido maslínico se observó una reducción significativa de esta actividad celular con respecto a las dos dosis menores de AM estudiadas (Figura 24B). Por el contrario, si comparamos estos resultados obtenidos para las diferentes concentraciones de AM en presencia de H₂O₂ con respecto al control únicamente con H₂O₂ se observa que existe un aumento de la actividad celular.

El efecto de los dos agentes estresantes, H₂O₂ y SNP; también se estudió en la línea celular A10. Para ello se incubaron las células con cantidades fijas de ellos durante diferentes tiempos de incubación, 3 y 24 h (Figura 25). Los resultados que se encontraron fueron que la actividad celular aumenta significativamente cuando se deja actuar el agente estresante durante 24 horas. Estos resultados se observaron para SNP (Figura

25A), en donde la actividad celular aumentó significativamente en un 40% y para H₂O₂ en donde el aumento fue del 9% (Figura 25B).

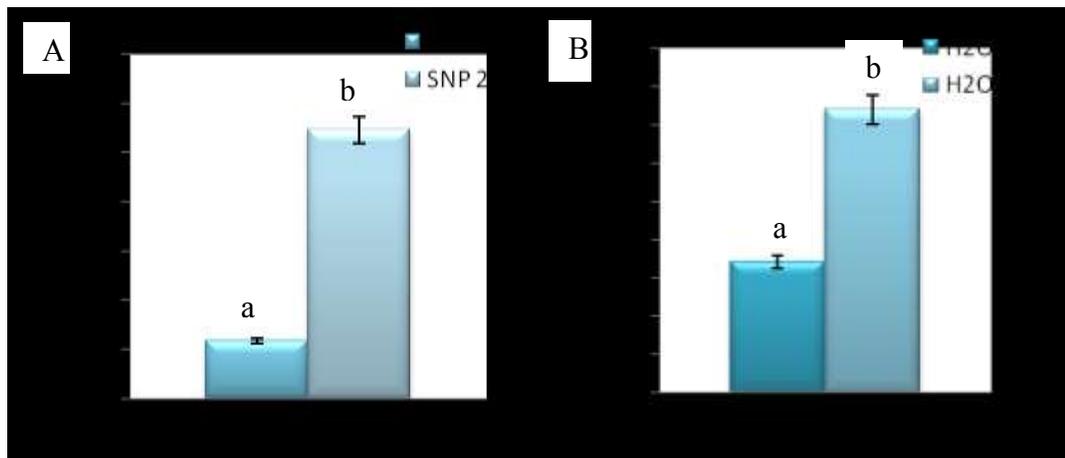


Figura 25. Variaciones de la actividad celular de A10 durante el tratamiento de compuestos estresantes, posterior a su aplicación en cultivo a 3 y 24 horas (A) Efecto del SNP [200 μM]. (B) Efecto del H₂O₂ [150 μM]. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Asimismo, se pretendía evaluar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de AM con una dosis fija de SNP y H₂O₂, con objeto de ver si existían diferencias en la actividad celular encontrada que se le atribuyesen al AM en la línea celular normal A10.

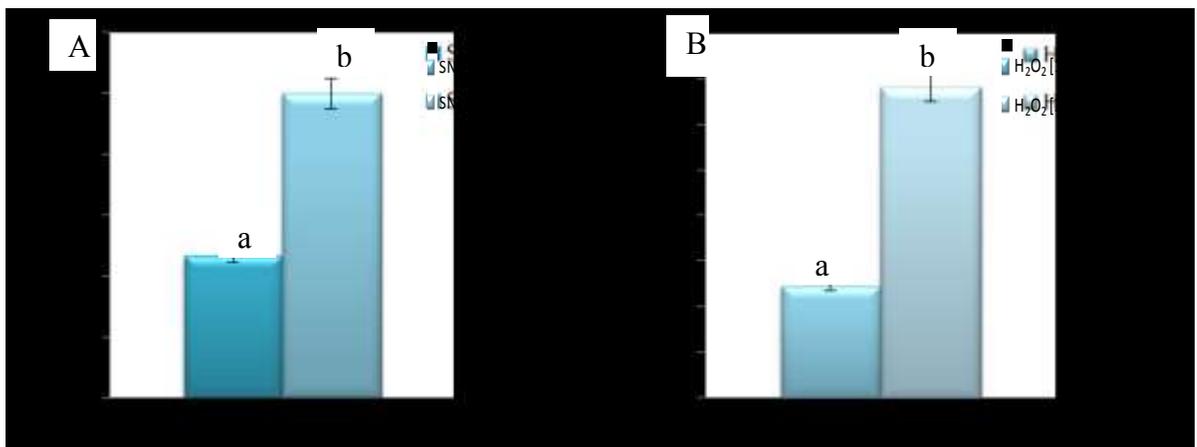


Figura 26. Variaciones de la actividad celular de A10 durante el tratamiento de compuestos estresantes, posterior a su aplicación en cultivo a 3 y 24 horas (A) Efecto del SNP [200 μM]. (B) Efecto del H₂O₂ [150 μM]. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la Figura 26, se observan los resultados de actividad celular frente a las diferentes dosis de agentes estresantes SNP y H₂O₂ en células normales A10. Se puede observar que conforme aumentamos las concentraciones de SNP (de 200 a 400 μM) (Figura 26A) y de H₂O₂ (de 150 a 300 μM) utilizadas (Figura 26B), en ambos casos, aumenta la actividad celular detectada por DHR significativamente.

Los resultados obtenidos para las distintas concentraciones de AM que afectaron a la actividad celular de A10, dependiendo del agente estresante utilizado, se muestra Figura 27.

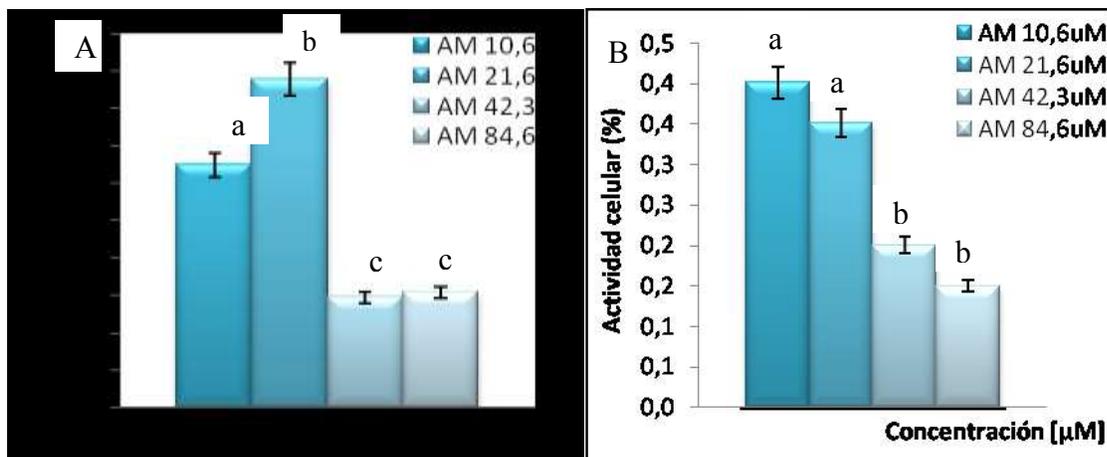


Figura 27. Variaciones de la actividad celular de A10 durante el tratamiento con agentes estresantes y AM a diferentes concentraciones. (A) Efecto del SNP [200 μM]. (B) Efecto del H₂O₂ [150 μM]. Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05,

En la Figura 27A se encontró que al añadir AM, a las células tratadas inicialmente con SNP a una dosis fija de 200 μM, se producía un aumento significativo de la actividad celular a la concentración 21,6 μM con respecto a la concentración 10,6 μM de AM. A concentraciones más elevadas de ácido maslínico (42,3 y 84,6 μM) se observa una reducción significativa de la actividad celular en presencia de SNP (Figura 27B). Asimismo, se produjo una disminución de la actividad celular encontrada en los tratamientos con AM, con respecto al control con SNP y sin AM. Esta disminución fue de un 10% a la dosis de 10,6 μM, y de un 40% a las dosis mayores de AM ensayadas.

En estos mismos ensayos, en células A10 estresadas con H₂O₂, se encontró que la actividad celular decrece progresivamente con el aumento significativo de las dosis de AM estudiadas.

Al comparar la actividad celular obtenida con H₂O₂ solo, se observa una disminución de la actividad celular a todas las concentraciones de AM (Figura 27B), revirtiendo el efecto estresante ocasionada por el H₂O₂.

Finalmente, con objeto de conocer la actividad celular por DHR frente a dosis crecientes de AM, se estudió este efecto sobre las dos líneas celulares, en ausencia de agentes estresantes y con las concentraciones de AM correspondientes a 31,7 y 126,9 μM (Figura 28).

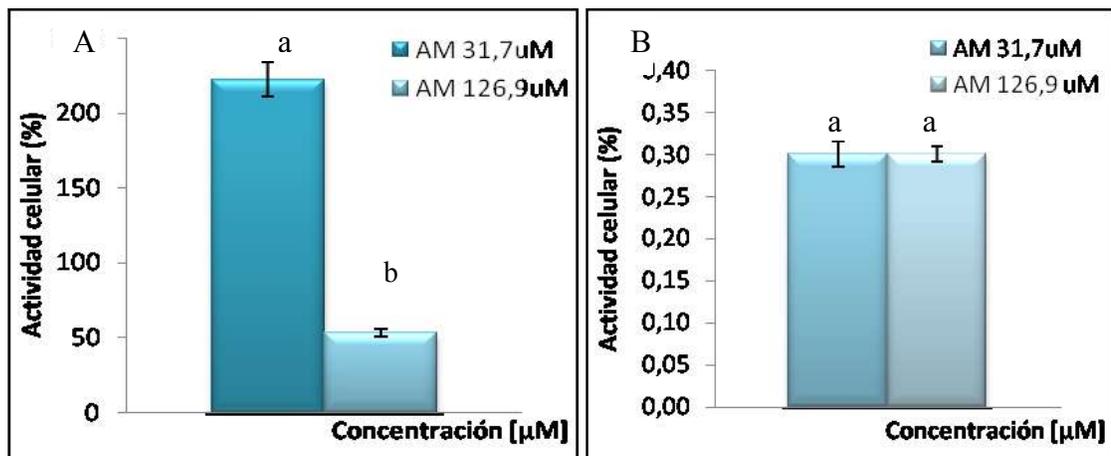


Figura 28. Variaciones de la actividad celular a diferentes concentraciones de AM. (A) B16-F10. (B) A10. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En las células tumorales (B16-F10) se encuentra que la mayor concentración de AM reduce la actividad celular (Figura 28A). Por el contrario, en la línea normal (A10), no se observa variación alguna en su actividad celular a las dos concentraciones de AM (Figura 28B), además, de que los valores de actividad celular son muy bajos, si los comparamos con la línea tumoral.

IV.4. Actividades enzimáticas antioxidantes

IV.4.1. Actividad superóxido dismutasa (SOD)

Los resultados de medida enzimática de la SOD en la línea celular A10, con los distintos agentes oxidantes empleados en este estudio, pueden apreciarse en la Figura 29. En primer lugar, se estudió la actividad de esta enzima privando a la célula de los factores de crecimiento (FBS).

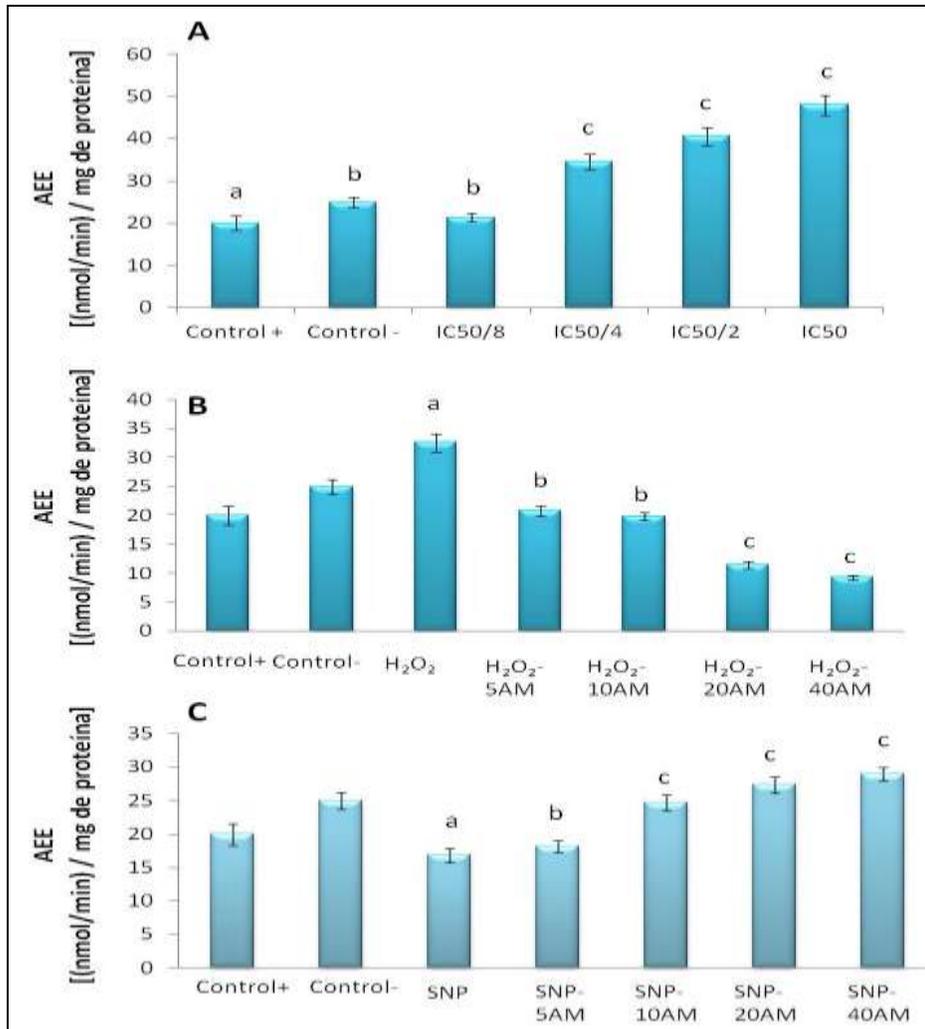


Figura 29. Actividad SOD en A10 para distintos tratamientos. (A) Tratamiento sin suero. (B) Peróxido de hidrógeno. (C) SNP. Los resultados se muestran como la media de 9 valores \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

A medida que aumenta la concentración de AM podemos observar que la actividad enzimática se ve aumentada de manera significativa, a todas las concentraciones empleadas, excepto a $IC_{50/8}$, cuando comparamos con respecto al control sin FBS. Este aumento supuso más del 50% para las concentraciones $IC_{50/2}$ e IC_{50} (Figura 29A). Asimismo, pudimos observar que la privación de FBS estimulaba la actividad enzimática SOD con respecto al control de células con FBS (control positivo).

La actividad SOD en presencia de H_2O_2 se vio incrementada con respecto a los dos controles en células A10. La adición de AM provocó la disminución del incremento de la actividad de la SOD, contrarrestando así el efecto oxidante producido por el H_2O_2 . Estas diferencias se pudieron observar a todas las concentraciones de AM empleadas (5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$).

Las concentraciones de 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$ de AM empleadas disminuyeron la actividad de esta enzima, incluso por debajo del control (Figura 29B). A las concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$, la actividad del enzima recupera los valores encontrados en el control positivo donde no hay estrés, este hecho podría suponer que el ácido maslinico a estas concentraciones puede revertir el estado de estrés ocasionado y comportarse de nuevo como una célula normal sin daño oxidativo aparente.

En el panel C de la Figura 29, se pueden observar los resultados obtenidos al utilizar SNP como agente oxidante. El SNP, como tal, no produjo un aumento de la actividad enzimática SOD en las células A10, este hecho se podría asociar a que la propia defensa antioxidante de las células es suficiente como para revertir el estrés ocasionado por el SNP, o, por otro lado, que el estrés es a muy bajo nivel y no se aprecian los cambios. A la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ de AM tampoco se vieron cambios en dicha actividad. Sin embargo, a las concentraciones de AM de 10, 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$ si se produjeron diferencias significativas en el aumento de la actividad enzimática, en donde pudimos observar un aumento no significativo de dicha actividad en función de la dosis de AM utilizada.

Por otra parte, los resultados de la actividad enzimática SOD en la línea celular B16-F10 bajo las condiciones de estrés de este estudio, se aprecian en la Figura 30.

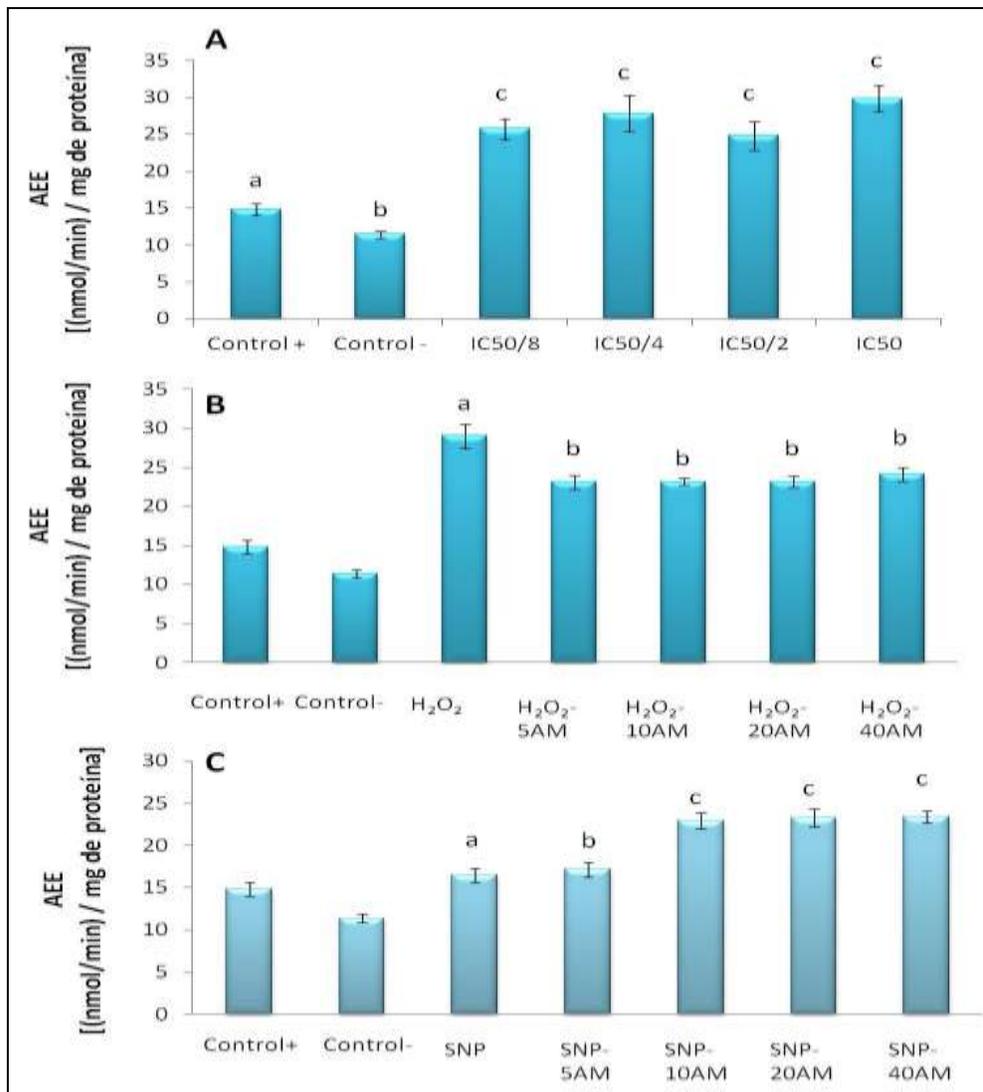


Figura 30. Actividad SOD en B16-F10 para distintos tratamientos. (A) Tratamiento sin suero. (B) Peróxido de hidrógeno. (C) SNP. Los resultados se muestran como la media de 9 valores \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La actividad de esta enzima en ausencia de factores de crecimiento (FBS) incrementó de manera significativa en todas las concentraciones con AM, llegando inclusive a duplicarse respecto al control negativo (ausencia de FBS y AM) (Figura 30A).

Cabe destacar que no se vieron diferencias en la actividad de la SOD en función de las dosis utilizadas de AM, todas ellas aumentaron la actividad SOD. Asimismo, pudimos observar que la falta de FBS en estas células provoca una disminución de la actividad SOD detectada, con lo que el aumento observado en respuesta a la adición de AM es aún mayor.

La actividad SOD en presencia de H_2O_2 se vio incrementada en más de un 50% respecto a los controles. La adición de AM en los tratamientos, provocó la disminución de la actividad de la SOD, en comparación con el tratamiento con sólo H_2O_2 , contrarrestando así el efecto oxidante.

Estas diferencias en la actividad de la SOD, se hallaron en todas las concentraciones de AM empleadas (5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sin tener diferencias significativas entre ellas (Figura 30B).

Por otro lado, la actividad SOD en presencia de SNP, no produjo diferencias significativas con respecto al control. La actividad enzimática SOD en presencia de SNP y diferentes concentraciones de AM, sí mostró diferencias significativas respecto al control, ya que su actividad incrementó, siendo mayor a concentraciones de 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AM.

Asimismo, los resultados demostraron que la actividad SOD en presencia de AM aumenta por encima del control positivo en donde las células no están sometidas a ningún tipo de estrés (Figura 30C).

IV.4.2. Actividad Catalasa (CAT)

Los resultados de medida de actividad enzimática catalasa en la línea celular A10, obtenida en los diferentes ensayos con los distintos agentes oxidantes empleados, se observan en la Figura 31.

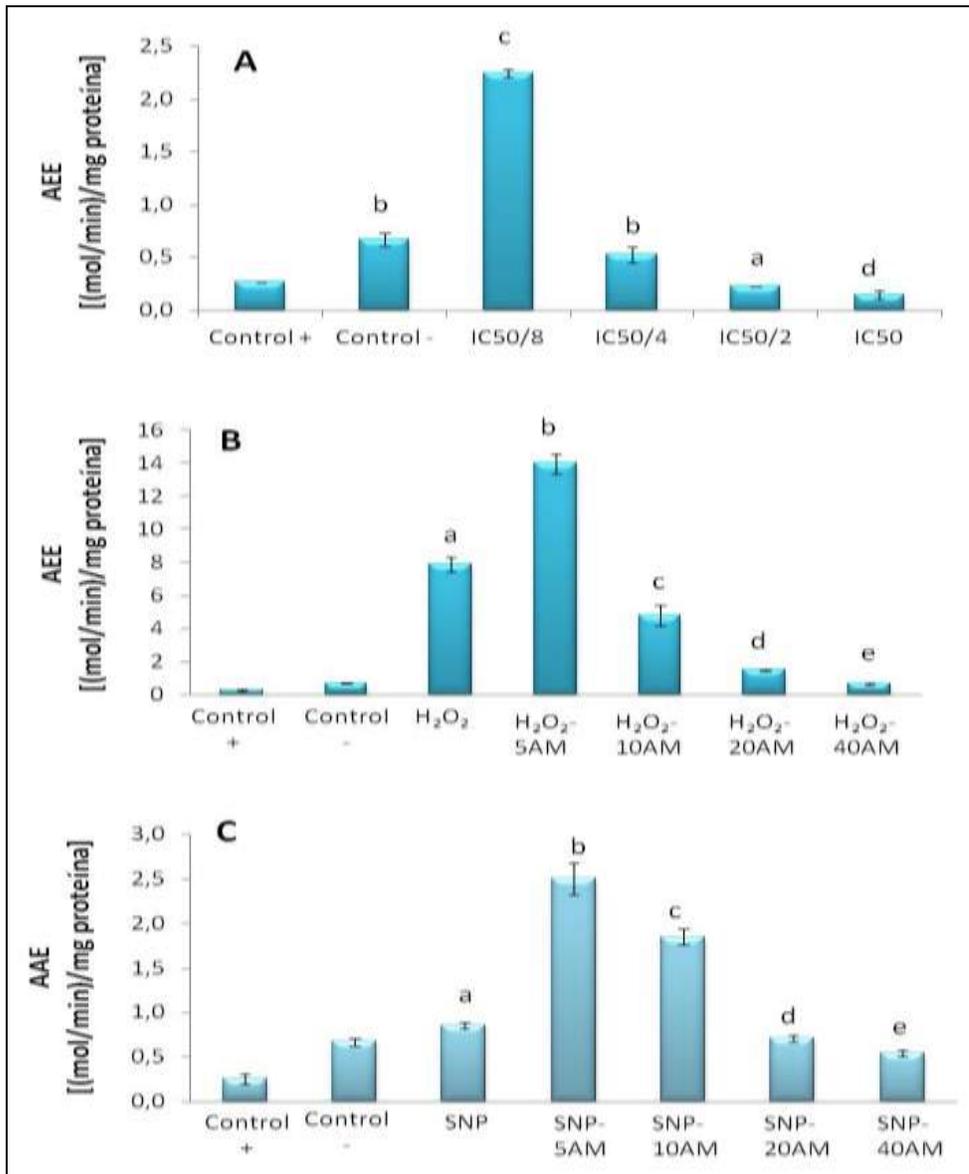


Figura 31. Actividad catalasa en A10 para distintos tratamientos. (A) Tratamiento sin suero. (B) Peróxido de hidrógeno. (C) SNP. Los resultados se muestran como la media de 9 valores \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En primer lugar, la actividad catalasa obtenida, cuando privamos a las células de FBS, se puede apreciar en la Figura 31A. Se observa que esta actividad aumenta significativamente en ausencia de FBS respecto al control + (con FBS), es decir, la ausencia de FBS produce un aumento de la actividad catalasa.

A medida que aumenta la concentración de AM se puede observar que la actividad enzimática disminuye de manera significativa, partiendo de la concentración de AM a $IC_{50/8}$, donde la actividad supera en más de tres veces a la del control positivo.

A las concentraciones de $IC_{50/4}$, $IC_{50/2}$ e IC_{50} la actividad CAT disminuyeron quedando por debajo del control negativo sin FBS. Al comparar presencia y ausencia de factores de crecimiento, se pudo observar que la presencia de FBS tiene menos actividad CAT.

Las concentraciones más altas de AM empleadas se asemejaron a este control positivo en ausencia alguna de estrés, entendido éste como falta de factores de crecimiento en este caso (Figura 31A). La actividad catalasa en presencia de H_2O_2 incrementó significativamente con respecto a los controles.

La adición de AM provocó la disminución del incremento de la actividad de esta enzima, sólo en las concentraciones de AM de 10, 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$, llegando a un valor igual al obtenido en control positivo a las concentraciones de AM de 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$, contrarrestando así el efecto oxidante producido por el H_2O_2 .

Por el contrario, esta disminución no se vio a la dosis de 5 $\mu\text{g/mL}$, sino que aumentó dicha actividad con respecto al control positivo (Figura 31B). En el panel C de la figura 31, se observan los resultados obtenidos al utilizar SNP como agente oxidante.

La actividad catalasa en células A10 tratadas con SNP incrementó significativamente con respecto al control positivo (sin estresar), de modo que el SNP por sí mismo estresaba a las células a las que se les administraba este compuesto.

Por su parte, la adición de AM a concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ provocó un aumento de más del 50% en la actividad de la enzima, siendo mayor ésta a 5 $\mu\text{g/mL}$ de AM.

Finalmente, la adición de AM a concentraciones de 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$ sí produjo una reducción significativa de la actividad catalasa encontrada respecto a la actividad detectada con SNP (Figura 31C). Los resultados demuestran que aunque el AM disminuye

considerablemente la actividad CAT de manera dosis-dependiente, esta disminución en la actividad es mayor que la encontrada en las mismas células sin estresar (control positivo).

Los resultados de la actividad enzimática CAT en la línea celular B16-F10 frente a los distintos tratamientos de estrés celular empleados y respuesta del AM a ellos, se aprecian en la Figura 32.

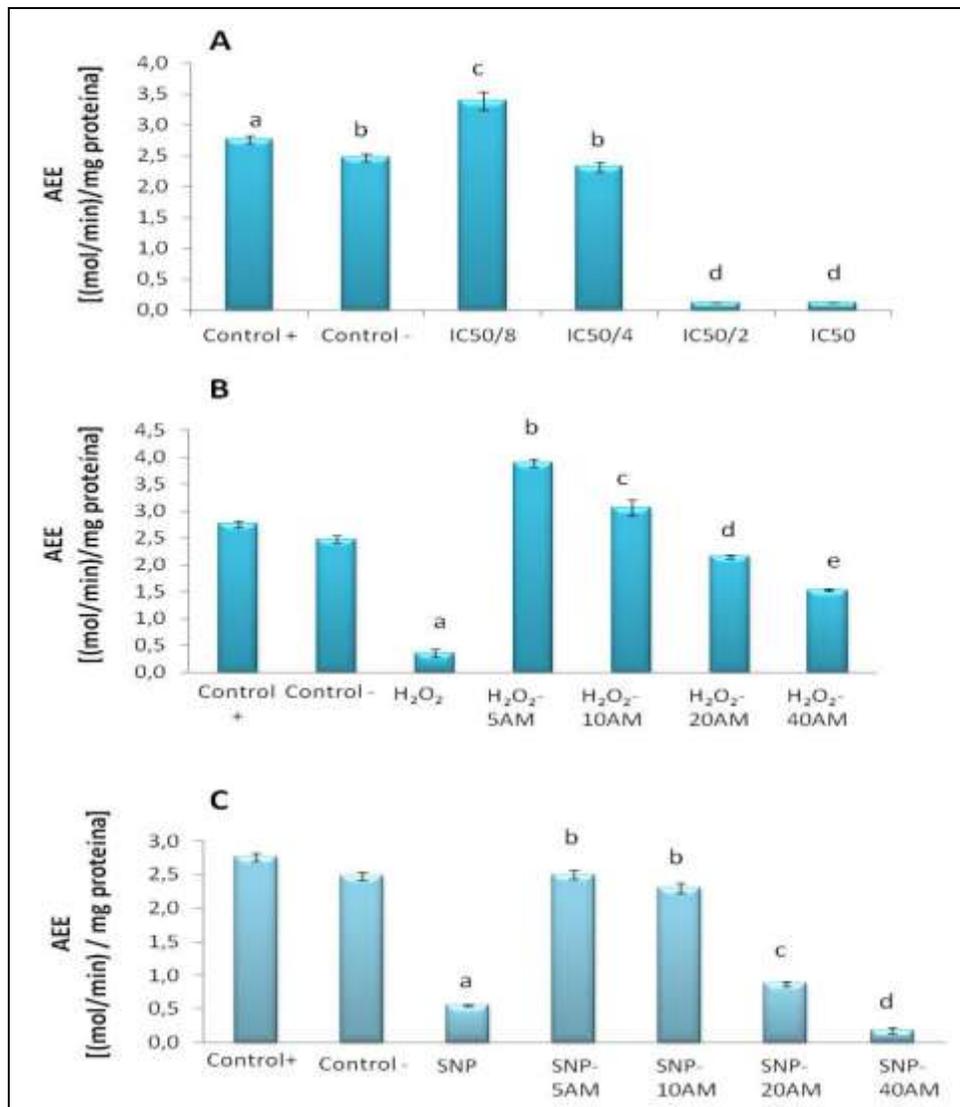


Figura 32. Actividad catalasa en B16-F10 para distintos tratamientos. (A) Tratamiento sin suero. (B) Peróxido de hidrógeno. (C) SNP. Los resultados se muestran como la media de 9 valores \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En un primer lugar, la actividad catalasa obtenida privando de FBS a las células, se representa en la Figura 32A. Se observa que la actividad CAT en ausencia de FBS disminuye significativamente con respecto al control positivo. Por otro lado, a medida que aumenta la concentración de AM se puede observar que la actividad enzimática disminuye de manera significativa.

Esta disminución de la actividad CAT dosis-dependiente de AM, a la concentración de $IC_{50/8}$ sigue siendo bastante alta, incluso por encima del control, aunque a medida que aumentamos la concentración de AM, disminuye considerablemente a las dosis de $IC_{50/2}$ y IC_{50} . De este modo, las concentraciones de $IC_{50/2}$ e IC_{50} disminuyeron la actividad CAT de tal forma que las dos últimas quedaron incluso por debajo del control negativo (Figura 32A).

La actividad catalasa en presencia de H_2O_2 disminuyó significativamente con respecto a los controles, observándose que el H_2O_2 no afecta a la actividad de esta enzima en células tumorales, B16-F10.

La adición de AM a todas las concentraciones administradas, provocó un incremento significativo de la actividad CAT, la cual fue disminuyendo progresivamente a las concentraciones más altas de AM empleadas (Figura 32B), esta disminución fue dosis-dependiente del AM.

Por otro lado, la actividad catalasa en presencia de SNP en las células B16-F10, mostró un comportamiento similar al obtenido con peróxido de hidrógeno, en donde, a priori, este compuesto no tiene efecto sobre la actividad enzimática CAT.

El AM produjo un aumento de esta actividad a las dosis de 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aunque esta última dosis empleada ya producía una disminución de la actividad con respecto a las dosis más bajas. Finalmente, la dosis más alta, de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, fue la que redujo la actividad CAT por debajo de los niveles del control (Figura 32C).

IV.4.3. Actividad glutatión peroxidasa (GPX)

Con objeto de estudiar el efecto antioxidante del AM sobre las líneas celulares ensayadas se evaluó la actividad enzimática GPX (Figura 33).

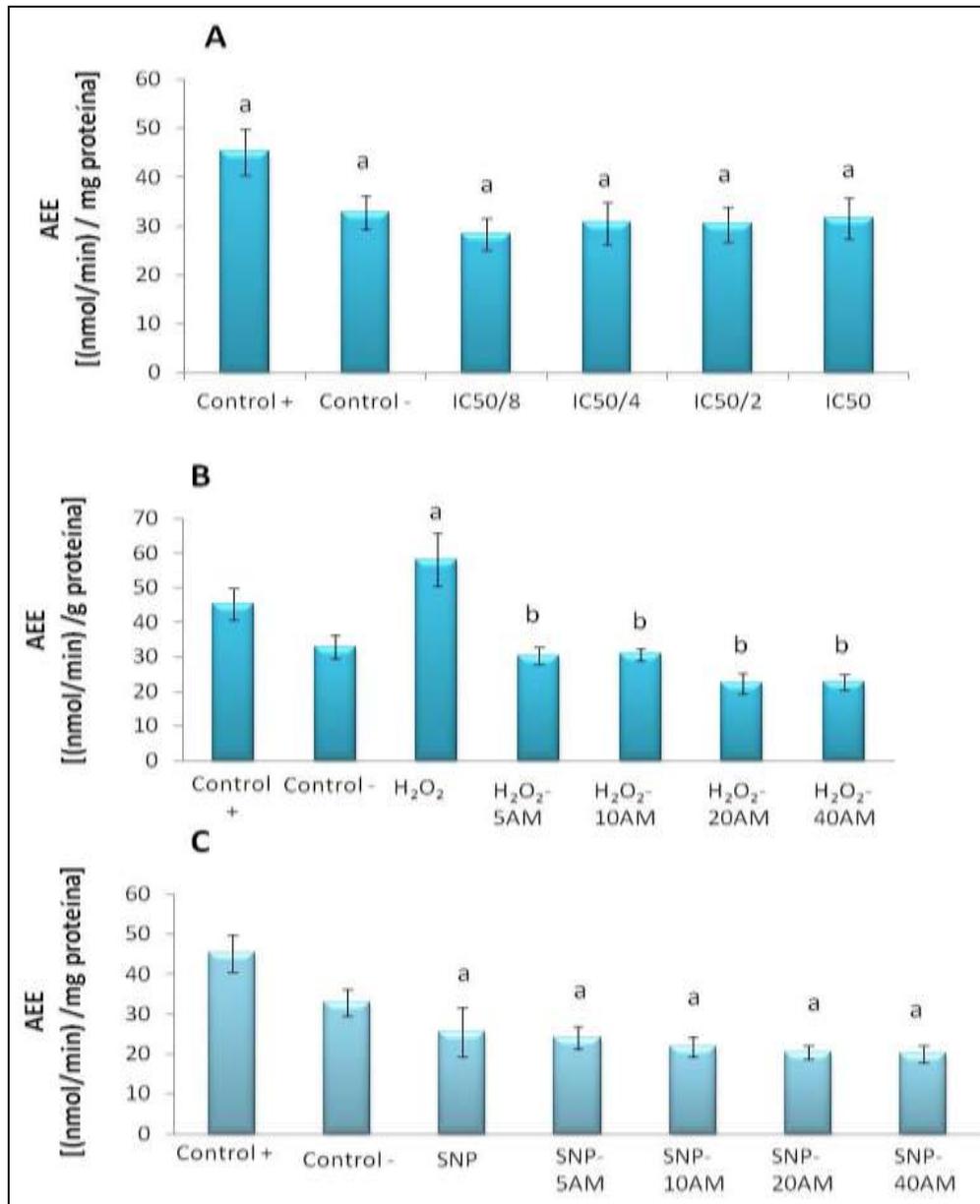


Figura 33. Actividad GPX en A10 para distintos tratamientos. (A) Tratamiento sin suero. (B) Peróxido de hidrógeno. (C) SNP. Los resultados se muestran como la media de 9 valores \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la Figura 33A se observa una disminución de la actividad GPX en las células A10 en ausencia de factores de crecimiento con respecto al control positivo. Sin embargo, esta disminución no resultó significativa.

La actividad enzimática GPX no mostró diferencias significativas con ninguna de las concentraciones de AM empleadas, de tal forma que este enzima no experimentó variaciones, ni en respuesta a la falta de factores de crecimiento, ni a la administración de las diferentes dosis de AM.

La actividad GPX encontrada en células normales A10, en presencia de H₂O₂, mostró un aumento respecto a los controles. La adición de AM provocó una disminución significativa de la actividad GPX respecto a la obtenida con solo H₂O₂, la cual no varió entre las concentraciones de AM usadas (Figura 33B).

Estas menores actividades enzimáticas encontradas para la GPX en presencia de AM disminuyeron de tal manera, que se equipararon al control positivo en donde las células no estaban modificadas, ni alteradas por ningún factor externo.

Por otro lado, la actividad GPX en presencia de SNP, no mostró variaciones con respecto a los controles. Por su parte, el AM no produjo cambios en dicha actividad, a ninguna de las concentraciones ensayadas.

Al observar los resultados, vemos que la tendencia a medida que aumentamos la concentración de AM es a disminuir la actividad de este enzima, pero las diferencias son tan pequeñas, que no llegan a ser significativas ni entre tratamientos de AM, ni con respecto al control (Figura 33C).

De este modo, los resultados encontrados sugieren que el AM no tiene efecto sobre la actividad enzimática GPX.

Las actividades GPX de las células B16-F10 en ausencia de factores de crecimiento se muestran en la Figura 34.

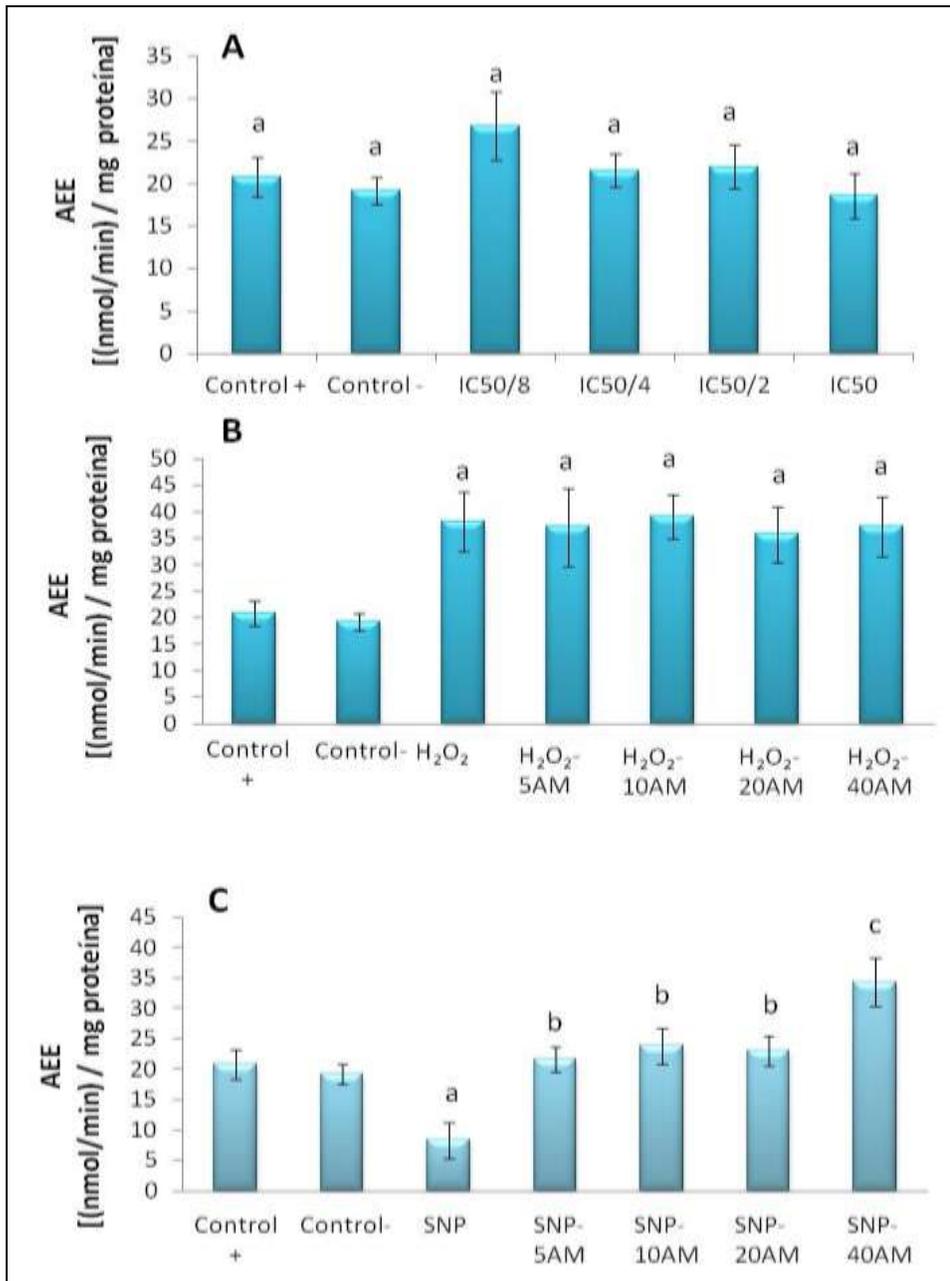


Figura 34. Actividad GPX en B16-F10 para distintos tratamientos. (A) Tratamiento sin suero. (B) Peróxido de hidrógeno. (C) SNP. Los resultados se muestran como la media de 9 valores \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Estos valores no mostraron diferencias significativas respecto al control positivo. La ausencia de FBS, por tanto, no produjo cambios en la actividad de este enzima. La actividad enzimática a concentraciones de AM de IC_{50/8}, IC_{50/4}, IC_{50/2} y IC₅₀ tampoco mostró

diferencias significativas respecto a los controles (Figura 34A). El AM no produjo cambios en la actividad GPX en estas condiciones.

En la Figura 34B, se muestran los resultados de actividad GPX en las células B16-F10, en condiciones estresantes en presencia de H_2O_2 . Los resultados muestran que ni el H_2O_2 , ni el AM producen cambio en la actividad enzimática de este enzima.

En la Figura 34C observamos los resultados obtenidos para la actividad GPX, cuando el agente estresante era el SNP. El SNP provocó una disminución en la actividad GPX con respecto a los controles. Por el contrario, el AM aumentó esta actividad, comparada con el control de SNP.

Este aumento se mantuvo estable para las dosis de 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$, y a la concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$ aumentó aún más de manera significativa con respecto al resto de dosis de AM empleadas. Si comparamos los resultados obtenidos con respecto al control positivo, vemos que para las dosis de 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de AM no hubo diferencias, pero sí se encontraron a la concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$, superando ésta última, a la actividad encontrada en el control positivo.

IV.4.4. Actividad glutatión reductasa (GR)

El efecto del AM sobre la actividad GR en la línea celular normal A10 se observa en la Figura 35.

Se observa que la actividad GR de las células A10 en ausencia de FBS, no muestra diferencias significativas respecto al control positivo. Por su parte, se observan disminuciones significativas y progresivas en los tratamientos a distintas concentraciones de AM.

Las concentraciones de $IC_{50/4}$, $IC_{50/2}$ e IC_{50} disminuyeron quedando incluso por debajo del control negativo, pero a la concentración $IC_{50/8}$ de AM no se vieron diferencias significativas con respecto al control positivo (Figura 35A).

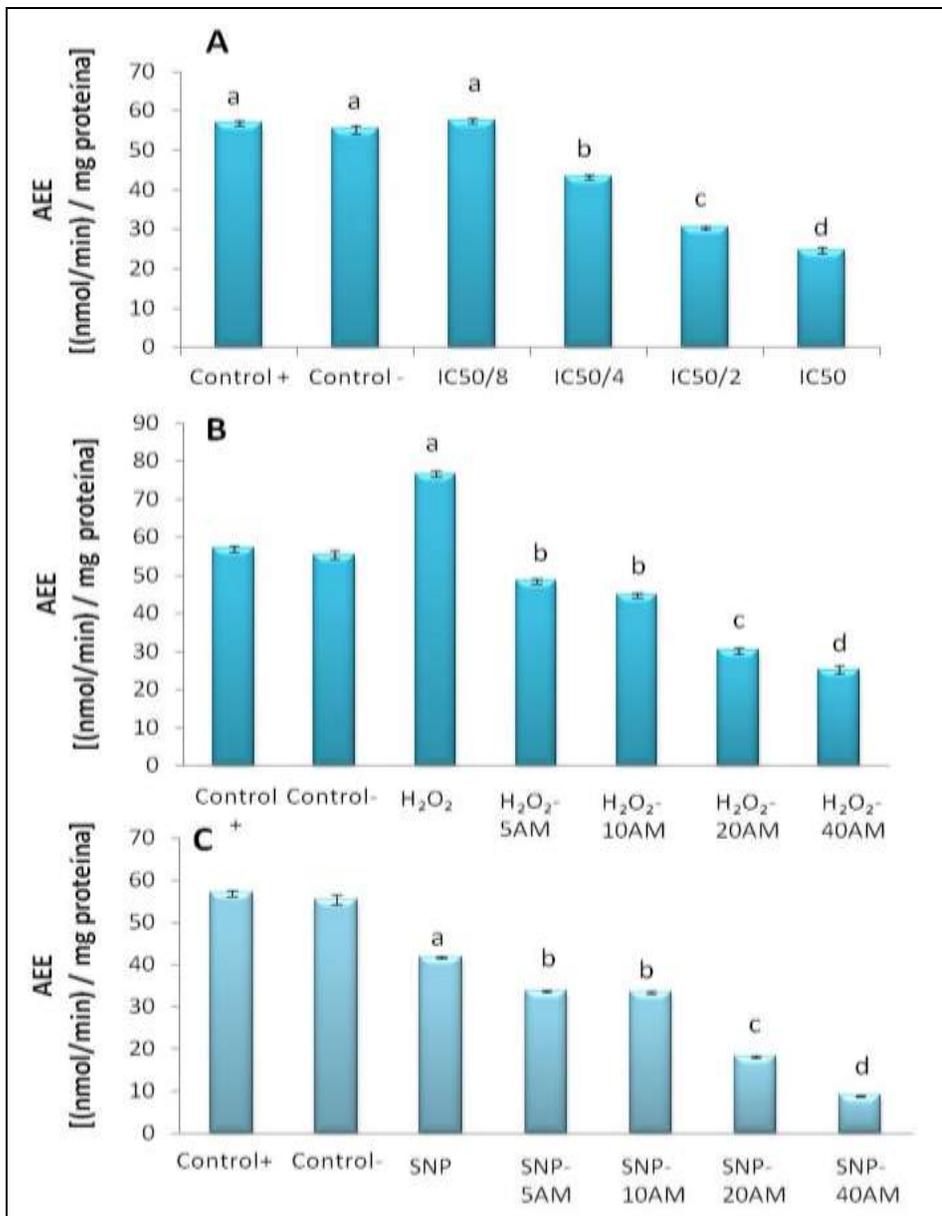


Figura 35. Actividad GR en A10 para distintos tratamientos. (A) Tratamiento sin suero. (B) Peróxido de hidrógeno. (C) SNP. Los resultados se muestran como la media de 9 valores \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La actividad GR en presencia de H₂O₂ aumentó significativamente respecto a los controles. La adición de AM a todas las concentraciones provocó una disminución significativa y progresiva de la actividad GR respecto a la actividad obtenida después de

añadir solo H_2O_2 , quedando cercana de la actividad obtenida en el control positivo a las dosis de $IC_{50/4}$ y $IC_{50/8}$ contrarrestando así el efecto oxidante producido por el H_2O_2 (Figura 35B).

Los resultados de actividad GR en presencia de SNP en las células A10 se muestran en la Figura 35C. Esta actividad mostró una disminución, en presencia de SNP, respecto a los controles. Por su parte, los tratamientos a distintas concentraciones de AM indicaron un comportamiento similar al obtenido con los tratamientos de AM en peróxido de hidrógeno como agente oxidante, disminuyendo esta actividad a medida que se aumentaba la dosis de AM.

El estudio de la actividad GR privando a las células B16-F10 de los factores de crecimiento (FBS) no mostró diferencia significativa alguna. A medida que se aumenta la concentración de AM se observa que la actividad enzimática disminuye de manera significativa, excepto a la concentración de $IC_{50/2}$, donde ocurre un nuevo incremento de la actividad igual a la encontrada en el control positivo, en donde la célula no estaba sometida a ningún tipo de estrés (Figura 36A).

Por otra parte, la actividad GR en presencia de H_2O_2 se vio disminuida significativamente con respecto a los controles, es decir, el H_2O_2 no provocó ningún aumento en la actividad de este enzima. La adición de AM provocó una disminución aún mayor en la actividad de la GR. Estas diferencias se pudieron observar a todas las concentraciones de AM empleadas y los valores obtenidos eran menores significativamente que los encontrados en presencia de H_2O_2 (Figura 36B). El aumento de esta actividad GR en el control, puede atribuirse a la propia defensa antioxidante celular.

En el panel C de la Figura 36, se pueden observar los resultados obtenidos al utilizar SNP como agente oxidante. La actividad GR en células A10 produjo disminuciones significativas con respecto al control positivo. Los tratamientos con AM mostraron disminuciones progresivas de la actividad GR al aumentar las concentraciones de AM

(Figura 36). La disminución en la actividad GR a cada una de las concentraciones de AM estudiadas resultó ser significativa entre ellas.

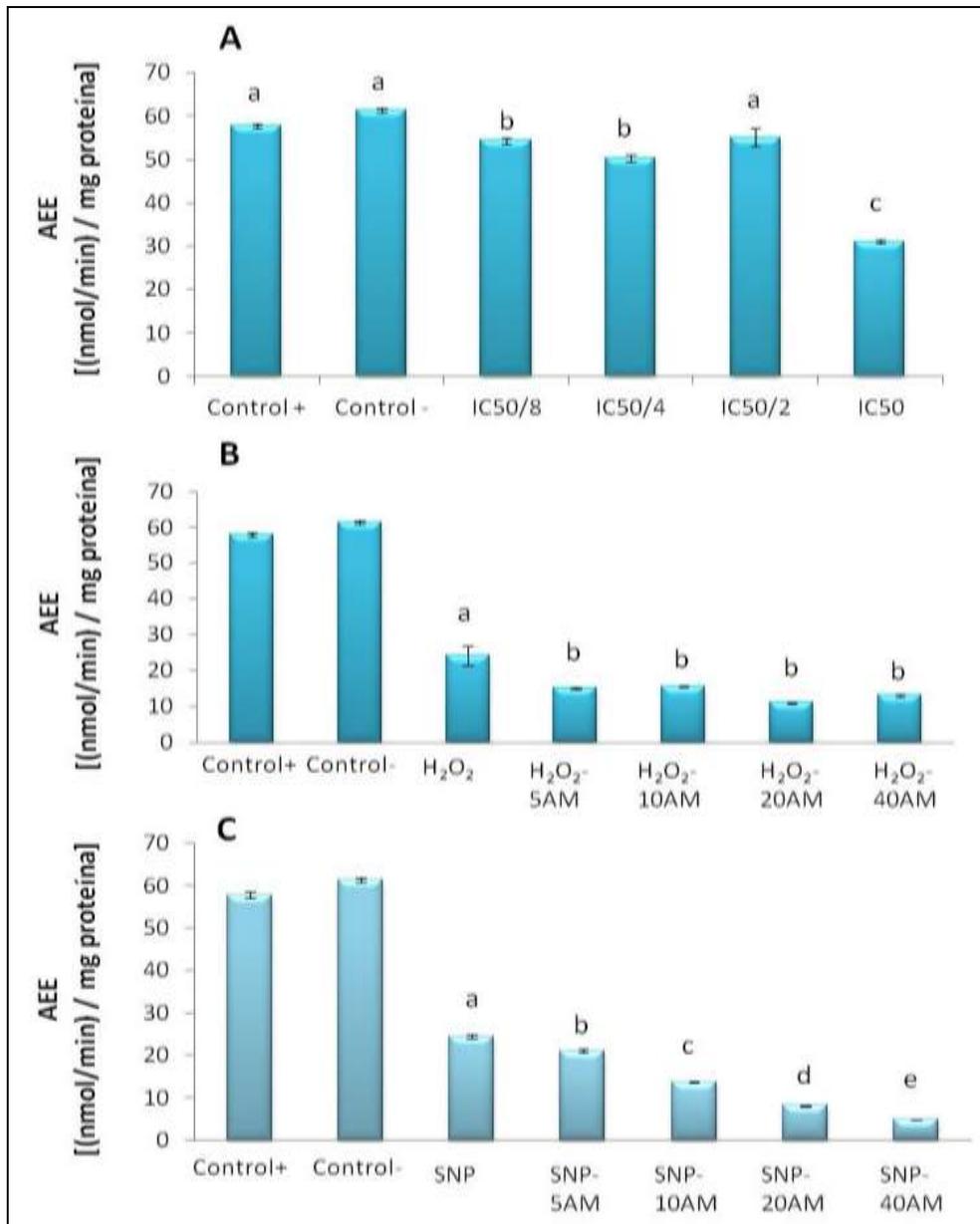


Figura 36. Actividad GR en B16-F10 para distintos tratamientos. (A) Tratamiento sin suero. (B) Peróxido de hidrógeno. (C) SNP. Los resultados se muestran como la media de 9 valores \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

IV.4.5. Actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)

La enzima G6PDH también guarda relación con la defensa antioxidante. Los resultados de la actividad de este enzima medida en nuestras condiciones experimentales, pueden observarse en la Figura 37.

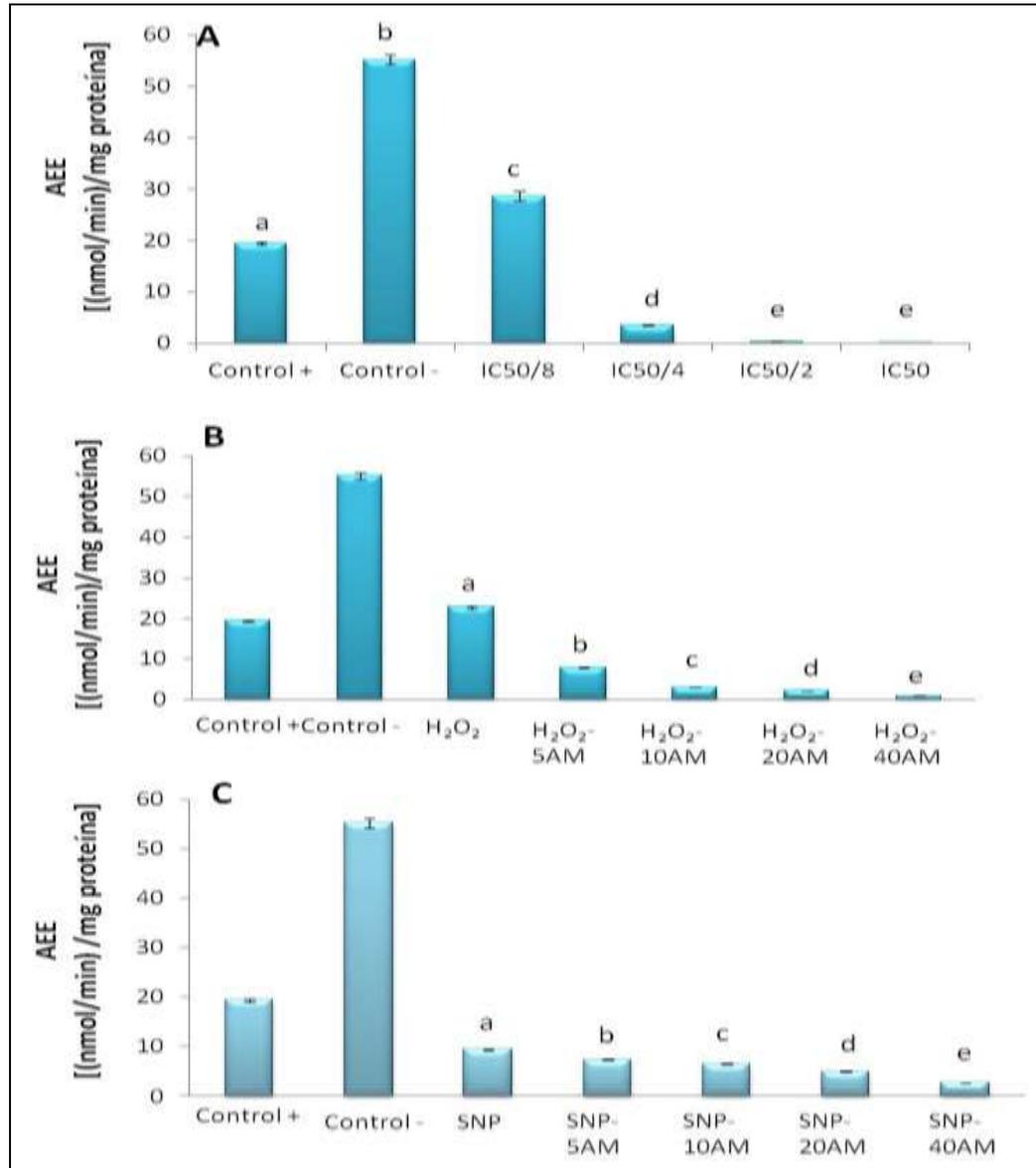


Figura 37. Actividad G6PDH en A10 para distintos tratamientos. (A) Tratamiento sin suero. (B) Peróxido de hidrógeno. (C) SNP. Los resultados se muestran como la media de 9 valores \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La actividad G6PDH de las células A10 en ausencia de FBS, muestra un aumento significativo respecto al control positivo, es decir, la ausencia de los factores de crecimiento estimuló la actividad de este enzima.

A partir de la adición de AM, se observan disminuciones significativas y progresivas de la actividad enzimática. Las concentraciones de $IC_{50/4}$, $IC_{50/2}$ e IC_{50} disminuyeron quedando incluso por debajo del control positivo, pero a la concentración de $IC_{50/8}$ la disminución no fue inferior al control positivo (Figura 37A).

En la Figura 37B, se observa la actividad G6PDH en esta misma línea celular, pero cuando el agente oxidante es el H_2O_2 . Los resultados muestran que la actividad G6PDH en presencia de H_2O_2 aumentó ligeramente respecto al control positivo, llegando a ser significativa esa diferencia encontrada.

La adición de AM, por su parte, a todas las concentraciones provocó una disminución significativa y progresiva en función de la dosis de la actividad G6PDH (Figura 37B).

La actividad G6PDH en presencia de SNP en las células A10, mostró una disminución respecto a los controles. Por su parte, los tratamientos a distintas concentraciones de AM indicaron un comportamiento similar al obtenido en los tratamientos de AM en peróxido de hidrógeno como agente oxidante, mostrándose una disminución en la actividad de este enzima a todas las dosis de AM y con un claro efecto dosis-dependiente en esta disminución (Figura 37C).

Se observa que los resultados en la actividad G6PDH de las células B16-F10 en ausencia de FBS, experimentan un aumento significativo respecto al control positivo. Por su parte, se observan disminuciones significativas y progresivas en los tratamientos a distintas concentraciones de AM. Las concentraciones de $IC_{50/4}$, $IC_{50/2}$ e IC_{50} disminuyeron quedando incluso por debajo del control negativo. Estas diferencias no se observaron a la concentración de $IC_{50/8}$, la cual no mostró diferencias con respecto al control negativo (Figura 38A).

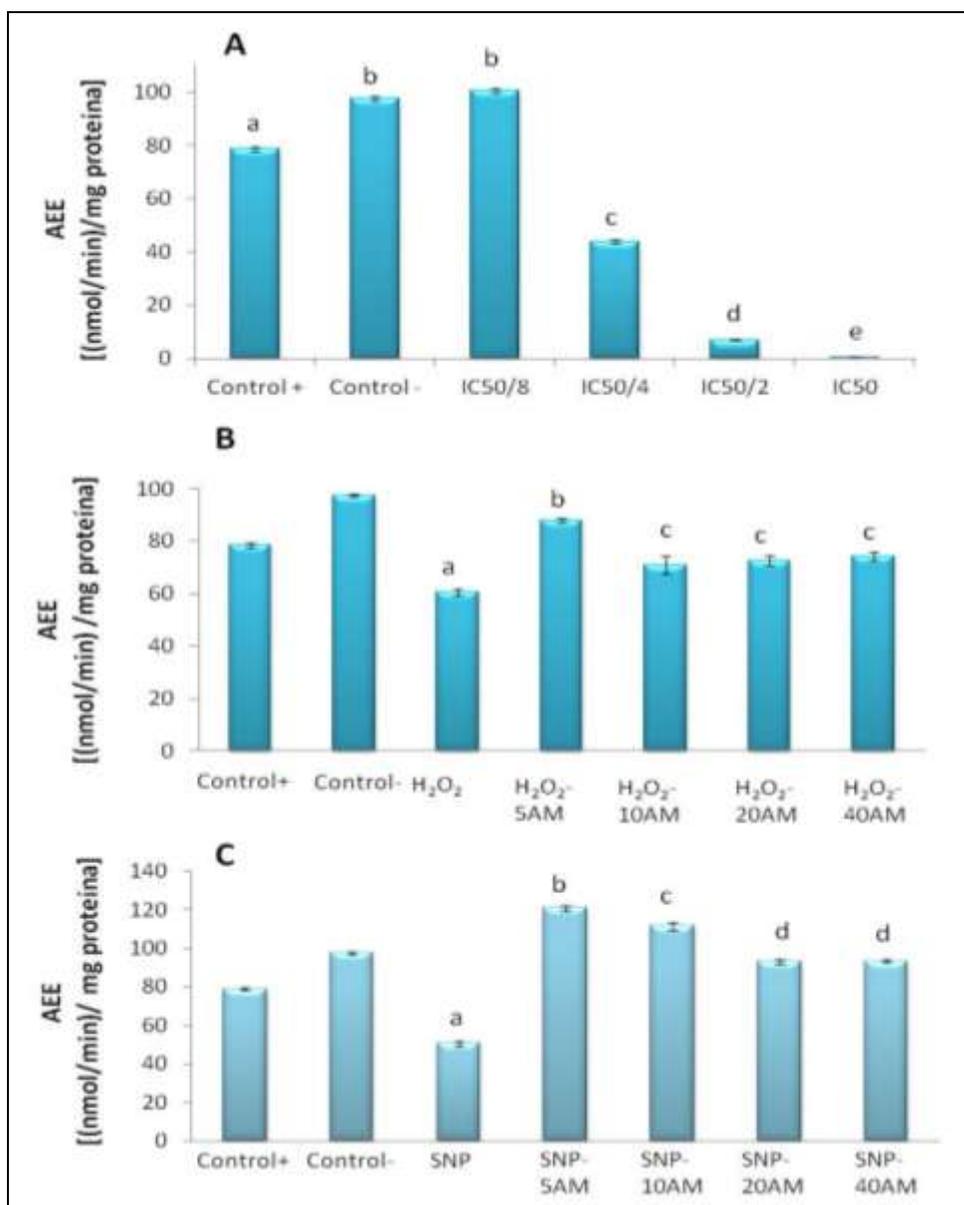


Figura 38. A. Actividad G6PDH en B16-F10 para distintos tratamientos. (A) Tratamiento sin suero. (B) Peróxido de hidrógeno. (C) SNP. Los resultados se muestran como la media de 9 valores \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La actividad G6PDH en presencia de H₂O₂ disminuyó significativamente respecto a los controles. La adición de AM a la concentración de 5 μ g/mL produjo un aumento significativo de la actividad enzimática mayor al tratamiento con solo H₂O₂. Esta

concentración de AM no fue suficiente para disminuir la actividad G6PDH ocasionada por el H₂O₂. Sin embargo, concentraciones mayores de AM mostraron una reducción respecto a la concentración de AM de 5 µg/mL, y respecto al control positivo (Figura 38B).

La actividad G6PDH en presencia de SNP en las células B16-F10, mostró una disminución respecto a los controles. Por su parte, en los tratamientos con AM se mostró un aumento significativo de la actividad enzimática a una concentración de 5 µg/mL, con la posterior reducción progresiva esta actividad a concentraciones mayores de AM. Todos los tratamientos con AM presentaron mayor actividad, con respecto al tratamiento de solo SNP y con respecto al control positivo (Figura 38C).

IV.4.6. Actividad glutatión S-Transferasa (GST)

Finalmente, también se estudió la actividad del enzima Glutatión S-Transferasa (Figura 39).

La actividad GST de las células A10 en ausencia de FBS, indicó una reducción significativa respecto al control positivo. Con la adición de AM, en la concentración de IC₅₀, no se observaron diferencias significativas de la actividad enzimática. Las concentraciones de IC_{50/4}, IC_{50/2} y IC₅₀ disminuyeron quedando incluso por debajo del control positivo (Figura 39A).

Se observa que la actividad GST en presencia de H₂O₂ aumentó significativamente respecto a los controles. La adición de AM en todas las concentraciones provocó una disminución significativa y progresiva de la actividad GST enzimática (Figura 39B).

Por su parte, la actividad GST en presencia de SNP en las células A10 mostró un comportamiento similar al obtenido con H₂O₂ como agente oxidante. Esto se observó, tanto para los tratamientos con AM como para los tratamientos sin AM (Figura 39C).

Se estudió la actividad de la enzima GST en células B16-F10, privando a éstas de los factores de crecimiento (FBS).

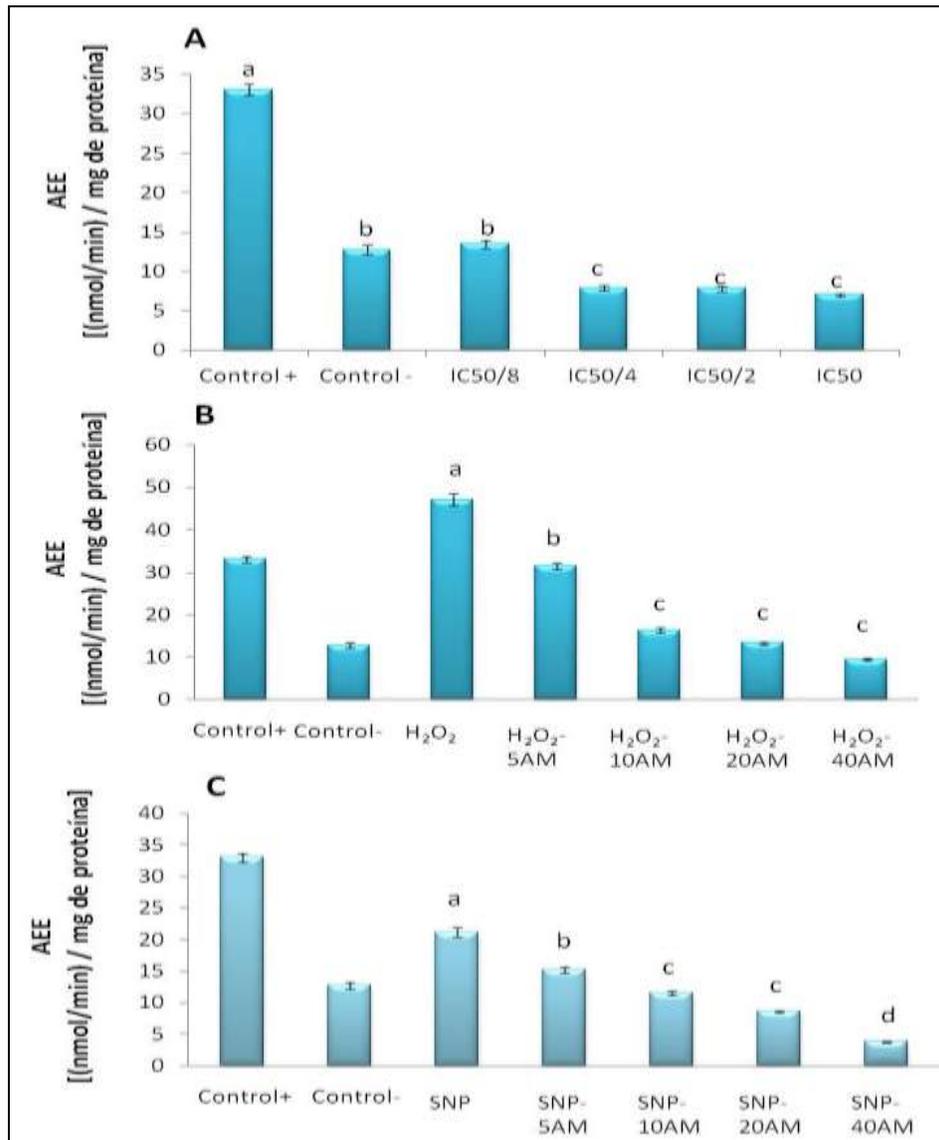


Figura 39. Actividad GST en A10 para distintos tratamientos. (A) Tratamiento sin suero. (B) Peróxido de hidrógeno. (C) SNP. Los resultados se muestran como la media de 9 valores \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En primer lugar, la ausencia de FBS mostró un aumento significativo de la actividad con respecto al control positivo. A medida que aumentó la concentración de AM se observó que la actividad enzimática disminuyó de forma significativa y progresiva, contrarrestando a la actividad oxidante producida por la falta de suero (Figura 40A).

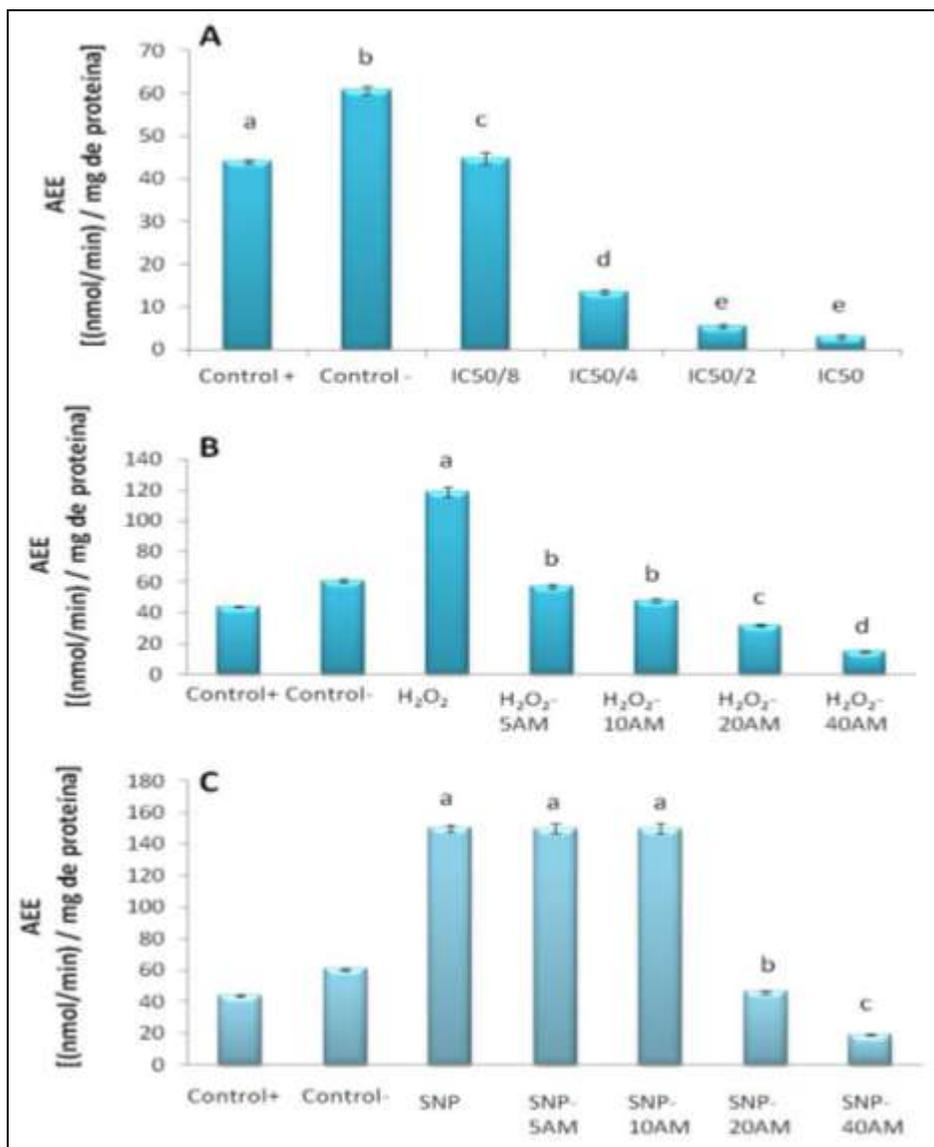


Figura 40. Actividad GST en B16-F10 para distintos tratamientos. (A) Tratamiento sin suero. (B) Peróxido de hidrógeno. (C) SNP. Los resultados se muestran como la media de 9 valores \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por otra parte, la actividad GST en presencia de H₂O₂ mostró un incremento con respecto a los controles. La adición de AM provocó la disminución del incremento de la actividad de la GST, contrarrestando así el efecto oxidante producido por el H₂O₂. Estas diferencias se pudieron observar a todas las concentraciones de AM empleadas,

quedando los valores de la actividad cercanas del control positivo a las concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y por debajo del mismo control a las dosis de 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 40B).

En el panel C de la Figura 40, se encuentran los resultados obtenidos al utilizar SNP como agente oxidante. La actividad GST en células B16-F10 aumentó significativamente con respecto al control. Las concentraciones de AM de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, no produjeron diferencias respecto al resultado anterior con SNP, de hecho, los resultados obtenidos a estas concentraciones para la actividad GST resultaron estar por encima de los valores controles. Sin embargo, las concentraciones de AM de 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mostraron una reducción significativa de la actividad de la enzima, contrarrestando el efecto oxidante del SNP (Figura 40C).

IV.5. Determinación de los niveles de expresión de proteínas por “Western blotting”

IV.5.1. Niveles de expresión de superóxido dismutasa (SOD)

Mediante el análisis realizado por western blotting, se hallaron los niveles de expresión proteica de las enzimas relacionadas con la defensa antioxidante. En la Figura 41, se observan los resultados de expresión de SOD para la línea celular A10 en respuesta a las diferentes condiciones de estrés estudiadas en este trabajo.

Estos resultados pusieron de manifiesto que la expresión de SOD en células A10 disminuye cuando el agente oxidante es la ausencia de suero; este efecto se vio cuando se comparaba con respecto al control positivo (con suero). Sin embargo, la expresión de SOD aumentó a medida que disminuyó la concentración de AM.

Este aumento de la expresión fue significativo a las concentraciones de AM de $\text{IC}_{50/8}$ e $\text{IC}_{50/4}$ (Figura 41A). Asimismo, los resultados demuestran que la mayor expresión de SOD encontrada fue a las dosis más bajas de AM, en donde el aumento superaba incluso a la expresión determinada en el control positivo. Este aumento no se vio a la dosis de IC_{50} , en donde la expresión fue igual que la encontrada en el control. Finalmente, los resultados

de expresión de SOD en ausencia de FBS disminuyen a medida que aumentamos las dosis de AM.

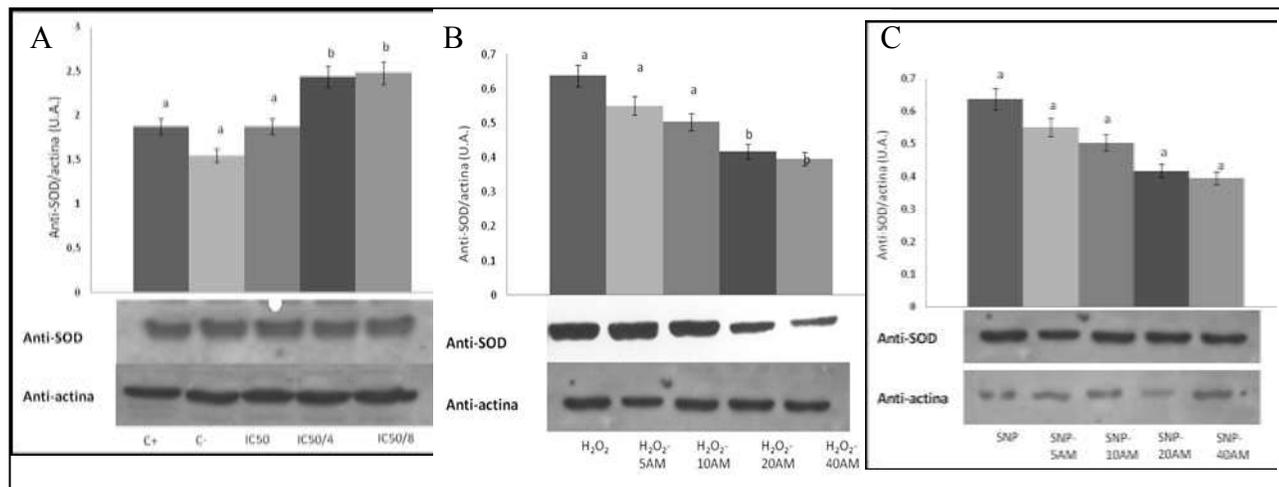


Figura 41. Niveles de expresión de SOD en A10 para distintos tratamientos. (A) Tratamiento sin FBS 24 h y adición de AM a las dosis de IC₅₀; IC_{50/4} y IC_{50/8} 24 h. (B) Tratamiento de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a una concentración de 150 µM 3 h y adición de AM a las dosis de 5, 10, 20 y 40 µg/mL 24 h. (C) Tratamiento de nitroprusiato sódico (SNP) a una concentración de 200 µM 3 h y adición de AM a las dosis de 5, 10, 20 y 40 µg/mL 24 h. Los resultados se muestran como la media de 3 valores ± SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05).

Los niveles de expresión de SOD en las células A10, mostraron una disminución cuando el agente estresante es el peróxido de hidrógeno sumado a la acción del AM. A dosis bajas de AM, las diferencias de expresión no resultaron ser significativas, con respecto a la acción del H₂O₂ solo. Sin embargo, a dosis más altas (20 y 40 µg/mL) se observó una reducción significativa de la expresión de esta enzima (Figura 41B).

Estos resultados coinciden con el comportamiento obtenido en la actividad enzimática para este mismo enzima (Figura 29B).

Por otro lado, el ácido maslínico, a ninguna de las dosis administradas a las células A10, no provocó cambios significativos en la expresión de SOD, cuando el agente estresante es el nitroprusiato de sodio, aunque, la tendencia observada fue la reducción de los niveles de SOD a medida que aumenta la concentración de AM (Figura 41C).

En la Figura 42, se observan los resultados de expresión de SOD encontrados en la línea celular tumoral B16-F10.

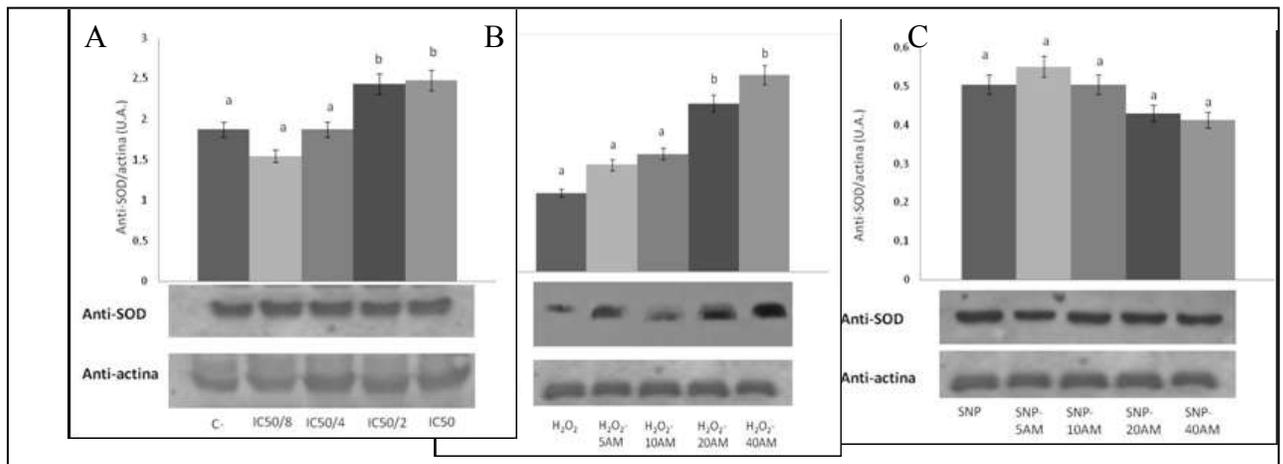


Figura 42. Niveles de expresión de SOD en B16-F10 para distintos tratamientos. (A) Tratamiento sin FBS 24 h y adición de AM a las dosis de IC₅₀; IC_{50/2}; IC_{50/4} y IC_{50/8} 24 h. (B) Tratamiento de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a una concentración de 150 μM 3 h y adición de AM a las dosis de 5, 10, 20 y 40 μg/mL 24 h. (C) Tratamiento de nitropusiató sódico (SNP) a una concentración de 200 μM 3 h y adición de AM a las dosis de 5, 10, 20 y 40 μg/mL 24 h. Los resultados se muestran como la media de 3 valores ± SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05).

Se observó que el AM aumenta la expresión de SOD de las células B16-F10 cuando el agente oxidante/estresante es la ausencia de factores de crecimiento. Sin embargo, no existen diferencias significativas a las dosis más bajas de AM ensayadas (IC_{50/8} y IC_{50/4}).

A dosis más altas (IC_{50/2} y IC₅₀), el AM aumentó significativamente la expresión de esta enzima (Figura 42A). Estos resultados muestran un comportamiento similar a los obtenidos con la actividad enzimática de SOD en ausencia de FBS (Figura 30A).

En el panel B de la Figura 42 se observa un aumento progresivo de los niveles de expresión de SOD en las células B16-F10 cuando el agente estresante es el peróxido de hidrógeno sumado a la acción del AM. A dosis bajas de AM, las diferencias de expresión no resultaron ser significativas, con respecto a la acción del H₂O₂ sólo. A dosis más altas

(20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se observó un aumento significativo en la expresión de este enzima (Figura 42B).

El ácido maslínico, por su parte, no provocó cambios significativos en la expresión de SOD, cuando el agente estresante es el Nitroprusiato de sodio. La tendencia observada fue la reducción de los niveles de SOD a dosis más alta de AM, pero estos cambios no fueron suficientes para alcanzar la significación (Figura 42C).

Estos resultados encontrados indican un comportamiento diferente al obtenido con SNP en esta misma actividad enzimática (Figura 30C).

IV.5.2. Niveles de expresión de catalasa (CAT)

Los resultados de expresión, por western blot, de CAT para la línea celular normal A10 se encuentran en la Figura 43.

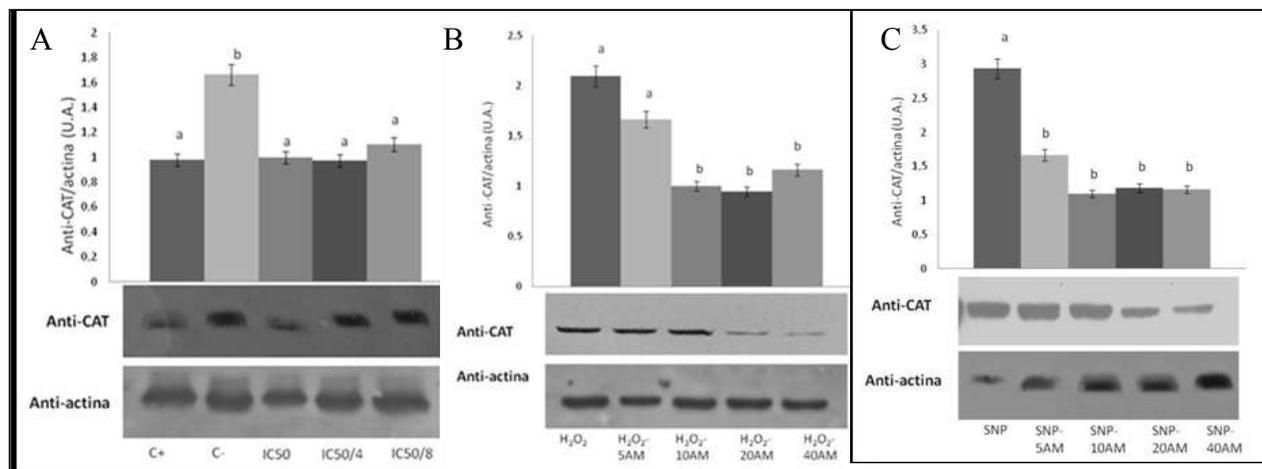


Figura 43. Niveles de expresión de CAT en A10 para distintos tratamientos. . (A) Tratamiento sin FBS 24 h y adición de AM a las dosis de IC_{50} ; $\text{IC}_{50/4}$ y $\text{IC}_{50/8}$ 24 h. (B) Tratamiento de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a una concentración de $150 \mu\text{M}$ 3 h y adición de AM a las dosis de 5, 10, 20 y $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 24 h. (C) Tratamiento de nitroprusiato sódico (SNP) a una concentración de $200 \mu\text{M}$ 3 h y adición de AM a las dosis de 5, 10, 20 y $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 24 h. Los resultados se muestran como la media de 3 valores \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los resultados encontrados por la expresión de CAT en A10, muestran un aumento significativo de la expresión de este enzima, cuando el agente oxidante es la ausencia de suero con respecto al control positivo. Se observa una disminución de la expresión de CAT respecto a la condición estresante con falta de factores de crecimiento al añadir AM, y esto se observó en todas las concentraciones estudiadas del mismo (Figura 43A).

Los resultados de la expresión de CAT no mostraron diferencias en cuanto al efecto concentración de AM, sino que éste compuesto independientemente de la dosis administrada disminuía la actividad CAT. La expresión que observamos en todas las concentraciones de AM para este enzima, no presentan diferencias con el control positivo, en donde las células no están sujetas a ninguna situación de estrés ocasionada (Figura 31A).

Los niveles de expresión de CAT en las células A10 aumentaron en presencia de H₂O₂. Asimismo, mostraron una disminución cuando el agente estresante es el peróxido de hidrógeno sumado a la acción del AM. A dosis bajas de AM (5 µg/mL), las diferencias de expresión no resultaron ser significativas, con respecto a los resultados observados para la actividad en presencia de H₂O₂ solo.

Sin embargo, a dosis más altas (10, 20 y 40 µg/mL), se observó una reducción significativa de la expresión de la proteína CAT (Figura 43B). Estos resultados coinciden con el comportamiento obtenido en la actividad enzimática, en los tratamientos con presencia de AM (Figura 31B).

El ácido maslínico provocó una reducción significativa de la expresión de CAT, la cual se mantuvo estable a cualquiera de las concentraciones estudiadas, en relación y con respecto a la expresión encontrada en respuesta a la acción del SNP sólo. (Figura 43C). Los resultados de la expresión de CAT en los tratamientos con SNP, no coincidieron totalmente con los obtenidos encontrados en la actividad a la dosis de 5 µg/mL. En el resto de concentraciones empleadas de AM, actividad y expresión se corroboran (Figura 31C).

Para la línea celular B16-F10 se encontró que la expresión de CAT no cambió significativamente en ausencia de factores de crecimiento al añadir concentraciones bajas de AM. Sin embargo, a concentraciones más elevadas de AM ($IC_{50/2}$ y IC_{50}) aumentó significativamente la expresión de CAT, y estos valores detectados superaron los valores encontrados en las células controles (Figura 44A). Los resultados de la expresión de CAT no coincidieron con los que obtuvimos para la actividad enzimática en estas mismas condiciones (Figura 32A).

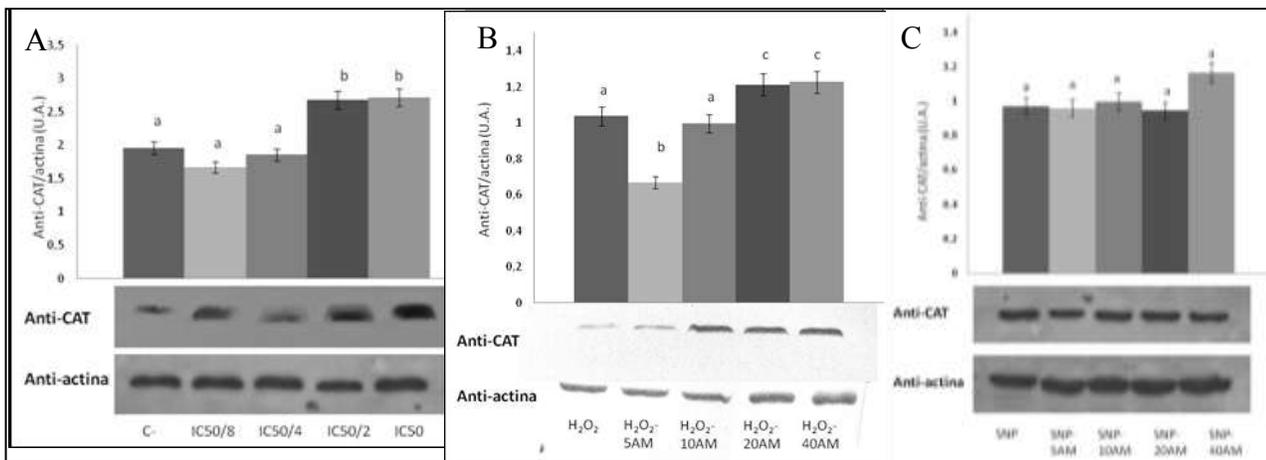


Figura 44. Niveles de expresión de CAT en B16-F10 para distintos tratamientos. . (A) Tratamiento sin FBS 24 h y adición de AM a las dosis de IC_{50} ; $IC_{50/2}$; $IC_{50/4}$ y $IC_{50/8}$ 24 h. (B) Tratamiento de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a una concentración de $150 \mu M$ 3 h y adición de AM a las dosis de 5, 10, 20 y $40 \mu g/mL$ 24 h. (C) Tratamiento de nitrosuato sódico (SNP) a una concentración de $200 \mu M$ 3 h y adición de AM a las dosis de 5, 10, 20 y $40 \mu g/mL$ 24 h. Los resultados se muestran como la media de 3 valores \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los niveles de expresión de CAT en las células B16-F10, mostraron una disminución significativa inicial cuando el agente estresante es el peróxido de hidrógeno sumado a la acción del AM a dosis bajas ($5 \mu g/mL$) con respecto a la acción del H_2O_2 únicamente. Posteriormente, se observa un aumento significativo de la actividad expresión CAT a dosis más altas de AM (10, 20 y $40 \mu g/mL$) (Figura 44B).

El aumento es tal que a las concentraciones de 20 y 40 se supera la expresión encontrada en el control. Estos resultados no coinciden los obtenidos con la actividad enzimática (Figura 32B).

En los tratamientos con SNP, el ácido maslínico no provocó un cambio significativo de la expresión de CAT respecto a la acción del SNP (Figura 44C), de tal manera, que el SNP no produjo como tal estrés celular en esta línea. La adición de AM no produjo cambios en la expresión de este enzima, siendo la misma independientemente de la dosis de AM ensayada (Figura 32C).

IV.5.3. Niveles de expresión de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)

En la Figura 45, se observan los resultados de expresión de la enzima G6PDH para la línea celular A10. El ácido maslínico provocó reducciones significativas en la expresión de G6PDH.

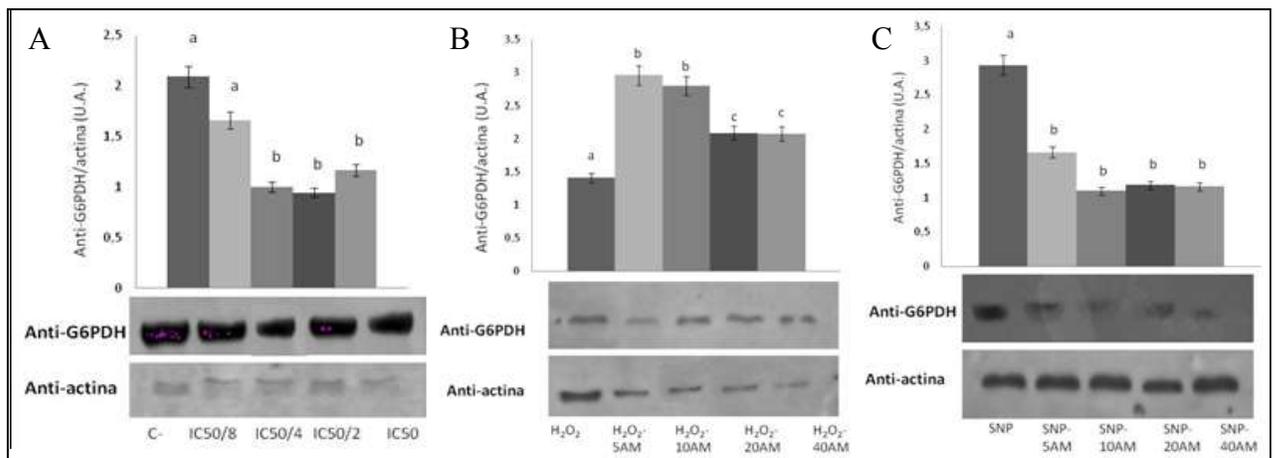


Figura 45. Niveles de expresión de G6PDH en A10 para distintos tratamientos. . (A) Tratamiento sin FBS 24 h y adición de AM a las dosis de IC₅₀; IC_{50/2}; IC_{50/4} y IC_{50/8} 24 h. (B) Tratamiento de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a una concentración de 150 µM 3 h y adición de AM a las dosis de 5, 10, 20 y 40 µg/mL 24 h. (C) Tratamiento de nitropusiato sódico (SNP) a una concentración de 200 µM 3 h y adición de AM a las dosis de 5, 10, 20 y 40 µg/mL 24 h. Los resultados se muestran como la media de 3 valores ± SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05).

Se encontró que la expresión de G6PDH en las células A10 disminuye cuando el agente oxidante es la ausencia de suero y es añadido ácido maslínico. A dosis bajas de AM (IC_{50/8}) la disminución de la expresión no resulta significativa, sin embargo a dosis más elevadas

($IC_{50/4}$, $IC_{50/2}$ e IC_{50}) si lo es (Figura 45A), siendo esta reducción del doble con respecto al valor control sin factores de crecimiento. Los resultados de la expresión de G6PDH se corresponden con los obtenidos con la actividad enzimática (Figura 37A).

Los niveles de expresión de G6PDH en las células A10, mostraron un aumento significativo cuando el agente estresante es el peróxido de hidrógeno sumado a la acción del AM. A dosis bajas de AM (5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), el aumento resultó ser mayor que a dosis más elevadas (20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 45B). Estos resultados no coinciden con el comportamiento obtenido en la actividad enzimática (Figura 37B).

Cuando el agente estresante es el Nitroprusiato de sodio (Figura 45C). El AM no mostró variaciones en la expresión del enzima en cuanto a las diferencias de dosis se emplearon, es decir, a todas ellas, se produjo una disminución en la expresión del enzima comparada con la condición más estresante, SNP.

Los resultados de la expresión de G6PDH en los tratamientos con SNP, presentaron un comportamiento similar al obtenido con la actividad enzimática (Figura 37C).

En la línea celular B16-F10 se encontró que la expresión de G6PDH aumentó significativamente en ausencia de FBS y presencia de AM. Sin embargo, este comportamiento disminuyó al añadir concentraciones más elevadas de AM ($IC_{50/2}$ e IC_{50}), aunque los cambios producidos no fueron significativos para las diferentes dosis de AM (Figura 46A).

Los resultados de la expresión de G6PDH mostraron un comportamiento similar a los obtenidos con la actividad enzimática para esta condición (Figura 38A).

Los niveles de expresión de G6PDH en las células B16-F10, mostraron una disminución inicial cuando el agente estresante es el H_2O_2 sumado a la acción del AM a dosis bajas (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con respecto a la acción del H_2O_2 únicamente.

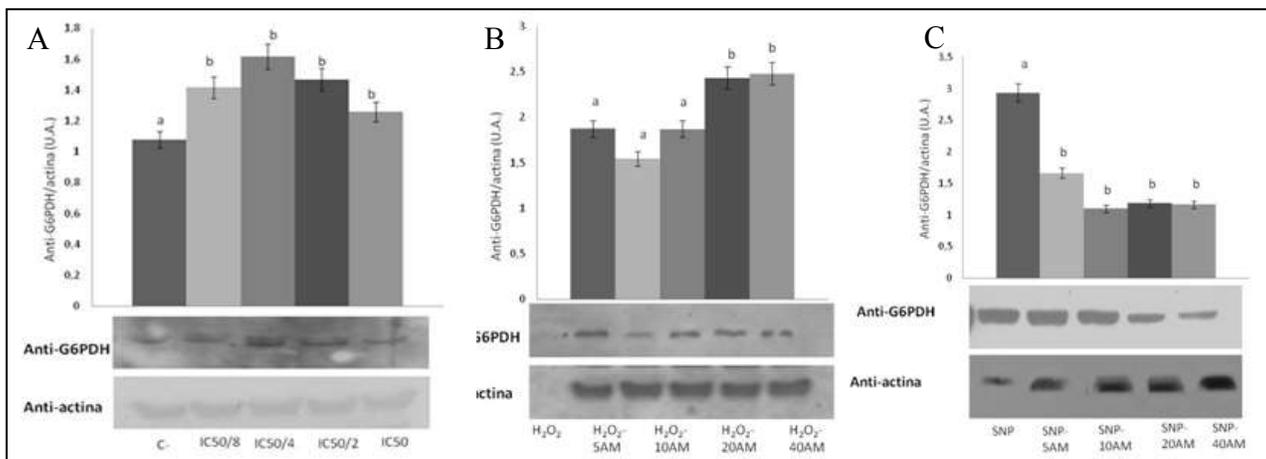


Figura 46. Niveles de expresión de G6PDH en B16-F10 para distintos tratamientos. . (A) Tratamiento sin FBS 24 h y adición de AM a las dosis de IC₅₀; IC_{50/2}; IC_{50/4} y IC_{50/8} 24 h. (B) Tratamiento de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a una concentración de 150 μ M 3 h y adición de AM a las dosis de 5, 10, 20 y 40 μ g/mL 24 h. (C) Tratamiento de nitropusiato sódico (SNP) a una concentración de 200 μ M 3 h y adición de AM a las dosis de 5, 10, 20 y 40 μ g/mL 24 h. Los resultados se muestran como la media de 3 valores \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Posteriormente, se observa un aumento significativo de la actividad G6PDH a dosis más altas de AM (20 y 40 μ g/mL) (Figura 46B). Estos resultados no coinciden totalmente con los obtenidos con la actividad enzimática (Figura 38B), en ambos casos, los niveles obtenidos en la expresión y la actividad se mantienen igual o quedan por encima del control positivo excepto a la concentración de 5 μ g/mL, en donde hay una leve disminución con respecto al control positivo y, en los resultados de actividad, esta misma concentración provoca un aumento de dicha actividad.

En los tratamientos con SNP, el ácido maslínico provocó una disminución significativa de la expresión de G6PDH respecto a la acción del SNP sólo (Figura 46C). Esta disminución se produjo a todas las concentraciones empleadas de AM, sin que hubiera diferencias significativas entre las dosis empleadas.

Los resultados de expresión de G6PDH en los tratamientos con SNP no coinciden en su totalidad con los obtenidos en la actividad enzimática (Figura 38C).

IV.5.4. Niveles de expresión de glutation S-transferasa (GST)

La figura 47, muestra los resultados de expresión de GST en la línea celular A10. Se encontró que la expresión de GST disminuye de forma significativa en ausencia de suero y en presencia de AM. La disminución en presencia de AM es dosis dependiente (Figura 47A). Los resultados de la expresión de GST se corresponden a los obtenidos con la actividad enzimática glutacion S-transferasa mostrados en la Figura 39A.

Los niveles de expresión de GST en las células A10, mostraron una reducción cuando el agente estresante es el peróxido de hidrógeno sumado a la acción del AM. Esta disminución resultó ser significativa a concentraciones elevadas de AM (20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 47B).

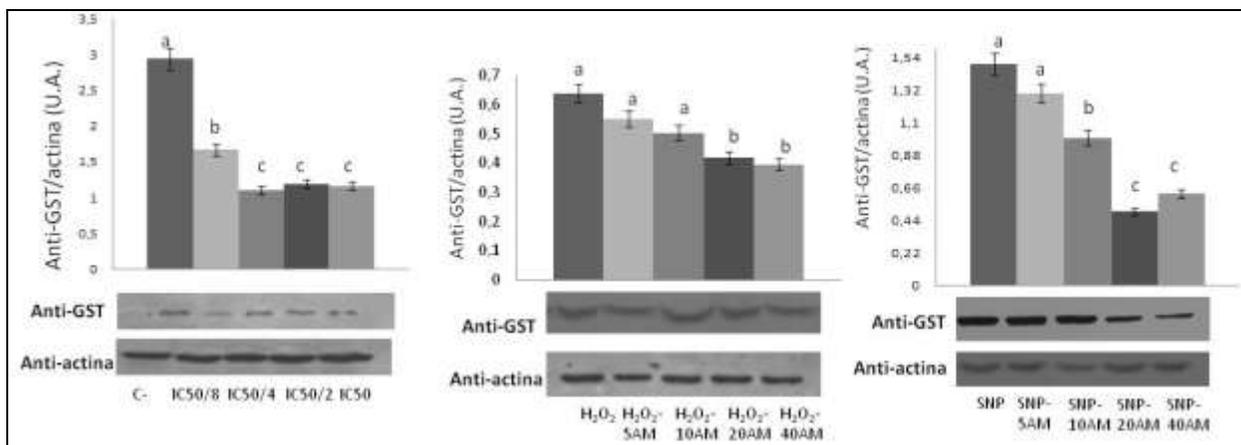


Figura 47. Niveles de expresión de GST en A10 para distintos tratamientos. (A) Tratamiento sin FBS 24 h y adición de AM a las dosis de IC₅₀; IC_{50/2}; IC_{50/4} y IC_{50/8} 24 h. (B) Tratamiento de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a una concentración de 150 μM 3 h y adición de AM a las dosis de 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 24 h. (C) Tratamiento de nitropusiato sódico (SNP) a una concentración de 200 μM 3 h y adición de AM a las dosis de 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 24 h. Los resultados se muestran como la media de 3 valores \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El ácido maslínico provocó reducciones significativas en la expresión de GST, cuando el agente estresante es el SNP (Figura 47C). Los resultados de la expresión de GST en los

tratamientos con H₂O₂ y SNP, presentaron un comportamiento similar al obtenido con la actividad enzimática (Figura 37B y 37C).

Por otra parte, en la línea celular B16-F10 se encontró que la expresión de GST aumentó en ausencia de FBS y presencia de AM (Figura 48). Este aumento fue significativo a concentraciones elevadas de AM (IC_{50/2} e IC₅₀) (Figura 48A). Los resultados de la expresión de GST indicó tener un comportamiento opuesto al obtenido con la actividad enzimática (Figura 40A).

Los niveles de expresión de GST en las células B16-F10, mostraron incremento cuando el agente estresante es el H₂O₂ sumado a la acción del AM a dosis bajas (5 y 10 µg/mL) con respecto a la acción del H₂O₂ únicamente. Posteriormente, ocurre una disminución de la actividad GST a dosis más altas de AM (20 y 40 µg/mL) (Figura 48B). Estos resultados no se relacionan con los obtenidos con la actividad enzimática (Figura 40B).

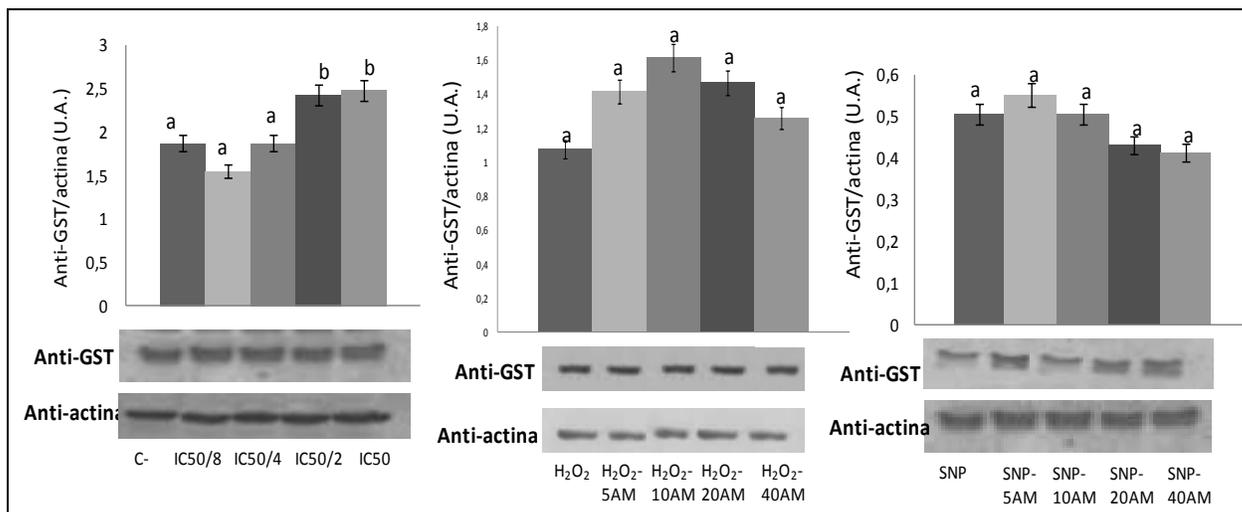


Figura 48. Niveles de expresión de GST en B16-F10 para distintos tratamientos. (A) Tratamiento sin FBS 24 h y adición de AM a las dosis de IC₅₀; IC_{50/2}; IC_{50/4} y IC_{50/8} 24 h. (B) Tratamiento de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a una concentración de 150 µM 3 h y adición de AM a las dosis de 5, 10, 20 y 40 µg/mL 24 h. (C) Tratamiento de nitropusiato sódico (SNP) a una concentración de 200 µM 3 h y adición de AM a las dosis de 5, 10, 20 y 40 µg/mL 24 h. Los resultados se muestran como la media de 3 valores ± SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05).

En los tratamientos con SNP, el ácido maslínico provocó una disminución de la expresión de GST. Sin embargo, esta reducción no fue significativa (Figura 48C). Los resultados de la expresión de GST mostraron comportamientos similares a los de la actividad enzimática (Figura 40C).

IV.6. Efecto del AM sobre la proliferación

IV.6.1. Resultados de viabilidad celular (MTT). Cálculo de IC50

Los resultados se expresan en la Figura 49 para HT29 y figura 50 para HepG2). Con objeto de determinar el nivel de proliferación y viabilidad celular de las líneas celulares tumorales HT29 y HepG2 frente al ácido maslínico se realizó el ensayo MTT. Estos ensayos se realizaron para ambas líneas celulares con ácido maslínico del 98% de pureza y con la sal sódica del mismo, aislada a partir del compuesto 98% puro.

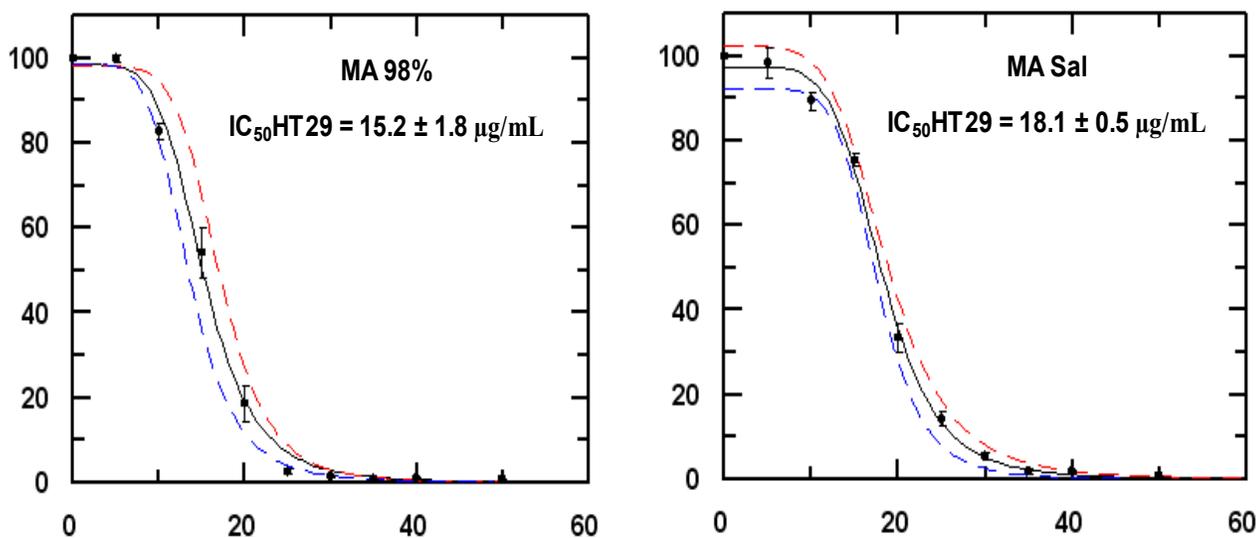


Figura 49. Efecto del ácido maslínico (98% y sal) sobre la inhibición del crecimiento en células HT29, tras 24 h de tratamiento. La inhibición del crecimiento fue analizada por el ensayo MTT. Los resultados se muestran como porcentaje respecto al control ± S.D.

El procedimiento seguido consistía en una medida de la absorbancia a 570 nm, proporcional al número de células viables mediante el ensayo MTT. Se realizó en placa de

96 pocillos, con concentraciones de ácido maslínico de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tras 24 horas de incubación. Se utilizó esta medida como concentración arbitraria a partir de la cual se tomaron diferentes concentraciones de ácido maslínico subcitotóxicas.

Los resultados se expresan como porcentaje de células vivas respecto al control, considerando éste como el 100% de la viabilidad celular. Los resultados en HT29 muestran que el ácido maslínico induce un decremento dosis-dependiente en el número de estas células vivas capaces de acumular formazán tras 24 h de tratamiento. En el caso del ácido maslínico al 98%, la concentración de este compuesto que produce la inhibición del crecimiento del cultivo celular en un 50% (IC_{50}) fue $15,2 \pm 1,8 \mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que utilizando la sal del compuesto, la IC_{50} fue algo mayor, $18,1 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$.

A partir de estos valores determinamos las concentraciones de ácido maslínico que se utilizaron para el resto de los ensayos sin que el compuesto actuase como agente citotóxico, para determinar si el compuesto podía actuar como agente proliferativo. Por ello la concentración más alta utilizada del compuesto en el resto de los ensayos correspondió a la propia IC_{50} . A partir de esta las concentraciones empleadas fueron $\text{IC}_{50/2}$, $\text{IC}_{50/4}$ e $\text{IC}_{50/8}$.

Los resultados de viabilidad para las células HepG2 se muestran en la (Figura 50). Para el cálculo de la curva de viabilidad de las células HepG2 frente al ácido maslínico, se ensayaron concentraciones crecientes de este compuesto de 0 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los ensayos en este tipo celular fueron realizados del mismo modo a los realizados en células HT29. Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de ácido maslínico durante 24 h determinándose la viabilidad celular mediante la medida de absorbancia a 570 nm.

El ácido maslínico, tanto en la forma pura, como en forma de sal induce un decremento en la viabilidad celular dosis-dependiente. Las IC_{50} encontradas para cada uno de los casos fueron: para el compuesto puro al 98% un $46,8 \pm 7,3 \mu\text{g}/\text{mL}$, y para la sal sódica de $50,6 \pm 2,4 \mu\text{g}/\text{mL}$.

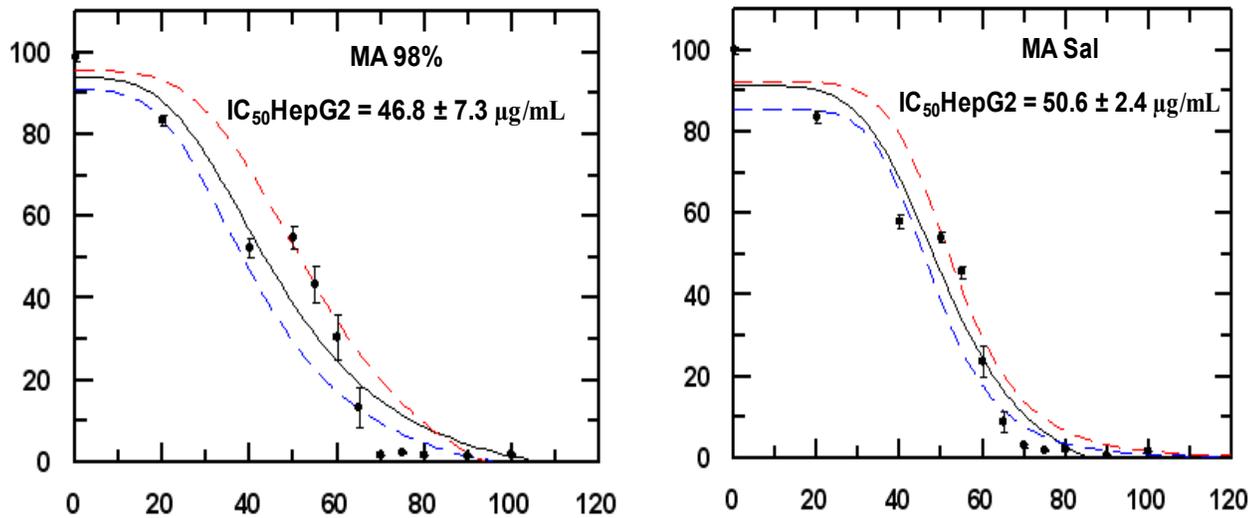


Figura 50. Efecto del ácido maslínico (98% y sal) sobre la inhibición del crecimiento en células HepG2, tras 24 h de tratamiento. La inhibición del crecimiento fue analizada por el ensayo MTT. Los resultados se muestran como porcentaje respecto al control ± S.D.

IV.6.2. Contaje celular

Con objeto de asegurar si se producía un efecto proliferativo a las concentraciones subcitotóxicas utilizadas, procedimos a realizar un contaje utilizando una cámara de Neubauer mediante tinción con azul de bromofenol. Este ensayo se realizó por triplicado a cada una de las condiciones utilizadas. Además estos resultados podrían apoyar a los encontrados en los ratios hallados por citometría de flujo.

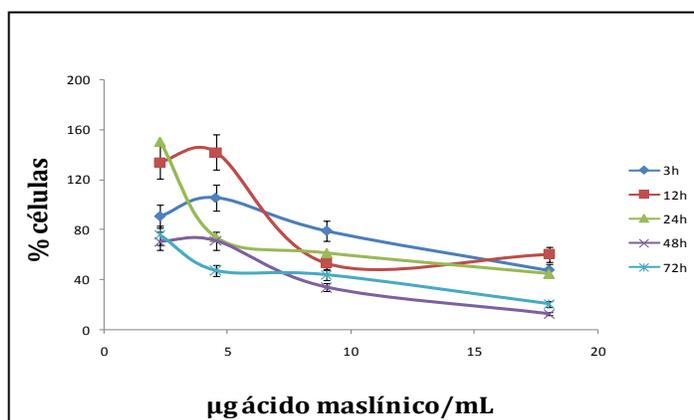


Figura 51. Porcentaje de células frente a las diferentes concentraciones de ácido maslínico empleadas en el contaje en Cámara de Neubauer en la línea celular HT29.

A continuación se muestran los resultados como porcentaje de células HT29 con respecto al control sin suero, frente a la concentración de ácido maslínico empleada (Figura 51).

Las condiciones de cultivo empleadas en cada caso correspondieron a diferentes concentraciones de ácido maslínico calculadas tomando como referencia los valores hallados para la IC_{50} en cada caso, estas concentraciones fueron para la línea celular HT29: $IC_{50}= 18 \mu\text{g/mL}$, $IC_{50/2} = 9 \mu\text{g/mL}$, $IC_{50/4}= 4,5 \mu\text{g/mL}$ e $IC_{50/8}= 2,25 \mu\text{g/mL}$; y para la línea celular HepG2: $IC_{50}= 50,5 \mu\text{g/mL}$, $IC_{50/2}= 25,2 \mu\text{g/mL}$, $IC_{50/4}= 12,6 \mu\text{g/mL}$ e $IC_{50/8}= 6,3 \mu\text{g/mL}$.

Además se analizó su efecto a diferentes tiempos: 3, 12, 24, 48 y 72 horas. Mediante este procedimiento pretendimos abarcar y estudiar un amplio rango de dosis y tiempos en los que el ácido maslínico podría ejercer su acción. Los resultados en la línea celular HT29 muestran un aumento en el número de células independientemente del tiempo a las dosis de $IC_{50/4}$ e $IC_{50/8}$ con respecto a las concentraciones de IC_{50} e $IC_{50/2}$.

Este incremento en la mayoría de los casos superaba el 80%, estando por encima del 100% a la concentración de $IC_{50/8}$ tras 12 y 24h de tratamiento; y a la concentración de $IC_{50/4}$ tras 3 y 12h de tratamiento. Se muestra además, como la concentración de ácido maslínico de IC_{50} es la que presenta menor número de células vivas, y por tanto, corresponde con la concentración más citotóxica que hemos empleado del compuesto.

A continuación se muestran los resultados como porcentaje de células HepG2 con respecto al control sin suero, frente a la concentración de ácido maslínico empleada (Figura 52). Al igual que en la línea celular HT29, en células HepG2 se realizó el mismo tipo de ensayo por contaje y en las mismas condiciones de tiempos y concentraciones con ácido maslínico. Los resultados mostraron que el mayor aumento en el número de células se daba independientemente del tiempo a la concentración de $IC_{50/4}$, aunque el porcentaje también fue alto a $IC_{50/8}$ estando próximo al 100%

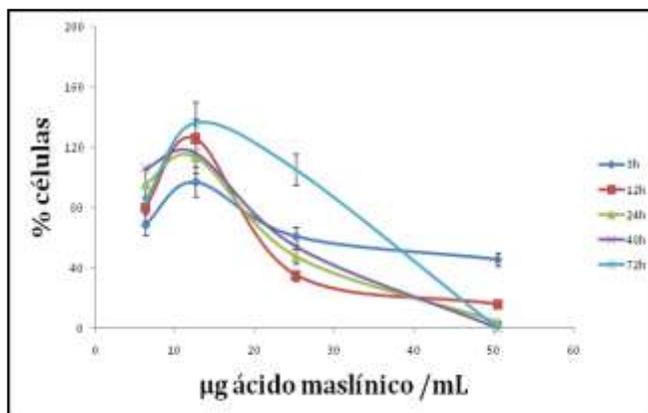


Figura 52. Porcentaje de células frente a las diferentes concentraciones de ácido maslínico empleadas en el conteo en Cámara de Neubauer en la línea celular HepG2.

La concentración de IC_{50} resultó ser la más citotóxica, ya que a todos los tiempos fue la concentración que presentó menor número de células viables. Los resultados de los ensayos anteriores nos ponen de manifiesto varios hechos.

Por un parte, las concentraciones de ácido maslínico que presentaron un mayor incremento en el número de células en cultivo fueron $IC_{50/4}$ e $IC_{50/8}$, siendo también las concentraciones menos citotóxicas. Por otro lado, los tiempos de incubación que produjeron un mayor efecto sobre el número de células fueron en el caso de las células HT29 los tiempos iniciales: 3, 12 y 24 horas, aunque este efecto no se mostró de forma clara, en el caso de las células HepG2.

IV.6.3. Viabilidad por FDA/IP

IV.6.3.1. Línea celular HT29

En este caso los resultados de citometría obtenidos mediante tinción con fluoresceína diacetato /ioduro propidio pueden observarse en la Figura 53. En todos los casos las células fueron incubadas 24 h con ácido maslínico y en ausencia de suero.

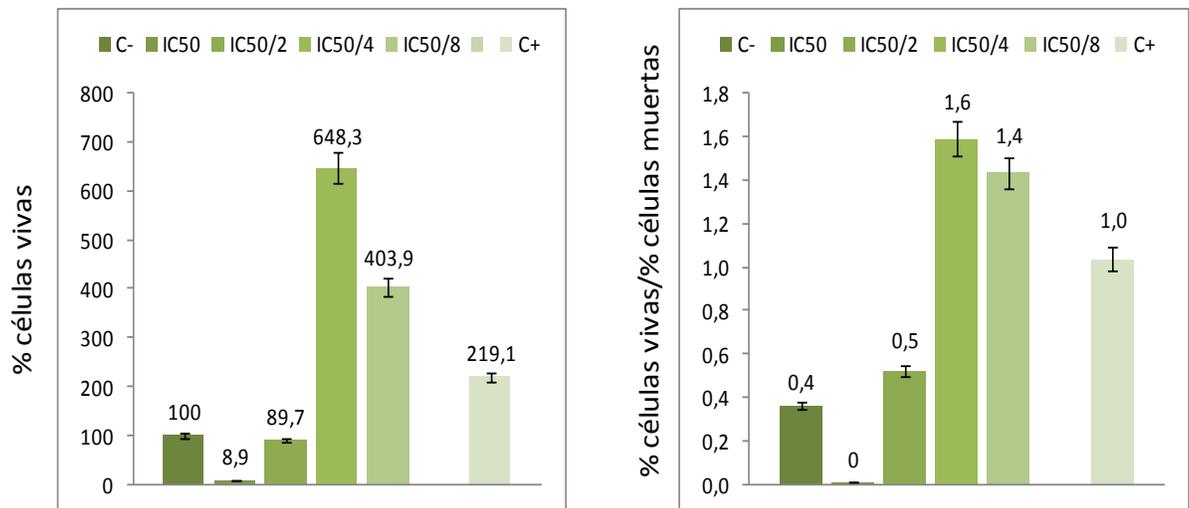


Figura 53. Porcentaje de células HT29 medidas por citometría de flujo utilizando FDA/IP. En todos los casos se trató con ácido maslínico durante 24h. A la derecha se muestra la barra correspondiente al control positivo con suero.

Los resultados encontrados muestran un aumento en el porcentaje de células viables a medida que disminuye la concentración de ácido maslínico al igual que ocurría en el caso de las células HepG2. En este caso el tratamiento IC_{50/8}, aun siendo superior al control positivo de células con suero, presentó menor número de células viables que a la concentración de IC_{50/4}.

En la gráfica derecha de la Figura 53, se representa la población de células vivas respecto a la población de células muertas.

En este caso se pudo observar que los tratamientos con una mayor relación células vivas respecto a las células muertas fueron los incubados a las concentraciones de IC_{50/4} e IC_{50/8}, presentando valores incluso superiores a los encontrados en el control de células tratadas con suero (C+). Este resultado refleja que el porcentaje de células muertas a las concentraciones IC_{50/4} e IC_{50/8} es menor que el encontrado en el control positivo tratado con suero.

Los resultados encontrados nos muestran que efectivamente el ácido maslínico presenta un importante efecto proliferativo a dosis IC_{50/4} e IC_{50/8}, tanto en células HT29 como en HepG2, ya que a estas concentraciones el posible efecto anabólico del ácido maslínico podría contrarrestar el efecto citostático inducido por la privación de suero.

IV.6.3.2. Línea celular HepG2

Los resultados encontrados pueden apreciarse en la Figura 54, en la gráfica izquierda hemos representado el porcentaje de células vivas tomando el tratamiento sin suero (C-), como referencia.

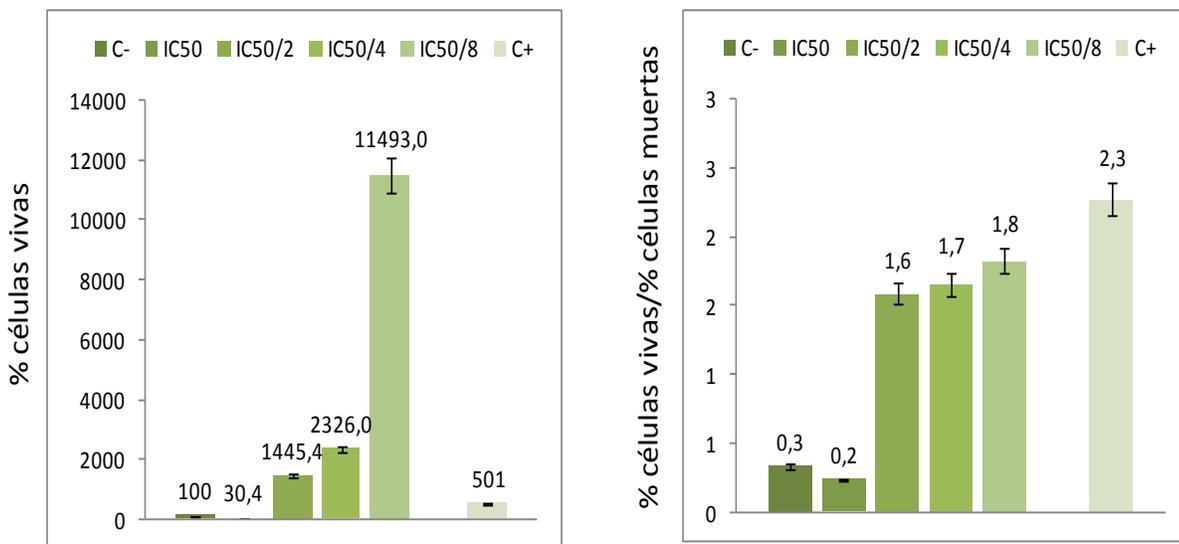


Figura 54. Porcentaje de células HepG2 medidas por citometría de flujo utilizando FDA/IP. En todos los casos se trató con ácido maslínico durante 24h. A la derecha se muestra la barra correspondiente al control positivo con suero.

Los resultados de citometría obtenidos mediante tinción con fluoresceína diacetato /ioduro propidio nos permitieron calcular el porcentaje de células en división y no viables en cada uno de los tratamientos empleados. En todos los casos las células fueron incubadas 24 h con ácido maslínico y en ausencia de suero. Los resultados observados muestran un aumento en el porcentaje de células viables a medida que disminuye la

concentración de ácido maslínico. De este modo el tratamiento IC_{50/8} fue el que presentó un mayor número de células viables.

Además se puede observar que el incremento en el número de células viables es superior al encontrado en el control positivo (C+), células tratadas con suero. Incremento que se observa a partir de la concentración de IC_{50/2}.

En la gráfica derecha de la Figura 54, se representa la población de células vivas respecto a la población de células muertas. En este caso se pudo observar un incremento en la relación células vivas respecto a las células muertas a partir de IC_{50/2}.

IV.6.4. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.

El estudio del ácido maslínico sobre el ciclo celular en las líneas cancerígenas de colon HT29 y de hepatoma HepG2 se realizó con el fin de obtener información sobre los distintos aspectos de la acción de este compuesto.

El efecto sobre el ciclo celular fue analizado por la incorporación de yoduro de propidio (IP) a las células, cuya concentración en el interior celular es proporcional a la cantidad de DNA celular. La intensidad del IP incorporado por cada célula fue analizada por citometría de flujo. Ambas líneas celulares fueron mantenidas en ausencia de suero bovino fetal (*fetal calf serum*, FCS), ya que en este suero se encuentran los factores de crecimiento que inducen la división celular.

La presencia de FCS es necesaria para el buen mantenimiento de las células en cultivo, las células al ser deprimidas de suero por una parte sufren estrés celular y por otra parte detienen su división parando el ciclo celular, arrojándose en la fase G₀/G₁ del ciclo.

El análisis de citometría de flujo permite determinar el porcentaje de células que se encuentran en cada una de las fases del ciclo, de este modo si la célula se encuentra arrestada, disminuirá su tasa de división, por lo que el número de células en las fases S o

G2/M también disminuirá, con el consiguiente incremento del número de células en la fase G0/G1.

Por el contrario si se induce la división celular disminuirá el porcentaje de células en la fase G0/G1 y se incrementaran las fases de síntesis, fase S, y de división celular donde se produce la mitosis, fase G2/M.

Las células sometidas a 24 horas de privación de suero, fueron incubadas en las mismas condiciones de privación con concentraciones decrecientes de ácido maslínico (IC_{50} , $IC_{50/2}$, $IC_{50/4}$ e $IC_{50/8}$).

Además se tomaron dos controles, un control con ausencia total de suero, al que denominamos control negativo (C-) y un segundo control con la concentración de suero al 10%, concentración habitual que suele utilizarse para el cultivo celular, denominándole control positivo (C+).

Los resultados muestran que tanto en las células HT29 como en las células HepG2 la privación de suero produjo un importante arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular con más de un 95% de células en arrestadas en esta fase del ciclo, independientemente del tiempo de incubación.

Con el objeto de reflejar si el ácido maslínico indujo la división celular los resultados del ciclo celular se muestran como incrementos con respecto a los respectivos controles negativos.

IV.6.4.1. Células HT29

IV.6.4.1.1. Ratios

Aunque el uso de los ratios o numero de partículas por segundo obtenidos por citometría de flujo como reflejo del número de células no es del todo correcto, ya que en estos ratios también se incluyen partículas que pueden ser o no células.

Por ello, se utilizó el valor de este parámetro como representación del número total de células en cada una de los tratamientos, corroborando así los resultados obtenidos mediante conteo visual realizado haciendo uso de la cámara de Neubauer.

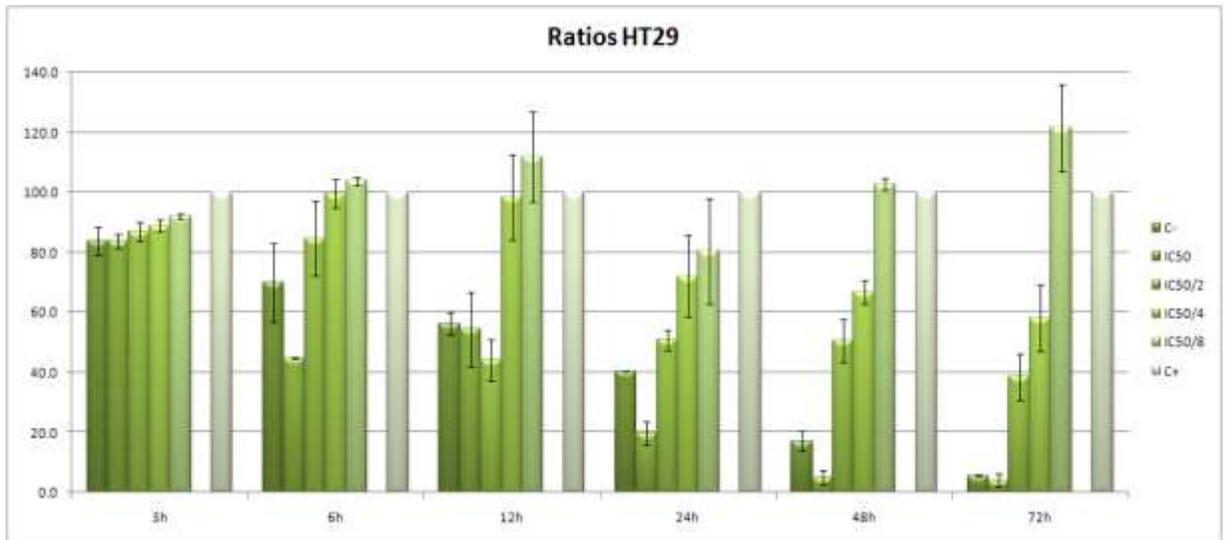


Figura 55. Variaciones de los ratios o número de células por segundo a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las diferentes concentraciones en la línea celular HT29.

En el caso de la línea tumoral HT29 se observa, en los valores obtenidos para los controles negativos, que la privación de suero tiene un efecto anti-proliferativo que se incrementa a lo largo del tiempo siendo menor al 20% al inicio del tratamiento (3 horas), y alcanzando valores por encima del 90% tras 72 horas de tratamiento (Figura 55).

Con respecto al efecto del ácido maslínico se observa una recuperación del efecto anti-proliferativo producido por la ausencia de suero de forma inversamente proporcional a la concentración de ácido maslínico.

Siendo citotóxico a la concentración de IC₅₀ y recuperándose de forma inversa a la concentración de ácido maslínico, estando por encima de los valores del control negativo a partir de la concentración de IC_{50/2} y alcanzando valores próximos al control positivo a

las concentraciones de IC_{50/4} e IC_{50/8}, estando incluso por encima de estos tras las 48 y 72 horas de incubación.

IV.6.4.1.2. Ciclo celular

Con respecto al ciclo celular se estudio su evolución a lo largo del tiempo, así como en función de las concentraciones de ácido maslínico utilizadas.

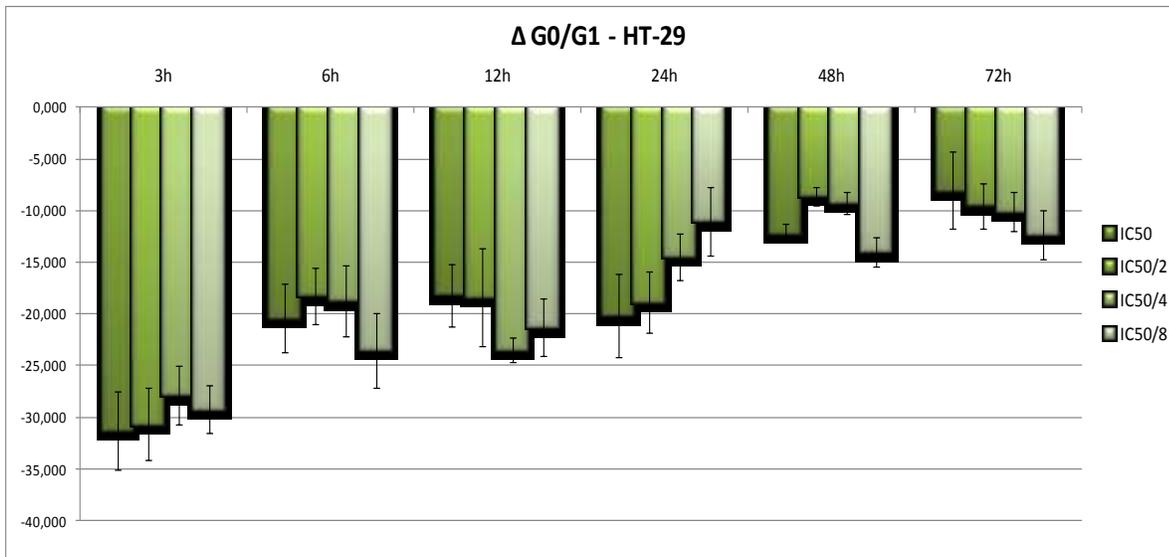


Figura 56. Variaciones en los incrementos de células en fase G0/G1, respecto al control sin suero en a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las diferentes concentraciones en la línea de adenocarcinoma de colon HT29.

En primer lugar pudo observarse una importante disminución en el número de células en la fase G0/G1 con respecto al control negativo, esta importante disminución fue desapareciendo a lo largo del tiempo incrementándose el arresto en la fase G0/G1 del ciclo, pasando de ser un 30% menor que el control negativo a las primeras 3 horas de incubación, a ser prácticamente un 10% menor tras 72 horas de incubación (**Figura 56**).

Indicando que el mayor efecto sobre el ciclo celular del ácido maslínico se produce en las primeras horas de tratamiento. Lo que supone un descenso por encima del 30% de la

fase G0/G1 con respecto al control negativo, independientemente de la concentración de ácido maslínico utilizada, descenso que se va recuperando conforme avanza la duración del tratamiento. Con respecto a la dependencia con las concentraciones de ácido maslínico no se observó ninguna tendencia clara en la variación de los porcentajes de células en esta fase.

Este efecto sobre el ciclo celular parece ser previo al incremento en el número de células encontrado en el análisis de los ratios y en los contajes, lo que estaría relacionado con cambios previos en el ciclo celular que finalmente se ven reflejados, de una forma más tardía, en el incremento del número de células.

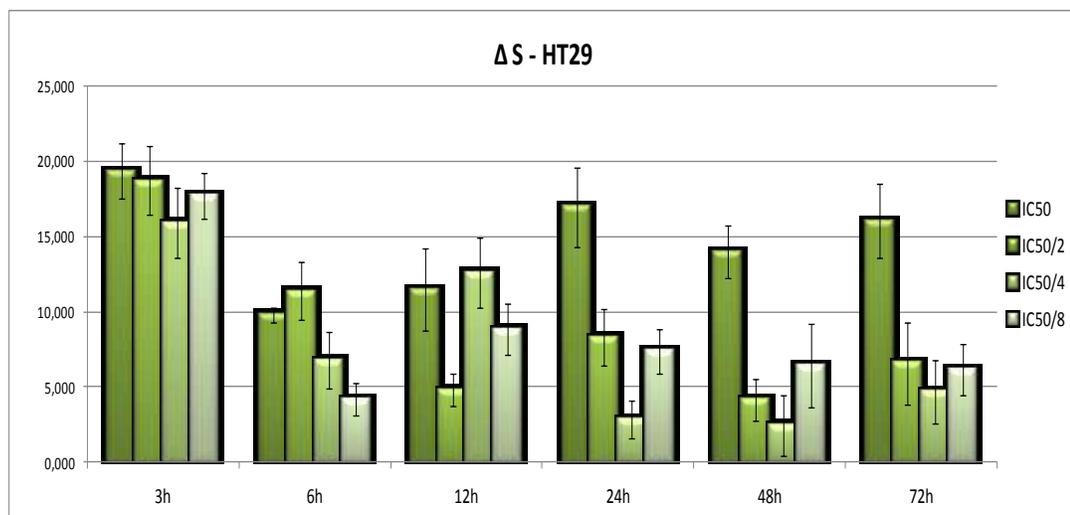


Figura 57. Variaciones en los incrementos de células en fase S, respecto al control sin suero en a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las diferentes concentraciones en la línea celular HT29.

Con respecto a la fase S del ciclo, fase en la que se realiza la síntesis del material necesario para la división celular se observó cierta disminución tiempo dependiente a las concentraciones IC_{50/2}, IC_{50/4} e IC_{50/8}, aunque los valores se mantuvieron entre un 5% y un 10%, no existiendo un cambio claro a la concentración de IC₅₀ (**Figura 57**).

El incremento de la proporción de células en las fase de síntesis (S) del ciclo celular se produjo de forma concomitante con el descenso observado en la fase G0/G1, siendo

mayor a las 3 horas de incubación donde se producía un mayor descenso de células en la fase G0/G1. Finalmente, en relación con la fase G2/M, previa a la división mitótica se muestra una importante disminución de la misma a partir de las 48 horas de tratamiento con respecto del control negativo, aunque no se observa con claridad un comportamiento claramente dosis dependiente.

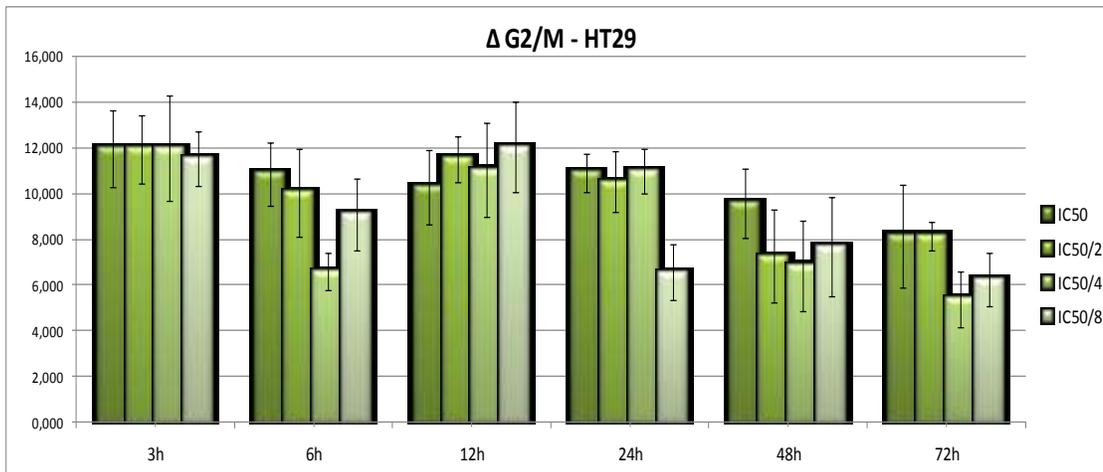


Figura 58. Variaciones en los incrementos de células en fase G2/M, respecto al control sin suero en a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las diferentes concentraciones en la línea celular HT29.

Los valores más altos se dan al inicio del tratamiento lo que es coherente con la mayor descenso de la fase G0/G1 encontrado a dichos tiempos iniciales tal y como se observa en la figura 58.

IV.6.4.2. Células HepG2

IV.6.4.2.1. Ratios

En el caso de la línea tumoral de hepatoma HepG2 se observó, al igual que en la línea tumoral HT29, que la privación de suero tiene un efecto anti-proliferativo aunque dicho efecto fue bastante menos acentuado, manteniéndose en valores de entre un 20% y 40% con respecto al control positivo (con suero). En este caso no se observó un descenso

tiempo dependiente de los ratios con la privación de suero (control negativo), oscilando a lo largo del tratamiento.

Con respecto a la acción del ácido maslínico, se observo una mayor citotoxicidad, que en el caso de HT29, desde el inicio del tratamiento a la concentración de IC₅₀, citotoxicidad que disminuía a medida que lo hacia la concentración del mismo, alcanzando valores por encima del control sin suero a partir de IC_{50/4}, y llegando incluso en algunos de los casos a valores por encima del control positivo a las concentraciones de IC_{50/4} e IC_{50/8}. Este comportamiento fue claramente visible desde las 6 horas de tratamiento y hasta el final del mismo, donde se alcanzaron valores por encima del 50% con respecto al control positivo (Figura 59).

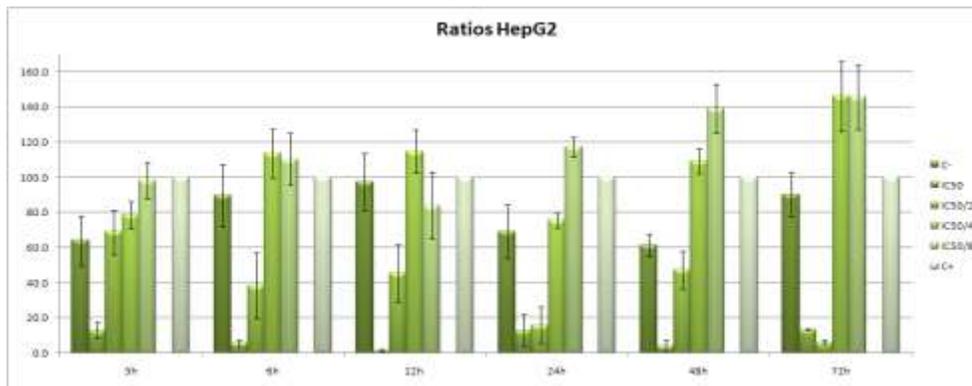


Figura 59. Variaciones de los ratios o número de células por segundo a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las diferentes concentraciones en la línea celular HepG2.

IV.6.4.2.2. Ciclo celular

En relación con el ciclo celular se observó la misma tendencia encontrada que en el caso de la línea de carcinoma de colon HT29.

El ácido maslínico produjo un importante descenso en la fase G₀/G₁ del ciclo celular con respecto al control negativo sin suero al inicio del tratamiento (3h), descenso que continuó siendo significativo a las 6 horas de tratamiento y que fue recuperándose con el

transcurso del mismo. En este caso la citotoxicidad de las concentraciones de IC_{50} y de $IC_{50/2}$, unidas a la falta de suero, fueron lo suficientemente tóxicas como para impedir el análisis de los resultados a tales concentraciones (Figura 60).

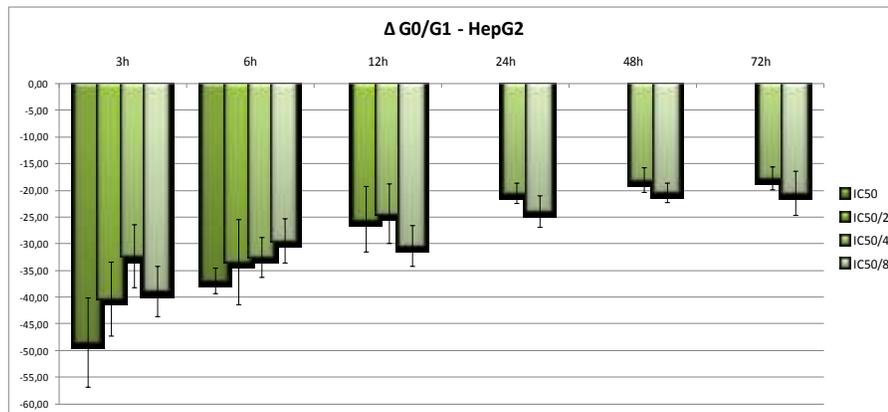


Figura 60. Variaciones en los incrementos de células en fase G0/G1, respecto al control sin suero en a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las diferentes concentraciones en la línea celular HepG2.

En relación con la fase S del ciclo en este caso sí que se observa un claro incremento al inicio del tratamiento, concordante con la disminución de la fase G0/G1. Incremento que disminuye de forma claramente dependiente con el tiempo. En relación con las variaciones del porcentaje de células en fase S con respecto a las concentraciones de ácido maslínico, no se apreció una tendencia clara (Figura 61).

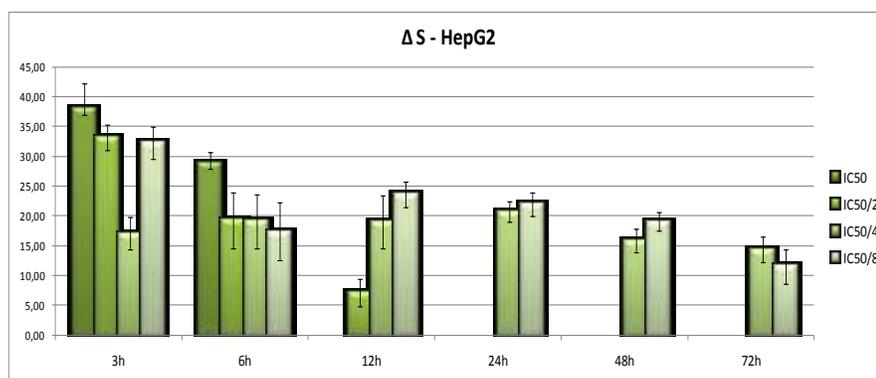


Figura 61. Variaciones en los incrementos de células en fase S, respecto al control sin suero, en a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las diferentes concentraciones en la línea celular HepG2.

Finalmente respecto a la fase G2/M se observó un claro descenso a partir de las 24h de tratamiento, aunque este descenso no mostró un comportamiento tiempo dependiente, llegando a estar por debajo del 5% en algunos de los casos.

Al igual que en los análisis anteriores la variación del porcentaje de células con la concentración de ácido maslínico no mostró una tendencia clara. Como ocurría con HT29, en las células HepG2 el mayor efecto del ácido maslínico se produjo al inicio del tratamiento (3 y 6h), disminuyendo drásticamente a partir de las 24h (Figura 62).

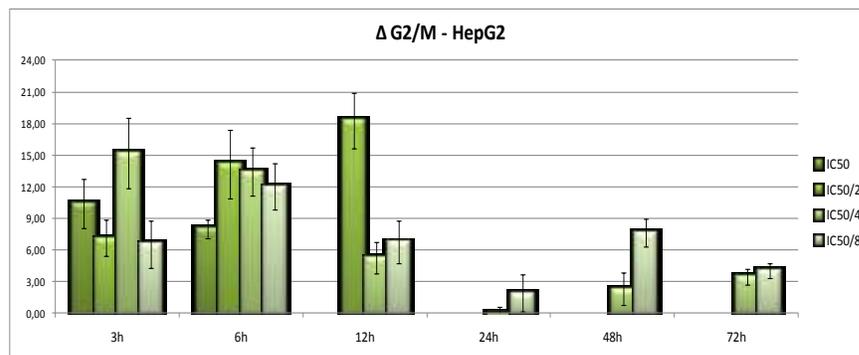


Figura 62. Variaciones en los incrementos de células en fase G2/M, respecto al control sin suero, en a lo largo del tratamiento con ácido maslínico a las diferentes concentraciones en la línea celular HepG2.

Como en el caso de las células HT29 el mayor efecto sobre el ciclo celular en las células HepG2 fue observado de forma previa al incremento en el número de células detectado en los ratios o por contaje, esto podría explicarse si los cambios observados en el ciclo celular ocurriesen de forma previa al incremento en el número de células.

Como ocurría anteriormente los resultados encontrados por citometría de flujo respaldan varios hechos: las concentraciones de ácido maslínico que presentan una mayor ratio son IC_{50/4} e IC_{50/8}, siendo también las menos citotóxicas.

Siendo los tiempos de incubación iniciales los que tuvieron un mayor efecto sobre el ciclo celular, aunque con respecto a los ratios el mayor efecto se observó al final del

tratamiento (24, 48 y 72h). Todos estos análisis se realizaron en ausencia de FCS, tomando como referencia el control negativo sin suero.

Para continuar caracterizando el efecto proliferativo del ácido maslínico y corroborar los resultados anteriormente descritos, nos propusimos analizar los niveles expresión de proteínas implicadas en procesos de diferenciación y proliferación celular. Antes de lo cual se determinó la cantidad de proteína presente en cada uno de los tratamientos.

Estos resultados nos permiten plantearnos la posible presencia de un mayor número de células o de un incremento en el tamaño celular en aquellos tratamientos en que se observe una mayor concentración de proteína, contrastarlos con los ya obtenidos.

IV.6.5. Cantidad de proteína celular

La cuantificación de proteína celular se realizó por el método BCA, explicado en la sección de material y métodos. Las concentraciones de ácido maslínico empleadas fueron: control positivo (con suero), control negativo (sin suero), IC_{50} , $IC_{50/4}$ e $IC_{50/8}$.

Todos los valores fueron referidos al control positivo, que tomamos como 100%, siendo expresados como porcentajes del mismo. Al analizar los resultados pudo observarse que efectivamente en el caso de las células HepG2 la mayor concentración de proteína se encontraba a la concentración de $IC_{50/4}$ lo que es coherente con el mayor número de células encontrado a esta concentración.

A $IC_{50/8}$ también se observó un aumento en la concentración de proteína, aunque siendo menos patente que a $IC_{50/4}$. (Tabla 7). Estos resultados coinciden con los encontrados en los contajes correspondientes a esta línea celular.

En la línea HT29 los resultados mostraron que la concentración de proteína es inversamente proporcional a la concentración de ácido maslínico empleada, de forma que

la mayor concentración de proteína se observa a la concentración de $IC_{50/8}$, que es precisamente donde se observó, por contaje, un mayor número de células (Tabla 7).

Tabla 7. Determinación de la cantidad de proteína en las líneas tumorales HT29 y HepG2 por el método BCA.

% Proteína	HepG2		HT29	
	24h	48h	12h	24h
Control +	100	100	100	100
Control –	64,34±7,14	81,32±9,03	19,95±2,02	26,45±2,94
IC₅₀	--	--	45,36±5,03	28,37±2,94
IC_{50/4}	85,22±6,66	133,87±10,84	43,91±3,32	58,67±2,58
IC_{50/8}	76,50±8,49	75,77±8,41	62,97±4,07	78,52±4,17

En ambos casos las determinaciones de proteína se realizaron a dos tiempos intermedios. Siendo 12, 24h para la línea tumoral HT29 y 24, 48h para la línea tumoral HepG2, por ser estos tiempos en los que se observó un mayor número de células por contaje. Independientemente del tiempo la tendencia en la concentración de proteína fue la misma para ambas líneas celulares.

A partir de estos resultados, corroborando los tiempos y concentraciones donde se observaba un mayor efecto del ácido maslínico en la proliferación celular, se realizaron los diferentes ensayos de expresión que serán comentados en el siguiente punto.

IV.7. Actividades enzimáticas

IV.7.1. Actividad glutatión reductasa (GR)

En la Figura 63 se muestran los resultados obtenidos al medir la actividad enzimática GR para las líneas tumorales HT29 y HepG2.

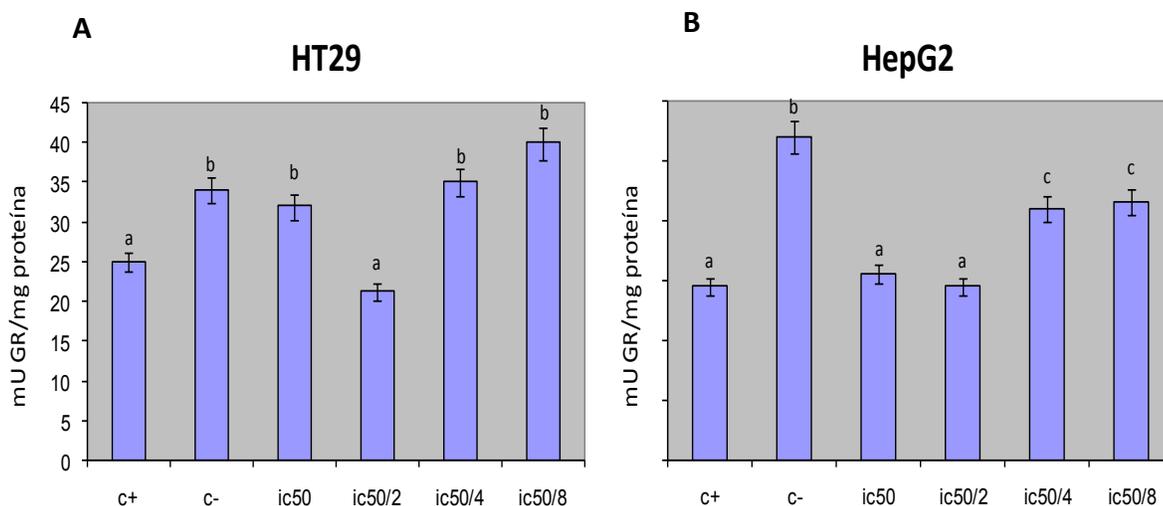


Figura 63. Actividad específica en mU/mg proteína de la enzima GR. A. HT29, Tratamientos (c+: control positivo; c-: control negativo sin FBS; IC₅₀: 15 µg/mL de AM; IC_{50/2}: 7,5 µg/mL; IC_{50/4}: 3,75 µg/mL de AM; IC_{50/8}: 1,875 µg/mL de AM. B. HepG2, Tratamientos (c+: control positivo; c-: control negativo sin FBS; IC₅₀: 46,8 µg/mL de AM; IC_{50/2}: 23,4 µg/mL; IC_{50/4}: 11,7 µg/mL de AM; IC_{50/8}: 5,85 µg/mL de AM. Los resultados se muestran como la media de 9 valores ± S.E.M. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

En la Figura 63, panel A, se muestran los resultados obtenidos para la actividad GR en HT29. Dicha actividad aumentó, al retirar los factores de crecimiento al cultivo celular. La adición de AM produjo un aumento en la actividad GR significativo a todas las dosis empleadas, excepto a la concentración de IC_{50/2}. Este aumento superó, a su vez, los valores obtenidos para la actividad GR en el control positivo. Los resultados de actividad GR en ausencia de los factores de crecimiento en las células HepG2 se muestran en la Figura 63B. La actividad de este enzima mostró un aumento en la situación experimental “control negativo” respecto al control positivo. Por su parte, los tratamientos a distintas

concentraciones de AM indicaron una disminución de dicha actividad respecto al control negativo. Esta disminución fue mayor en las concentraciones más altas de AM ensayadas; sin embargo, a las concentraciones de $IC_{50/4}$ y $IC_{50/8}$ se experimentó un aumento significativo, quedando por encima del control positivo, lo que podría explicar que el AM estimula la actividad de la GR.

IV.7.2. Actividad glutatión peroxidasa (GPX)

Los resultados de actividad GPX, en ausencia de los factores de crecimiento en las células HT29, se muestran en la Figura 64. Esta enzima mostró un aumento en su actividad con respecto al control positivo (con FBS). Se observa que la adición de AM aumenta la actividad GPX aún más, en donde los valores obtenidos superan a los encontrados en los dos controles, sin tener dependencia de la dosis del AM, ya que las diferentes dosis de AM ensayadas no provocaron entre ellas cambios en la actividad de este enzima. Por otro lado, los resultados de la actividad GPX en HepG2, se muestran en la Figura 64B. La ausencia de factores de crecimiento incrementó la actividad enzimática GPX respecto al control.

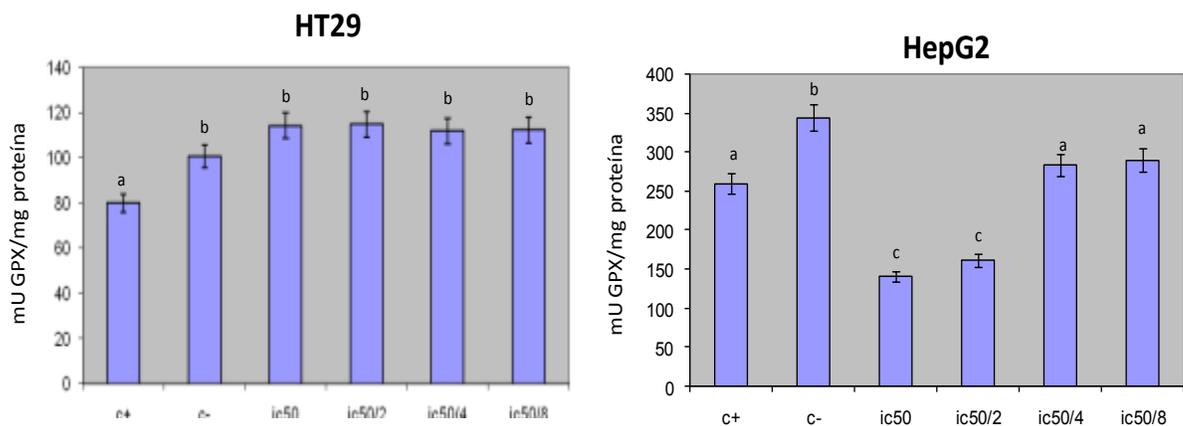


Figura 64. Actividad específica en mU/mg proteína de la enzima GPX. A. HT29, Tratamientos (c+: control positivo; c-: control negativo sin FBS; IC_{50} : 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AM; $IC_{50/2}$: 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $IC_{50/4}$: 3,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AM; $IC_{50/8}$: 1,875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AM. B. HepG2, Tratamientos (c+: control positivo; c-: control negativo sin FBS; IC_{50} : 46,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AM; $IC_{50/2}$: 23,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $IC_{50/4}$: 11,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AM; $IC_{50/8}$: 5,85 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AM. Los resultados se muestran como la media de 9 valores \pm S.E.M. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Asimismo, los resultados muestran una disminución en las situaciones experimentales en donde se utilizaban las dosis más altas de AM (IC_{50} y $IC_{50/2}$), pero un aumento, respecto al control positivo, cuando las concentraciones utilizadas de AM eran las más bajas, es decir a $IC_{50/4}$ y $IC_{50/8}$.

IV.7.2. Actividad catalasa

En la Figura 65 se muestran los resultados obtenidos de actividad de la enzima antioxidante catalasa.

En el panel A de la figura 65, observamos que en la línea de adenocarcinoma de colon HT29, la actividad aumentó en ausencia de factores de crecimiento.

Por su parte, el AM provocó una disminución respecto al control negativo, sin existir diferencias significativas a las dosis de IC_{50} , $IC_{50/2}$ y $IC_{50/4}$. La única dosis que incrementó la actividad catalasa por encima de los valores obtenidos en el control positivo, e igualándose al control negativo, fue a $IC_{50/8}$, la más baja dosis de AM empleada.

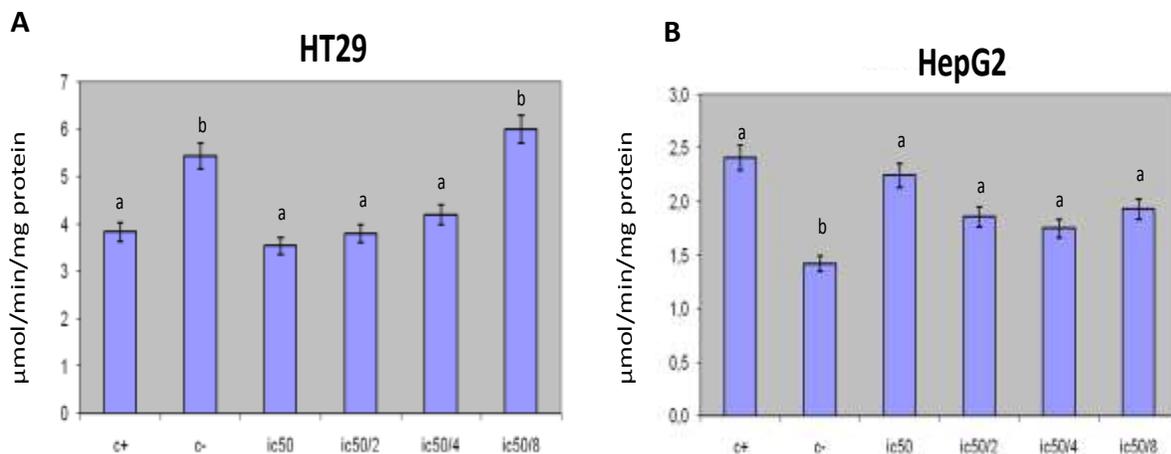


Figura 65. Actividad específica en mU/mg proteína de la enzima Catalasa. A. HT29, Tratamientos (c+: control positivo; c-: control negativo sin FBS; IC_{50} : 15 $\mu\text{g/mL}$ de AM; $IC_{50/2}$: 7,5 $\mu\text{g/mL}$; $IC_{50/4}$: 3,75 $\mu\text{g/mL}$ de AM; $IC_{50/8}$: 1,875 $\mu\text{g/mL}$ de AM. B. HepG2, Tratamientos (c+: control positivo; c-: control negativo sin FBS; IC_{50} : 46,8 $\mu\text{g/mL}$ de AM; $IC_{50/2}$: 23,4 $\mu\text{g/mL}$; $IC_{50/4}$: 11,7 $\mu\text{g/mL}$ de AM; $IC_{50/8}$: 5,85 $\mu\text{g/mL}$ de AM. Los resultados se muestran como la media de 9 valores \pm S.E.M. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los resultados de la actividad de este mismo enzima, pero en células HepG2 se muestran en el panel B de la Figura 65. Se observó una disminución significativa de la actividad en ausencia de factores de crecimiento con respecto al control. El efecto producido por la adición de AM fue aumentar en todos los casos la actividad del enzima, con respecto al control negativo sin FBS, aunque no se vieron cambios significativos entre las diferentes dosis de AM ensayadas. Estos valores obtenidos fueron iguales significativamente que los encontrados en la actividad del control positivo.

IV.8. Estudios de expresión por western blotting

IV.8.1. Expresión de p-Akt

El anticuerpo que se utilizó es un anticuerpo policlonal de conejo realizado contra un péptido de origen humano y de secuencia corta que contiene la Thr 308 fosforilada. Está recomendado para la detección de Akt-1 fosforilada en el residuo Thr 308, Akt-2 fosforilada en el residuo Thr309 y Akt-3 fosforilada en el residuo Thr 305.

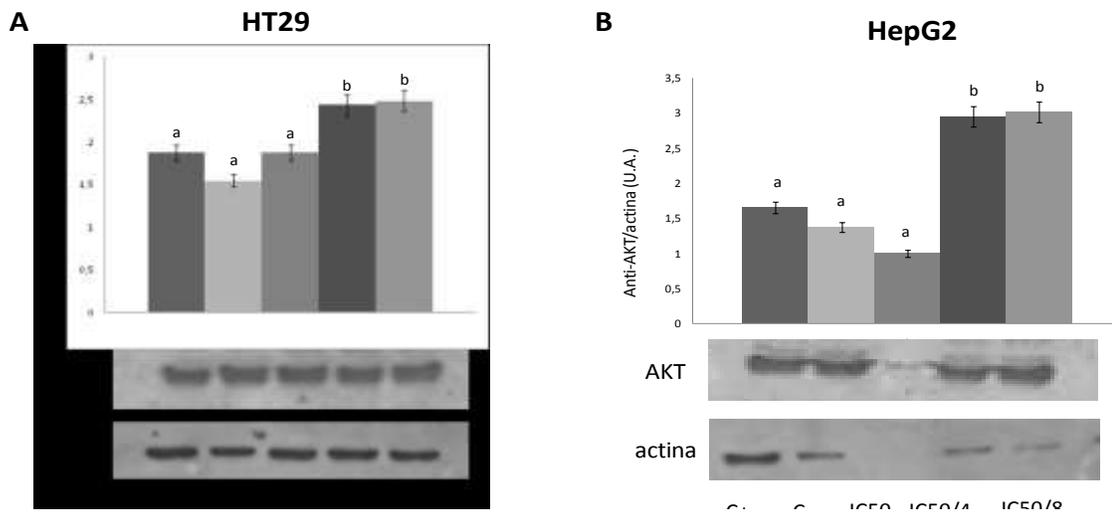


Figura 66. Análisis por “western blot” de la expresión del contenido de p-AKT en células HT29 (panel A) y HepG2 (panel B) adiferentes concentraciones de AM. La banda inmunorreactiva apareció a 60 kDa. La carga de la proteína corresponde a 50 µg en todos los tratamientos. Esta carga se normalizó con la cuantificación de la banda de actina correspondiente a la misma membrana. Los resultados corresponden a la media de 3 cuantificaciones de western diferentes ± S.E.M. Para la cuantificación se empleó el programa MultiGauge de Fujifilm.

Los resultados de expresión para el enzima p- AKT obtenidos se muestran en la Figura . muestran una clara inducción p-Akt tras 24 horas de tratamiento a la concentración de $IC_{50/4}$ y esta inducción se mantiene a la concentración de $IC_{50/8}$, es decir que a bajas dosis de AM se estimula la fosforilación de AKT (Figura 66).

Estos resultados podrían explicar los fenómenos de proliferación observados a bajas dosis de ácido maslínico. Por su parte, la ausencia de factores de crecimiento no produjo ninguna variación significativa en la expresión de este enzima, aunque se aprecia una disminución considerable. Estos resultados fueron similares en las dos líneas celulares, HT29 y HepG2. La dosis de AM más alta utilizada, es decir IC_{50} , en ninguno de estos dos casos produjo cambios en la expresión de p-AKT.

IV.8.2. Expresión de p-IKB

Los resultados de expresión obtenidos muestran una disminución dosis dependiente de la expresión de p-IkB- α , de forma que cuanto mayor es la concentración de ácido maslínico ensayada, menor es la expresión de esta proteína.

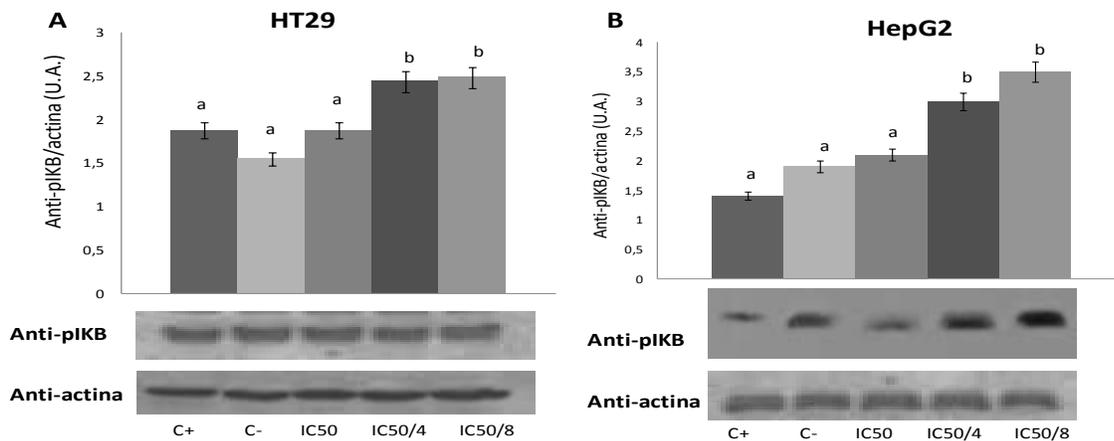


Figura 67. Análisis por “western blot” de la expresión del contenido de p-IKB en células HT29 (panel A) y HepG2 (panel B) adiferentes concentraciones de AM. La banda inmunorreactiva apareció a 32 kDa. La carga de la proteína corresponde a 50 μ g en todos los tratamientos. Esta carga se normalizó con la cuantificación de la banda de actina correspondiente a la misma membrana. Los resultados corresponden a la media de 3 cuantificaciones de western diferentes \pm S.E.M. Para la cuantificación se empleó el programa MultiGauge de Fujifilm.

Este comportamiento ocurre tras 24 horas de incubación con el AM (Figura 67). Estos resultados se observaron para las líneas celulares HT29 y HepG2.

En la línea HT29, la ausencia de factores de crecimiento (FBS) provocó una disminución en la expresión de esta proteína, pero este cambio no alcanzó la significancia. El mayor incremento de la expresión observado para IKB se dio a las dosis más bajas de AM ($IC_{50/4}$ y $IC_{50/8}$). La dosis más citotóxica empleada en este ensayo correspondía con la dosis IC_{50} , y en este caso, se observó que la expresión no cambió.

Como puede observarse en los resultados la expresión disminuye según se incrementa la concentración de ácido maslínico lo que puede estar relacionado con el comportamiento pro-apoptótico del mismo, ya que al inducirse las rutas de apoptosis se inhiben los procesos de proliferación inducidos por esta ruta.

En la línea celular HepG2, los resultados muestran un comportamiento similar al encontrado en HT29. Se observó que la ausencia de FBS no produjo cambios significativos en la expresión de este enzima. Y, que el AM, aumentaba la expresión de p-IKB a medida que se disminuía la dosis del mismo; aunque las diferencias, sólo se observaron a las dosis de $IC_{50/4}$ y $IC_{50/8}$.

IV.9. Proteómica del citoesqueleto de las células HT29

El ácido maslínico es un agente anti-tumoral que muestra potentes propiedades anti-proliferativas frente a la línea celular de cáncer de colon HT29. Para conocer el mecanismo de acción del AM hemos investigado sus efectos sobre la expresión de las proteínas del citoesqueleto. Se utilizó un procedimiento de proteómica basado en la electroforesis bidimensional en gel, análisis de masas y huellas dactilares de masa péptida.

Los resultados obtenidos de conteo, para tiempos de incubación de 3, 12, 24, 48 y 72 horas de exposición y a las concentraciones de AM (0, 3,75, 7,5, 15 y 30 μ M) fueron que el porcentaje de células viables disminuyó con el aumento de la dosis de AM. Tras 24 horas

de tratamiento, la disminución en el porcentaje de células fue gradual y dependiente de la concentración de AM.

Así, para los estudios proteómicos elegimos las concentraciones de 3,75 μM ($\text{IC}_{50/8}$) y 30 μM (IC_{50}) de AM y una duración de tratamiento de 24 h. Los resultados de citometría de flujo a las dosis empleadas de AM, pusieron de manifiesto que este compuesto presentaba un marcado carácter apoptótico, ya que fue capaz de producir arresto celular en la fase G1 del ciclo.

El aumento del número de células en fase G1, se acompañó de una disminución de las fases S y G2.

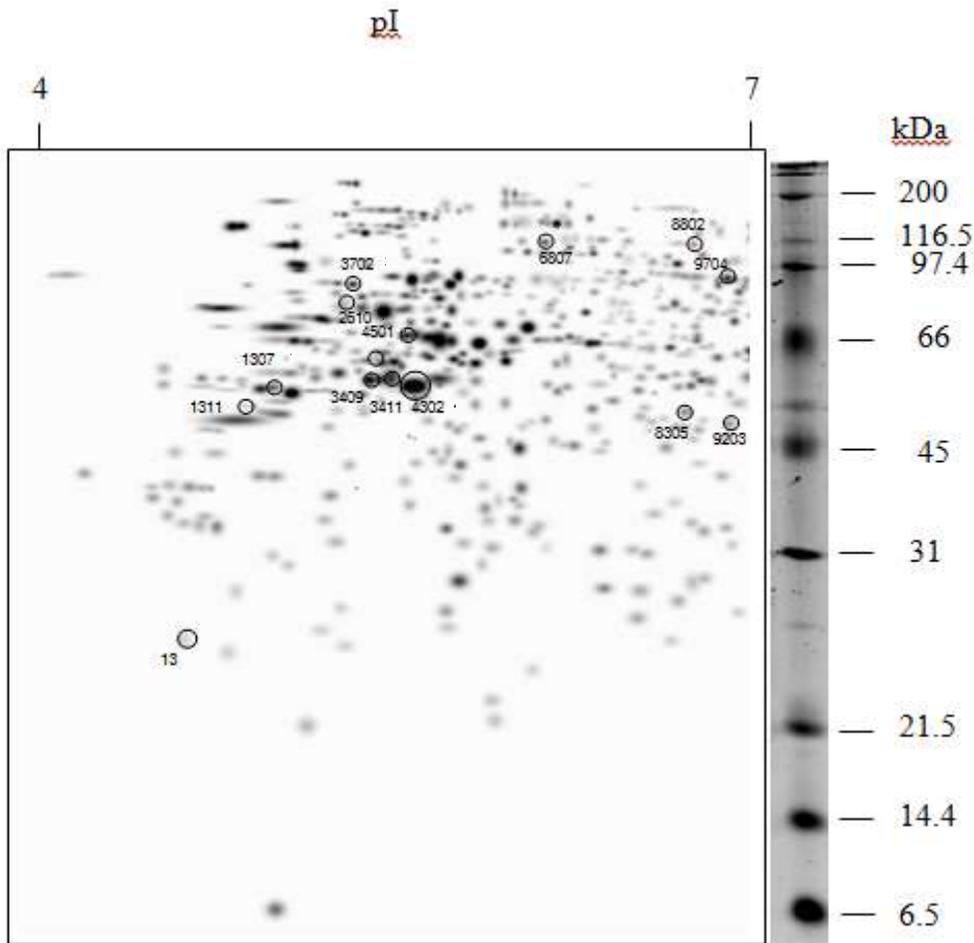


Figura 68. Gel máster.

Para el análisis proteómico de las proteínas del citoesqueleto se necesitaron extractos de proteínas de células HT29 expuestas durante un tiempo de 24 h a concentraciones de 0, 3,75 y 30 μM de AM. Estos extractos fueron analizados por 2-DE. Tres geles se prepararon para cada tratamiento.

En primer lugar se examinó el efecto de AM sobre la viabilidad de la línea celulares HT29 de cáncer de colon utilizando el ensayo MTT y los resultados que obtuvimos, son los descritos anteriormente para este compuesto, de este modo, el porcentaje de células se redujo de forma concomitante con la dosis de AM empleada. En este caso, obtuvimos una IC_{50} de $30 \pm 0,5 \mu\text{M}$.

El gel máster contiene la superposición de todas las manchas de proteínas detectadas en estos geles, en total 9. Este gel master fue elegido como un gel de referencia para el estudio, y los otros geles fueron comparados con él.

Se identificaron un total de 504 spots correspondientes a proteínas en el gel principal con masas moleculares (P_m) de 6,5 a 200 kDa. El punto isoeléctrico (pI) varió de 4 a 7, Figura 68. Las proteínas expresadas entre los dos grupos experimentales, para ser significativamente diferentes, debían regirse de acuerdo a los siguientes criterios:

- 1) que la diferencia entre spots sea como mínimo 2 veces la intensidad
- 2) que el cambio se mantuviera en las tres réplicas que había para cada condición

En el análisis cuantitativo de los geles se encontraron 40 spots proteicos alterados significativamente con respecto al control sin AM. De todas las proteínas expresadas diferencialmente, 14 spots proteicos se identificaron como pertenecientes a proteínas del citoesqueleto (Tabla 8).

La identificación se basó en la coincidencia de al menos 3 péptidos. Se realizaron búsquedas en todas las bases de datos con principales picos espectrales y los errores que coincidan con $\leq 50 \text{ ppm}$.

Las manchas proteicas correspondientes a las proteínas del citoesqueleto se identificaron a partir de proteínas o secuencias de cDNA ya descrito en especies de mamíferos como el *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, y *Pan troglodytes*.

Los resultados demostraron que el AM provocó la “up-regulación” (aumento) de 12 de las catorce proteínas identificadas: queratina 2, la queratina tipo II citoesqueletal 8, queratina tipo I citoesqueletal 9, queratina tipo I citoesqueletal 18, citoqueratina 18, citoqueratina 19, β -actina, lamina B1, gelsolina isoforma 1, septina 2, villina 1, proteína 2 relacionada con actina y moesina. siete de estas proteínas: queratina 2, citoqueratina 19, lamina B1, gelsolina isoforma1, villina 1, proteína 2 relacionada con actina y moesina, se sobreexpresaron con el tratamiento con $IC_{50/8}$, mientras que las 5 restantes: queratina tipo II citoesqueletal 8, queratina tipo I citoesqueletal 9, queratina tipo I citoesqueletal 18, β -actina y septina 2 se vieron sobre-expresadas con el tratamiento con IC_{50} (Figura 69).

Por otro lado, el AM desencadenó la “down-regulación” (disminución) de 4 de las proteínas identificadas después del tratamiento con $IC_{50/8}$: la queratina 8, queratina tipo I citoesqueletal 18, citoqueratina 18 y β -actina. Además, el AM produjo down-regulación de dos de estas proteínas, queratina 8 y citoqueratina 18, después del tratamiento con IC_{50} .

Para corroborar nuestros resultados obtenidos con las técnicas de proteómica hemos realizado un inmunoblotting mediante Western Blot. Los resultados de tres de las proteínas alteradas en los ensayos de proteómica las analizamos también por western: moesina, β -actina, y villina 1 (Figura. 69).

Tabla 8. Conjunto de proteínas identificadas por MS y búsqueda en la base de datos

Spot ^a	Identificación	Especie	Masa/Pi (kDa/pI)	Peptidos matcheados ^b	Número acceso (ID) (gi)	Mowse Score ^c	Coverage (%) ^d
0013	Queratina 2	<i>Homo sapiens</i>	65.68/8.07	11	47132620	440	29
1307	Citoqueratina 19	<i>Homo sapiens</i>	44.06/5.04	31	90111766	875	76
1311	Queratina tipo II citosqueletal 8	<i>Homo sapiens</i>	53.67/5.52	10	4504919	136	27
2610	Queratina tipo I citosqueletal 9	<i>Homo sapiens</i>	62.25/5.14	10	55956899	116	24
3409	β-Actina	<i>Homo sapiens</i>	41.32/5.56	23	14250401	743	63
3411	Queratina tipo I citosqueletal 18	<i>Homo sapiens</i>	48.03/5.34	33	4557888	860	70
3702	Lamina B1	<i>Homo sapiens</i>	66.65/5.13	24	15126742	363	45
4302	Citoqueratina 18	<i>Homo sapiens</i>	47.30/5.27	30	30311	777	72
4501	Queratina 8	<i>Homo sapiens</i>	53.77/5.52	26	49256423	558	57
6807	Gelsolina isoform 1	<i>Pan troglodytes</i>	72.40/8.03	17	114626487	267	40
8305	Septina 2	<i>Homo sapiens</i>	42.35/6.05	12	40788885	396	48
8802	Villina 1	<i>Homo sapiens</i>	93.12/5.93	11	62898357	76	16
9203	Actina-relacionada con la proteína 2	<i>Rattus norvegicus</i>	44.99/6.3	8	57164143	98	28
9704	Moesina	<i>Homo sapiens</i>	67.89/6.08	33	4505257	501	51

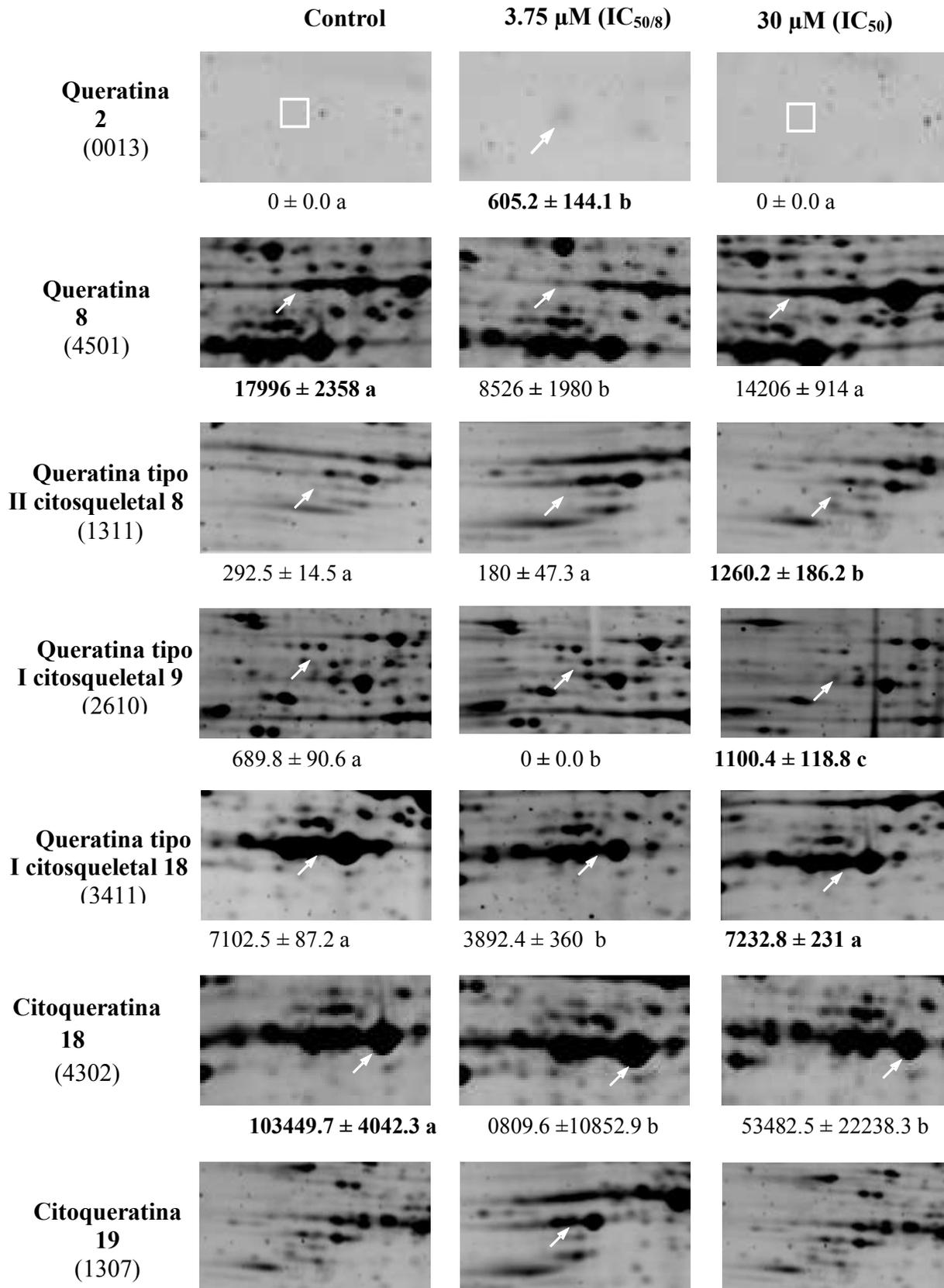
^a The ID number refers to spots listed in Fig. 69.

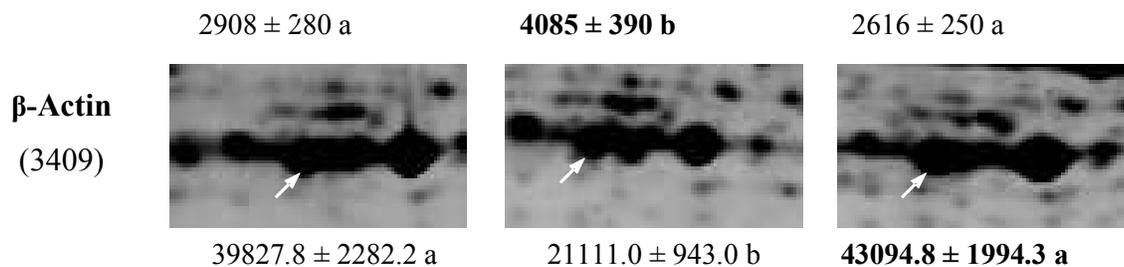
^b Number of peptides fragmented with homology

^c MASCOT score > score corresponding to p<0.001 (probability >99.9%).

^d Coverage percentage of the peptide sequence homology.

A. Proteínas del citoesqueleto con función estructural





B Proteínas relacionadas con la nucleación de la actina y formación del citoesqueleto

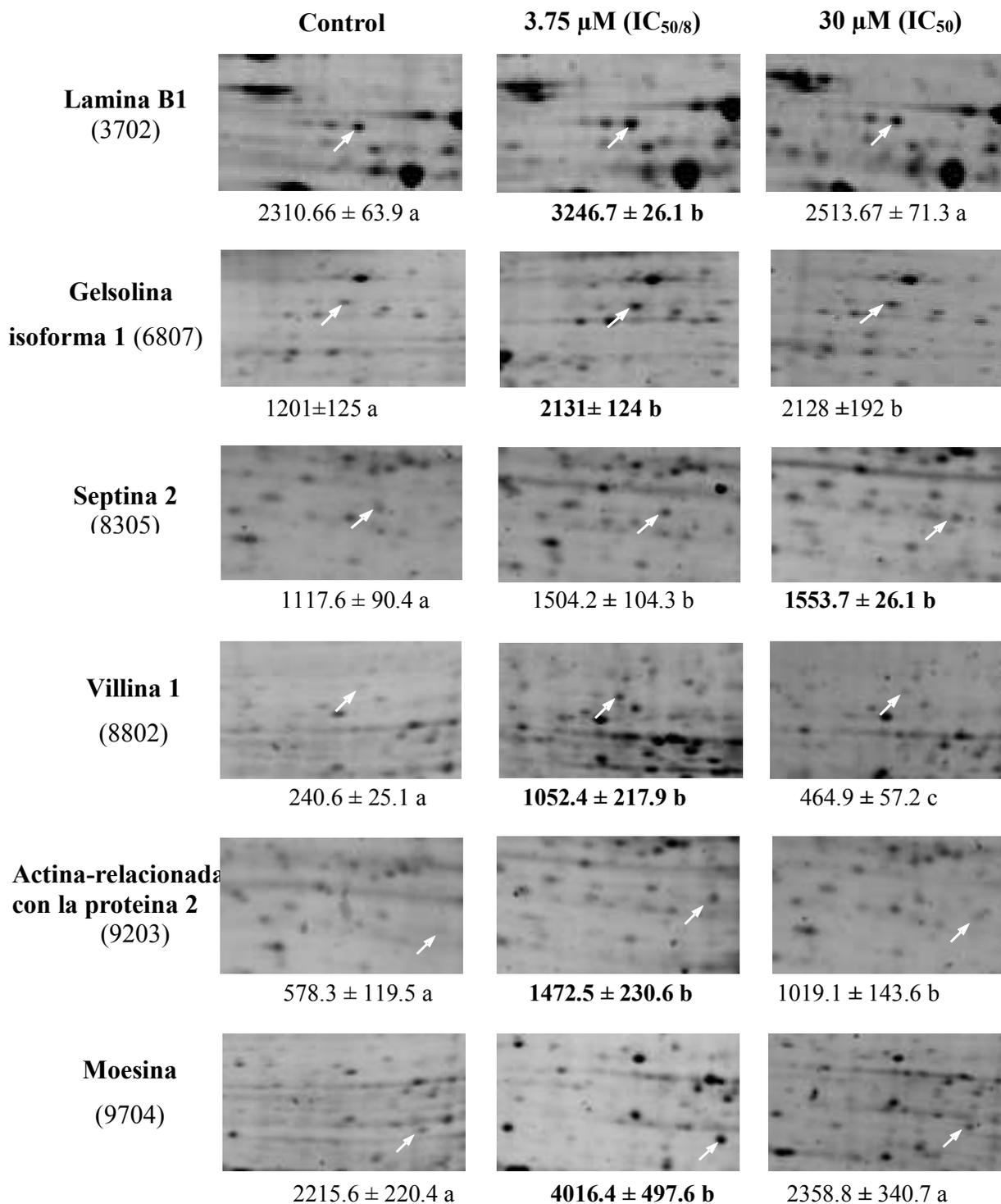


Figure 69. Imágenes 2-DE que muestran la expresión diferencial de las 14 proteínas identificadas del citoesqueleto. Se agruparon en 2 categorías: 1) estructurales, y 2) en relación con la nucleación y la formación del citoesqueleto de actina. Las intensidades (en unidades arbitrarias) se dan como la media \pm SEM debajo de las secciones de gel 2-DE. Las flechas indican los puntos (spots) fuertes y los recuadros aparecen en las manchas difusas y difícilmente identificable. Los números en negrita indican los sitios con mayores intensidades.

Las células HT29 fueron tratados con 0, 3,75 y 30 μ M de AM para un máximo de 24 horas antes de ser cosechadas y su total proteínas extraídas. Los cambios observados en la expresión de moesina (Figura. 70A), villina 1 (Fig. 70B) y β -actina (Fig. 70C) por inmunotransferencia están de acuerdo en la calidad y cantidad de los encontrado previamente en el análisis proteómico. Estos resultados corroboran el patrón de expresión alterada visto por el enfoque proteómico para estas tres proteínas ensayadas.

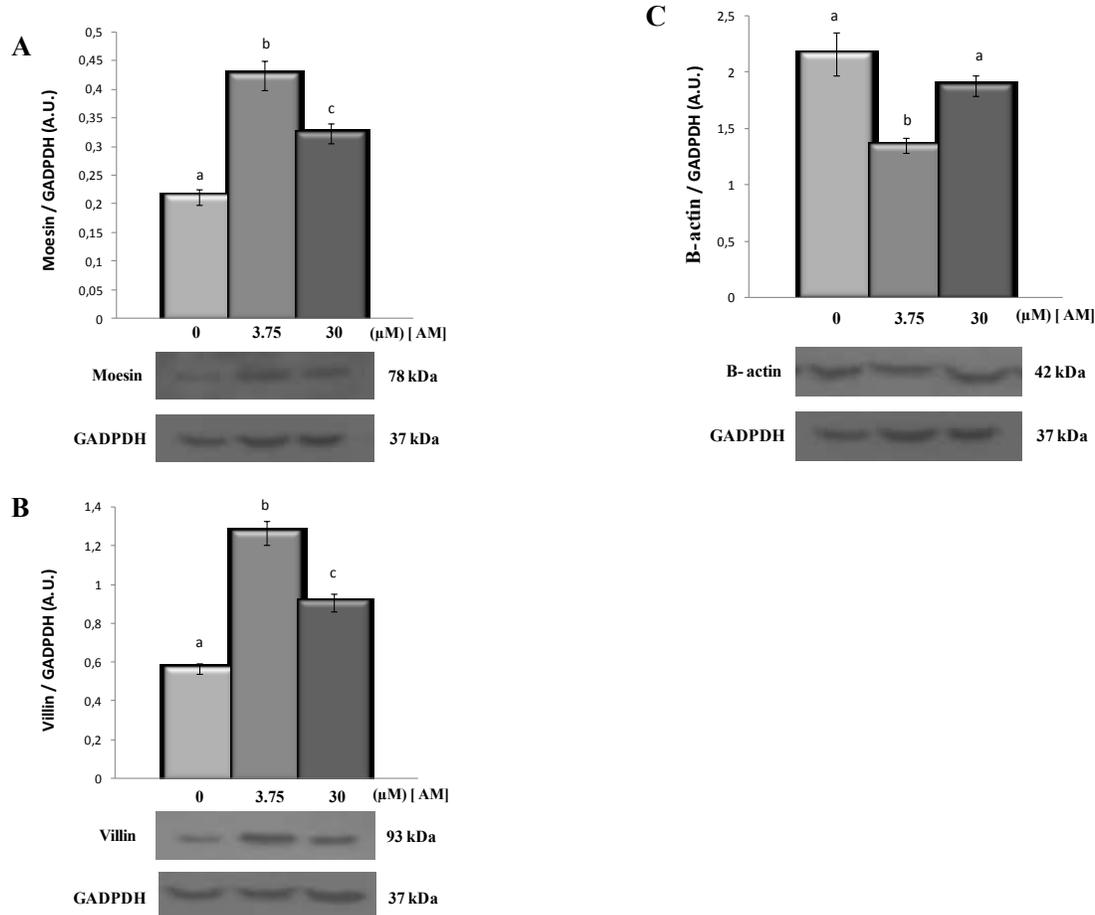


Figura 70. Análisis por Western-blot las proteínas de moesina (A), villina 1 (B) y β -actina (C). Niveles de estas proteínas en células HT29 expuestas a 0, 3,75 y 30 μ M de ácido maslínico. Las proteínas de los extractos citosólicos de células HT29 se sometieron a 12% SDS-PAGE y luego se transfieren a una membrana de difluoruro de polivinilideno. La cantidad de proteínas cargada fue de 50 μ g en todos los casos. El polipéptido correspondiente a la forma monomérica de las proteínas fue detectado con antisuero específico. La cuantificación de los niveles de proteína mediante análisis densitométrico se muestra en la barra gráfica. Los resultados son la media \pm SEM de seis valores y se expresan como unidades arbitrarias de densidad óptica integrada en comparación con la señal del gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPDH). Las barras con letras diferentes son significativamente diferente ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

Para asegurar la viabilidad, el crecimiento y las diversas funciones celulares, un balance redox intracelular se hace necesario (Sen, 2000). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros radicales libres se producen en el organismo de forma natural debido a la naturaleza del propio metabolismo aeróbico de las células (Blanchetot y Boonstra, 2008). Sin embargo, una parte importante de los ROS que interactúan con el organismo y las células provienen de fuentes exógenas como la radiación solar, la contaminación ambiental, las drogas, la dieta, el ejercicio intenso o el tabaco (Ajila y Prasada Rao, 2008).

Existen un gran número de evidencias que sugieren que las concentraciones excesivas de ROS en el cuerpo humano están implicadas en distintos eventos patológicos y que el daño oxidativo sobre los componentes celulares puede jugar un papel crucial en el transcurso de enfermedades relacionadas con el estrés celular (Singh y Rajini, 2008).

Los seres vivos disponen de mecanismos de defensa endógenos y exógenos para limitar los niveles de ROS y el daño que causan (Ames y col., 1993). Estos sistemas de defensa incluyen enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, así como compuestos antioxidantes no enzimáticos como son el glutatión, polifenoles y ácido ascórbico. Se conoce que un desequilibrio entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes de las células está asociado a condiciones fisiológicas y patológicas, como son el cáncer, arteriosclerosis, artritis reumatoide, envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas (Ajila y Prasada Rao, 2008).

De ahí surge el creciente interés de la comunidad científica por obtener sustancias de origen natural que encaminen sus efectos a la prevención y tratamiento de este tipo de patologías y alteraciones ocasionadas por ROS. En este contexto, es crucial conocer la caracterización de las funciones bioquímicas protectoras de antioxidantes de origen natural y el estudio de sus mecanismos de acción. Los fitoquímicos son un gran número de

constituyentes de las plantas, y se han descrito sus propiedades antioxidantes (Medina y col., 2006). Dentro de este extenso grupo de sustancias, destaca la familia de los triterpenos, cuyo máximo representante es el ácido maslínico.

V.1. Actividad antioxidante

En determinadas situaciones de estrés, el aumento de la tasa metabólica favorece una mayor generación de radicales libres que puede superar la capacidad antioxidante celular (Gerriero y col., 2002), conduciendo a una situación de estrés oxidativo (Tort y col., 1996). En este sentido, el ácido maslínico puede jugar un papel fundamental.

Estudios con ácido maslínico han demostrado, en múltiples experimentos realizados anteriormente en diferentes tipos celulares, que éste posee propiedades antioxidantes, donde se ha hallado la reducción de radicales libres intracelulares tras su uso (Montilla y col., 2003; Márquez-Martín y col., 2006a; Allouche y col., 2011; Qian y col., 2011); este hecho podría calificar al AM como un agente preventivo en la generación de distintas enfermedades humanas relacionadas con el estrés oxidativo.

Debido a que el significado y la relevancia de la evaluación de la actividad antioxidante dependen en gran parte del método aplicado, la caracterización adecuada de un agente antioxidante debe realizarse mediante una batería de ensayos que proporcionen información diversa y complementaria para una adecuada interpretación de los resultados.

Así, para caracterizar la actividad antioxidante del ácido maslínico que forma parte de este estudio, se ha utilizado como modelo, líneas de células normales, A10 y células tumorales, B16-F10, previamente estresadas con diferentes tratamientos.

El estudio consistió en determinar viabilidad celular, actividad celular por DHR, concentración de proteínas citosólicas, y la actividad y expresión por western blot de ciertas enzimas relacionadas con la defensa antioxidante. Los resultados encontrados en la línea celular tumoral fueron diferentes a los que se observaron en la línea celular

normal. El ácido maslínico produjo efectos diferentes en ambas líneas celulares y además actuó de forma distinta en respuesta a los tratamientos estresantes empleados.

V.1.1. Estudio de viabilidad celular (MTT)

Con objeto de determinar el nivel de proliferación y viabilidad celular de las líneas B16-F10 y A10 frente a los tratamientos estresantes y al ácido maslínico se realizó el ensayo MTT.

En primer lugar, nos planteamos qué concentraciones de ácido maslínico (AM) utilizar en este estudio *in vitro*, para ello acordamos que debían ser concentraciones subcitotóxicas por lo que se determinó cómo cambiaba la viabilidad del cultivo en función de la concentración de ácido maslínico adicionada al mismo. Estas concentraciones variaron en función de la línea celular, y del tratamiento estresante empleado.

El efecto del AM sobre líneas celulares ya había sido estudiado anteriormente (Reyes y col., 2006; Reyes y col., 2009) y, efectivamente, al igual que en los resultados del presente trabajo, se obtuvieron diferentes IC_{50} en función de la línea celular empleada. Estudios previos demostraron que para la línea celular HT29 la IC_{50} era de 61 μM y para Caco-2 de 85 μM (Reyes y col., 2006), sin embargo no se encontraron efectos sobre la viabilidad en líneas celulares normales, IEC-6 y IEC-18, en las cuales el ácido maslínico no produjo efecto citotóxico (Reyes y col, 2006).

La viabilidad celular en este estudio se realizó bajo tres condiciones diferentes de estrés. En primer lugar, pretendimos evaluar como posible agente estresante, la ausencia de factores de crecimiento *in vitro*.

En segundo lugar, se ha utilizado el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como sistema generador de radicales del oxígeno, ya que se sabe que esta especie reactiva, cuando se presenta en exceso es uno de los principales compuestos que puede ser perjudicial para las células (Sroka y Cisowski, 2003), a elevadas concentraciones induce necrosis celular, mientras que a bajas concentraciones induce apoptosis.

Finalmente, se ha probado el nitropruiato sódico (SNP) que forma parte de los compuestos precursores de óxido nítrico (NO), ya que se metaboliza en las membranas celulares (por reducción) a cianógeno y NO. Asimismo, el NO. es un agente tóxico (radical libre; moléculas que contienen un electrón no apareado, esta característica los hace sumamente reactivos y capaces de dañar a otras moléculas transformándolas a su vez en moléculas muy reactivas, una reacción en cadena que causa daño oxidativo, desde células hasta tejidos) conocido como especie reactiva de nitrógeno (RNS), el cual, al incrementar su concentración favorece reacciones oxidantes y por tanto aumenta el proceso de estrés oxidativo.

Este proceso induce en la célula efectos tóxicos por oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos, lo cual produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis. Estas tres condiciones experimentales, se emplearon como modelo oxidativo en ambas líneas celulares, con objeto de determinar la capacidad antioxidante del ácido maslínico.

Al analizar los resultados obtenidos en este trabajo, se puede observar que en células B16-F10 con FBS, el AM presenta un efecto diferente según existan factores de crecimiento en el medio de cultivo, o no los hayan; de tal manera que la menor IC_{50} se encuentra en este último caso, deduciéndose de este resultado, que el AM presenta un efecto citotóxico mayor en ausencia de FBS en células B16-F10.

Este hecho puede explicarse, ya que el AM presenta un mayor efecto citotóxico cuando la célula está estresada, en este caso, cuando no presenta factores de crecimiento, lo cual resulta lógico, pues el AM presenta un marcado carácter apoptótico en células cancerígenas, tal y como se ha puesto de manifiesto en otros estudios (Reyes-Zurita y col., 2009, Parra, y col., 2011).

El AM no produjo efecto alguno en células normales, A10 con FBS (Figura 15), pues en ningún momento se vio disminución en la población de células. Dosis altas de AM no

provocaron cambios en la viabilidad celular de A10, resultado encontrado también en otras líneas normales y a distintas dosis (Reyes y col., 2006). Este hecho demuestra que el AM no presenta citotoxicidad para las células normales. Sin embargo, y por otro lado, cuando a la célula normal, la estresamos privándola de factores de crecimiento, obtenemos unos valores de IC_{50} de 25,4 μ M. Si comparamos las IC_{50} para ambas líneas celulares en ausencia de FBS, observamos que el AM afecta a dosis más bajas a la célula tumoral que a la normal, es decir en ausencia de factores de crecimiento y posible situación de estrés celular, las células normales sufren menos ante dosis más altas de AM, que las células tumorales, que se ven más afectadas por el compuesto.

En células de astrocinoma, se ha determinado que el ácido maslínico puede inducir vías oxidativas y apoptóticas, causando alteraciones del ciclo celular y del citoesqueleto a concentraciones superiores a la IC_{50} (50 μ mol/L) (Martín y col., 2007). Al tomar en cuenta estos resultados, y los estudios de concentración obtenidos, se trabajó con dosis por debajo y cercanas a la IC_{50} , ya que el interés del estudio no era inducir apoptosis o estrés en respuesta al AM, sino si este compuesto podría reducir el estrés ocasionado en respuesta a los diferentes tratamientos.

Estudios previos han demostrado, claramente, la influencia del H_2O_2 sobre el crecimiento y muerte de distintos tipos celulares. En células SH-5YSY la exposición a diferentes concentraciones de peróxido redujo la viabilidad celular, siendo totalmente citotóxico a la concentración de 300 μ M (Rafatian y col., 2012).

En fibroblastos de pulmón humanos (HPF) normales, los ensayos de MTT realizados, demostraron que el H_2O_2 inhibe el crecimiento de estas células con un IC_{50} próximo a 50 μ M, a 24 h de tratamiento, que fue acompañado por la expresión de la caspasa-3 y la pérdida de potencial de membrana mitocondrial (Park, 2013).

Nuestros resultados, por su parte, pusieron de manifiesto que el H_2O_2 disminuye la viabilidad celular tanto en células normales, como en cancerígenas y que lo hace a bajas concentraciones. Las IC_{50} obtenidas en ambos casos fueron 0,20 mM (Figura 16).

El presente estudio demostró una reducción en la viabilidad celular por parte del SNP (Figura 17), el cual provocó una sensibilidad mayor en células normales (A10) que en células tumorales (B16F10), de modo que la población de las primeras disminuye paulatinamente pero a concentraciones más bajas que las tumorales, alcanzando una viabilidad del 50% a 0,248 mM, mientras que esta viabilidad para B16-F10 se vio a 0,882 mM.

Además, se pudo observar que, como tratamiento estresante, este compuesto presentaba un menor efecto que el H₂O₂, el cual resultó ser un oxidante mucho mayor, ya que las IC₅₀ determinadas fueron menores que las obtenidas para SNP.

El efecto inhibitor del crecimiento celular producido por el SNP ha sido estudiado con anterioridad. Se conoce que el SNP libera subproductos durante su descomposición, como el cianuro de hierro, NO y las especies reactivas de oxígeno (ROS), que generan su citotoxicidad (Wink y col., 1996; Cardaci y col., 2008).

Estudios realizados en ratones, para la determinación del estrés oxidativo producido por los subproductos del SNP, sugieren que la muerte celular inducida por la inyección de SNP, es causada por el hierro mas no por el anión NO y el cianuro (Nazari y col, 2012).

Los valores de IC₅₀ obtenidos para cada tratamiento se encuentran en la Tabla 6, a modo de resumen. Estos valores nos permitieron conocer las dosis más tóxicas de nuestros tratamientos, y a partir de ellas utilizar concentraciones subcitotóxicas de las mismas para los experimentos posteriores.

V.1.2. Determinación de la concentración de proteínas

En todos los tratamientos empleados en este ensayo, así como en ambas líneas celulares se determinó el contenido de proteínas, por BCA. La cantidad de proteína en un extracto celular, es representativa de la cantidad celular que existe, y además permite realizar los estudios enzimáticos y de expresión de un modo más fiable, ya que ambos dependen de la cantidad de proteína.

En las células B16-F10, se obtuvo una disminución significativa de la concentración proteica, para los tratamientos en ausencia de factores de crecimiento y presencia de ácido maslínico. Esta disminución de la concentración de proteínas se corresponde con los resultados de viabilidad celular que obtuvimos, indicando así que esta concentración es dependiente de la supervivencia celular (Figura 18).

El mismo tratamiento, pero esta vez realizado en células A10, produjo una reducción de la concentración de proteínas en los tratamientos con suero a todas las concentraciones elevadas de AM (Figura 19). Como era de esperarse, la ausencia de FBS en esta línea celular, con tratamientos de ácido maslínico a concentraciones inferiores a las del IC₅₀, no mostró variaciones en la concentración de proteínas.

En las células tumorales B16-F10 los tratamientos realizados con los agentes estresantes (H₂O₂ y SNP) y la posterior adición de AM, a las concentraciones utilizadas en los ensayos de ausencia y presencia de FBS no mostraron una modificación de la concentración proteica.

Esto podría indicar dos posibles causas: primero, que los agentes oxidantes usados no generaron sobre las células tumorales estrés suficiente para colocar en riesgo la viabilidad de éstas como lo hizo la ausencia de factores de crecimiento, y segundo, que el ácido maslínico permitió la recuperación del daño celular causado por los agentes oxidantes evitando la muerte celular y la pérdida de proteínas citoplasmáticas. La segunda opción propuesta se correspondió de mejor forma con los resultados posteriores, sobre todo en los resultados mostrados en las células normales A10.

V.1.3. Estudio de la actividad celular por citometría de flujo (1, 2, 3 DHR)

El estudio de la 1, 2, 3 DHR fue empleado como marcador de estrés oxidativo, ya que este compuesto se transforma en rodamina ante estados celulares de estrés, fluoresce, y se examina cuantitativamente mediante citometría de flujo. De esta manera, este estudio

permitió determinar la actividad de células normales y células tumorales frente a los distintos tratamientos de estrés.

El significativo aumento de la actividad celular en las dos líneas trabajadas, en relación al incremento del tiempo de exposición de éstas a los compuestos estresantes utilizados, indica una mayor producción de peróxido de hidrógeno citosólico, lo cual podría explicarse, a su vez, en el incremento de la actividad superóxido dismutasa intracelular (Park, 2013). Asimismo, se observa que existe un incremento en la actividad celular, cuando aumentamos las dosis de SNP y H₂O₂.

Esto se observó en ambas líneas celulares. Así, podemos concluir, que la actividad celular, entendida como un exceso en la producción de H₂O₂ intracelular, y aumento del estado redox, fue dependiente de la dosis de compuesto empleada y del tiempo de exposición.

En células B16-F10 observamos que el estrés celular ocasionado por el SNP a una concentración de 200 µM no disminuyó con ninguna de las dosis empleadas de AM, sino que aumentó. Sin embargo, este aumento fue menor a dosis elevadas de AM, en los que se producía un descenso de la actividad celular, aunque ésta seguía estando más estresada que las controles con SNP sin AM. Un efecto similar se encontró en presencia de peróxido de hidrógeno sumado al AM.

Estos resultados sugieren que el AM no presenta un efecto antioxidante en líneas celulares tumorales, lo que es beneficioso por un lado, porque el estrés es síntoma de apoptosis, y pérdida de viabilidad en diferentes tipos de tumores y el AM puede tener ese efecto en estas células, tal y como se ha demostrado con anterioridad en otras líneas celulares (Reyes-Zurita y col., 2009).

A partir de estos resultados, decidimos incubar las células con el compuesto estresante durante 3 h, en donde existe actividad celular, pero ésta puede ser revertida, es decir, que el daño celular no es letal para la vida de la célula. El objetivo es la evaluación del AM

como posible antioxidante, disminuyendo ese exceso de actividad generada en respuesta al H_2O_2 y SNP.

Los tratamientos con AM en células B16-F10 previamente estresadas con SNP mostraron que la actividad celular se reduce, en parte, de manera dosis-dependiente, teniendo un pico máximo de actividad a la concentración de ácido maslínico de $21,6 \mu M$. Esta actividad, en todas las situaciones experimentales en donde se añadió AM, la actividad fue superior significativamente con respecto al control con SNP.

Un comportamiento similar fue obtenido en las células A10, donde a diferencia de los resultados con las células B16-F10, el pico de actividad máxima se obtuvo a una concentración de AM de $10,6 \mu M$, en los tratamientos con H_2O_2 .

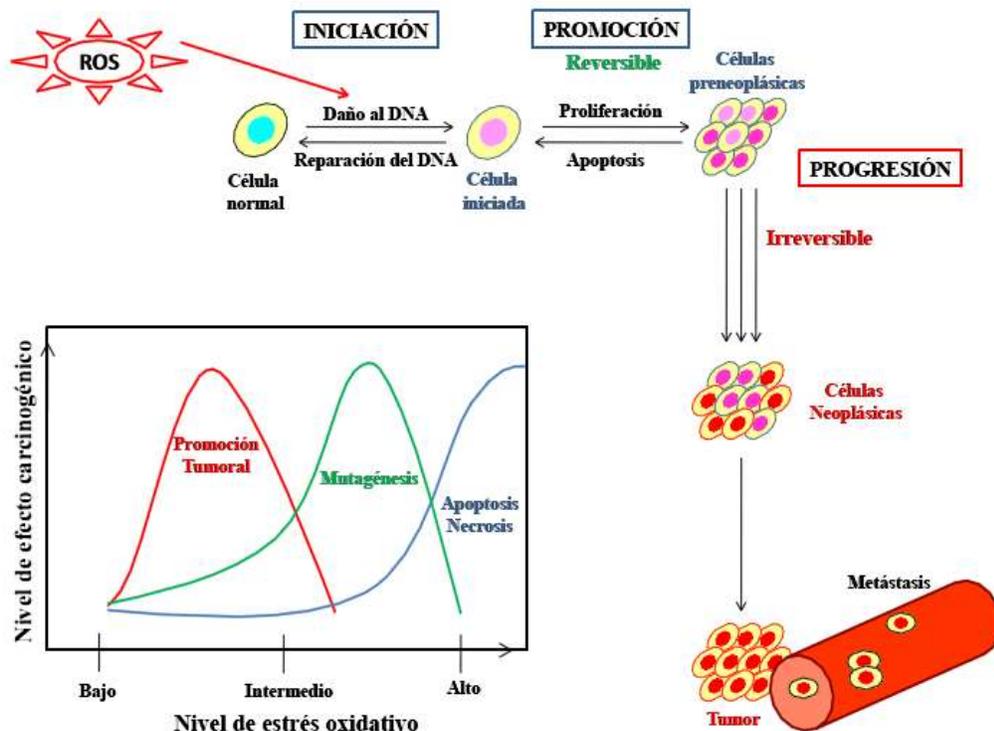


Figura 71. Efecto carcinogénico en relación al estrés oxidativo.

El efecto del AM sobre la línea celular normal fue diferente al encontrado en la tumoral. Los resultados encontrados muestran que el AM actúa como un potente agente antioxidante ya que es capaz de disminuir el estrés celular ocasionado por los compuestos SNP y H_2O_2 en estas células, de tal manera, que la mayor actividad celular encontrada cuando aumentamos las condiciones oxidantes, son revertidas en presencia de AM.

Este efecto antioxidante del AM es dependiente de la dosis empleada, de forma que a mayores dosis del compuesto, se produjo una mayor disminución del estrés celular. La disminución de la actividad celular demuestra una reducción de la producción de peróxido de hidrógeno citosólico, lo cual podría indicar una disminución en la actividad superóxido dismutasa intracelular (Park y col., 2013).

Otros ensayos, realizados con los triterpenos, Uvaol, ácidos oleanólico y maslínico, a las concentraciones de 10 y 100 μM , se ha visto que reducen el nivel intracelular de ROS y previenen la lesión oxidativa inducida por H_2O_2 (Allouche y col. 2011). Estos resultados coinciden con los encontrados en estos ensayos experimentales.

V.1.4. Actividad y expresión superóxido dismutasa (SOD)

Los resultados mostraron un aumento de la actividad enzimática y de la expresión proteica de la enzima SOD, por la acción del ácido maslínico de forma dosis dependiente, en los dos tipos celulares en ausencia de factores de crecimiento, siendo mayor la actividad en la línea A10

Estudios recientes han demostrado que el H_2O_2 aumenta los niveles del anión superóxido (O_2^-) y de ROS intracelular y, a su vez incrementa la actividad de la superóxido dismutasa en células HPF (SOD) (Park, 2013). En relación con la investigación anterior, en este trabajo se demostró que la presencia de H_2O_2 aumenta la actividad SOD en las células A10, pero que la posterior adición de AM al cultivo celular, previamente estresado con este agente, es capaz de contrarrestar tanto el aumento de esta actividad como la expresión proteica de dicha enzima, reduciendo ambas de forma dosis dependiente; estos

resultados concuerdan con lo que se esperaría según lo obtenido en la actividad enzimática.

En las células B16-F10, se obtuvo un comportamiento similar en la actividad enzimática al generar estrés con H₂O₂: un aumento de la actividad SOD, con una posterior reducción y estabilización de dicha actividad con la adición de AM. Sin embargo, la expresión de la enzima aumentó de forma dosis dependiente con la adición del AM.

Estudios realizados en diferentes tipos celulares han demostrado que la actividad superóxido dismutasa se incrementa en presencia de nitroprusiato de sodio (SNP). Este efecto ha sido probado en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) donde ha incrementado la actividad SOD 1,3 veces (Lushchak y Lushchak, 2009), en fibroblastos de ratón (NIH-3T3), (Bittencourt y col., 2013), en larvas *Drosophila melanogaster* (Lozinsky y col., 2012), etc.

En relación a esto, nuestro estudio demostró el aumento de la actividad enzimática SOD en la línea celular tumoral (B16-F10) y, por el contrario la reducción en la línea celular normal (A10), en presencia de SNP.

Al añadir AM la actividad SOD incrementaba aún más en A10 y B16-F10. Efecto similar al encontrado en los estudios realizados por Bittencourt y col., (2013) con extractos de guaraná. Esto sugiere que el AM en presencia de SNP puede modular esta enzima relacionada con el radical superóxido. En ambas líneas celulares ocurrió una reducción de la expresión proteica SOD en presencia de SNP y AM.

V.1.5. Actividad y expresión Catalasa (CAT)

Se demostró que el AM causa el incremento inicial de la actividad enzimática CAT, en los dos tipos celulares en ausencia de factores de crecimiento, a concentraciones bajas (IC_{50/8}). Esta actividad enzimática, se reduce posteriormente a concentraciones más elevadas de AM de forma dosis dependiente. Sin embargo, la expresión de dicha enzima presenta un comportamiento distinto en función de la línea celular.

En células A10 la expresión de CAT se reduce y se mantiene estable al añadir el AM y, en B16-F10, la expresión proteica aumenta de forma dosis dependiente con la adición de AM. Efectos similares en la expresión de CAT, han sido registrados en dorada, donde estos niveles se incrementan en presencia de ácido maslínico (Rufino-Palomares y col., 2011).

Se demostró, asimismo, que la presencia del agente estresante H_2O_2 , aumenta la actividad CAT en las células A10. La posterior adición de AM al cultivo celular, incrementa aún más esta actividad a concentraciones bajas iniciales ($5 \mu\text{g/mL}$) y la reduce posteriormente, de forma dosis dependiente, a concentraciones más elevadas. Esta reducción se corresponde con la expresión de CAT.

En las células B16-F10, se demostró que la presencia de H_2O_2 reduce la actividad CAT, y que la posterior adición de AM, incrementa esta actividad a concentraciones bajas iniciales y la reduce posteriormente, de forma dosis dependiente, a concentraciones más elevadas de AM, sin alcanzar los niveles de actividad encontrada con H_2O_2 únicamente. Un comportamiento diferente se encontró en los resultados de expresión proteica CAT.

La presencia del agente estresante SNP aumenta la actividad CAT en las células A10. La adición de AM, incrementa aún más esta actividad a concentraciones bajas iniciales (5 y $10 \mu\text{g/mL}$) y la reduce posteriormente, de forma dosis dependiente, a concentraciones más elevadas (20 y $40 \mu\text{g/mL}$).

La expresión de CAT fue mayor en presencia de SNP, y se redujo de forma dosis dependiente en presencia de AM, disminuyendo de tal forma que los valores de expresión encontrados estuvieron por debajo de los niveles de expresión detectada con SNP, sugiriendo que este compuesto es capaz a todas las dosis administradas de revertir el estrés que se ocasiona en respuesta al SNP, de tal modo, que el AM pudiera actuar como agente antioxidante (Allouche y col., 2011).

Recientemente Bittencourt y col., (2013) encontraron que la presencia de SNP reduce la actividad catalasa en células NIH-3T3. Este resultado fue explicado como la inhibición

selectiva de CAT por la presencia de cianuro, producido a niveles bajos por el SNP (Bittencourt y col., 2013). Resultados similares han sido encontrados en larvas de *Drosophila melanogaster* (Lozinsky y col., 2012).

De acuerdo con este trabajo, esta investigación demostró que la presencia de SNP reduce la actividad CAT en células tumorales, y que la posterior adición de AM, incrementa esta actividad y la reduce posteriormente, de forma dosis dependiente, a concentraciones más elevadas. La expresión se mantuvo estable en presencia de SNP y AM en células B16-F10.

Diferentes estudios han encontrado que existe una relación inversa entre la actividad superóxido dismutasa y la actividad catalasa; estos han indicado que mientras la actividad SOD se incrementa, la actividad CAT se reduce (Felton y Summers, 1995; Pritsos y col, 1990; Lozinsky y col., 2012).

Por su parte, en el presente trabajo, fue hallado de forma general, que el AM es capaz de aumentar la actividad CAT mientras se disminuye la actividad SOD, pudiendo indicar la acción directa de la primera enzima, en la eliminación del H_2O_2 intracelular generado en situaciones de estrés oxidativo.

V.1.6. Actividad glutatión peroxidasa (GPX)

Se demostró que en las células A10, para todos los tratamientos generadores de estrés, el ácido maslínico genera una reducción leve de la actividad GPX, la cual solo resulta significativa en presencia de H_2O_2 .

De igual forma, fue demostrado que el ácido maslínico no genera cambios significativos en la actividad enzimática de las células tumorales (B16-F10), en los tratamientos estresantes de ausencia de FBS y presencia de H_2O_2 . Por el contrario, en los tratamientos con SNP, sí fue demostrado el aumento significativo de la actividad GPX en presencia de AM.

V.1.7. Actividad glutatión reductasa (GR)

Se demostró que el ácido maslínico fue capaz de causar una reducción de la actividad glutatión reductasa, de forma dosis dependiente, en todos los tratamientos generadores de estrés realizados en las dos líneas celulares. Esta reducción resultó mucho más pronunciada, en los tratamientos de H₂O₂ y SNP, en las células B16-F10.

La producción endógena de H₂O₂ es reducida por la glutatión peroxidasa (GPX) dependiente de selenio en presencia de GSH. Como consecuencia, GSH es oxidado a GSSG, el cual es rápidamente reducido por la enzima glutatión reductasa (GR), que requiere NADPH como cofactor, formando un ciclo redox celular.

Tanto GPX como GR se hallan predominantemente en el citosol, existiendo también cierta actividad en la mitocondria. GSH es particularmente importante en la mitocondria ya que no existe catalasa en ella. Por tanto GSH en la mitocondria es crítico en la defensa contra el estrés oxidativo (Fernandez-Checa, Kaplowitz y col., 1997; Garcia-Ruiz y Fernandez-Checa, 2006).

En condiciones normales, GR es totalmente efectiva para mantener GSH en su estado reducido. En situaciones de estrés oxidativo intenso donde la actividad de GR está afectada, la capacidad de la célula para reducir GSSG puede ser sobrepasada acumulándose GSSG en el citosol. Para protegerse, la célula puede activar la salida de GSSG al exterior de la célula o reaccionar con proteínas con grupos sulfhidrilo, proceso que puede deteriorar la función de dichas proteínas (Lu 2009).

La célula, dispone de un dispositivo que permite el intercambio de los grupos tiol-disulfido a través de la enzima tiol-transferasa que requiere la presencia de GSH. Estas reacciones son bidireccionales siendo su equilibrio determinado por el estado redox celular que a su vez dependerá de la concentración de GSH y GSSG (Lu 1999). Este equilibrio tiol-disulfido está implicado en numerosos procesos metabólicos como la

actividad enzimática, transportadora, señalización de transducción y expresión génica (Lu 1999).

V.1.8. Actividad y expresión glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)

Estudios previos han demostrado que una deficiencia en la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se relaciona con el aumento de las ROS intracelulares, mientras que la sobreexpresión de la actividad de dicha enzima, se relaciona con la reducción de los niveles de ROS en respuesta al estrés oxidativo (Leopold y col., 2003).

Nuestra investigación demostró que el ácido maslínico, genera una reducción dosis dependiente de la actividad G6PDH, en todos los tratamientos generadores de estrés realizados en las células A10.

Esto podría indicar que el AM es capaz, en todos los casos, de reducir los niveles de ROS intracelular mediante su actuación sobre otras enzimas antioxidantes, de forma tal que la actividad G6PDH no fuese necesaria.

La expresión proteica de la enzima en A10 se reduce con el AM de forma dosis dependiente correspondiéndose con la actividad enzimática.

De igual forma, la de reducción de la actividad G6PDH también fue demostrada en las células B16F10 en ausencia de factores de crecimiento; el comportamiento de la enzima a concentraciones bajas de AM ($IC_{50/8}$ e $IC_{50/4}$) generó un aumento de la expresión G6PDH con la posterior reducción a concentraciones más elevadas de AM que se corresponden con el comportamiento enzimático.

Por el contrario, el ácido maslínico fue capaz de generar un incremento mayor de la actividad G6PDH, con respecto a los tratamientos oxidantes con H_2O_2 y SNP, quienes también generaron un aumento a bajas concentraciones y se restableció al final con el control positivo efecto similar también en ausencia del suero excepto a altas

concentraciones genera una disminución de la actividad enzimática respecto al control positivo, en las células tumorales (B16-F10).

Un comportamiento similar al obtenido en nuestro trabajo, fue descrito sobre glóbulos rojos (Abboud y Al-Awaida, 2010), y en larvas de *Drosophila melanogaster* (Lozinsky y col., 2012), donde el SNP fue capaz de generar un aumento en la actividad G6PDH.

Con respecto a la acción del AM, se demostró que es capaz de mantener estable la actividad G6PDH respecto a los controles, indicando de esta manera la contribución en la reducción del estrés en dichas células generado por ROS.

El aumento de la actividad enzimática, al mismo tiempo, podría indicar que las células tumorales presentan un mecanismo menos eficiente en la eliminación de ROS ocasionado por H₂O₂ y SNP con respecto a las células A10, por lo cual es necesaria la activación de G6PDH en el control del estrés celular.

La expresión proteica en los tratamientos con H₂O₂ y AM indicó un aumento similar al de la actividad, mientras el tratamiento con SNP y AM mostró una expresión opuesta. Investigaciones realizadas con anterioridad en dorada, han indicado que la expresión de G6PDH se incrementa en presencia de ácido maslínico (Rufino-Palomares y col., 2011), efecto similar al obtenido en el tratamiento de H₂O₂ y AM.

V.1.9. Actividad y expresión glutatión S-Transferasa (GST)

Se demostró que el SNP, fue capaz de incrementar la actividad GST tanto en A10, y como en B16-F10, en concordancia con otros estudios realizados en *Drosophila melanogaster*, que han demostrado que el SNP es capaz de incrementar la actividad GST en larvas (Lozinsky y col., 2012).

Se demostró que el ácido maslínico fue capaz de causar una reducción de la GST, de forma dosis dependiente, en la mayoría de los tratamientos generadores de estrés

realizados en las dos líneas celulares. Esta reducción resulta diferente solamente en las células B16-F10, donde se genera a concentraciones más elevadas de AM (20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

En células A10, se demostró una reducción de la expresión GST de forma dosis dependiente, en todos los estados generadores de estrés. En B16-F10, se encontró un incremento de la expresión GST en ausencia de suero y en presencia de H_2O_2 , siendo significativa solo en el primer caso; para SNP, ocurrió una disminución de la expresión, sin significancia.

Con los resultados enzimáticos obtenidos, fue demostrada la acción del ácido maslínico en la modulación de la actividad de la mayoría de las enzimas reguladoras del estrés celular. La enzima catalasa mostró casi siempre un incremento a bajas concentraciones de AM. Estos resultados podrían indicar la acción directa de la enzima CAT sobre la eliminación del H_2O_2 intracelular, en la reducción del estrés celular. Dicho comportamiento general, fue hallado en casi todos los tratamientos; SOD se incrementó en presencia de SNP en células B16-F10 y G6PDH en todos los tratamientos de las células B16-F10.

Diferentes estudios podrían brindar información en la determinación de las modificaciones enzimáticas halladas. En algunas enfermedades como la inflamación crónica, diabetes, la inflamación, la neurodegeneración y el cáncer, la generación del peroxinitrito se produce principalmente por un aumento en los niveles de NO (Ahmad y col., 2009). Cuando el anión superóxido reacciona con las moléculas de NO, el peroxinitrito (PN, OONO^-) se forma a velocidad limitada.

Al mismo tiempo, el PN resulta clave en el daño oxidativo, principalmente porque su descomposición produce dióxido de nitrógeno, el radical hidroxilo, y el radical carbonato (Álvarez y col., 2002). Se sugiere que el ácido maslínico presenta un efecto antioxidante sobre el NO o sobre el peroxinitrito generado por la reacción de NO con el ión superóxido. Este podría ser el efecto generado por el AM frente al agente oxidante SNP.

Otros estudios deben ser realizados, sobre nuevas líneas celulares, para determinar las posibles causas de la modificación enzimática en presencia del ácido maslínico y agentes estresantes como los usados en este trabajo.

V.2. Proliferación celular

El efecto anticancerígeno o proliferativo podría depender de las dosis de AM utilizadas. Por ello, en este estudio, también, hemos pretendido evaluar si el AM presenta un efecto proliferativo sobre las líneas celulares de origen humano cultivadas *in vitro*, HT29 (carcinoma de colon) y HepG2 (hepatoma) en condiciones de privación de factores de crecimiento. Paralelamente, se evaluará el efecto estresante para las células que supone dicha privación.

Se ha observado que el AM presenta la capacidad de inducir un mayor crecimiento en animales completos (Fernández-Navarro y col., 2006; Fernández-Navarro y col., 2009; Rufino-Palomares y col., 2012a; Rufino-Palomares y col., 2012b). Asimismo, se ha descrito que el AM es un agente antitumoral. Existen numerosos trabajos que lo demuestran (Reyes y col., 2006; Reyes y col., 2009; Chenghai Li y col., 2010; Wu y col., 2011; Parra y col., 2011; Park y col., 2012; Mooi y col., 2012). Esto nos lleva a pensar, que el AM tiene un papel fundamental en la ruta de proliferación, relacionadas con los procesos de crecimiento, tanto normal, como patológico.

V.2.1. Estudio de viabilidad

En primer lugar, nos planteamos qué concentraciones de ácido maslínico (AM) utilizar en este estudio *in vitro*, para ello acordamos que debían ser concentraciones subcitotóxicas por lo que se determinó cómo cambiaba la viabilidad del cultivo en función de la concentración de ácido maslínico adicionada al mismo.

Estos ensayos se realizaron tanto con ácido maslínico del 98% de pureza, como con su sal sódica. Para evitar que el crecimiento del cultivo en respuesta al ácido maslínico fuera

enmascarado por la acción de los factores de crecimiento presentes en el suero se decidió cultivar las células en ausencia del mismo.

Esto tuvo dos efectos, por una parte nos permitió estudiar el efecto del ácido maslínico sin interferencias, pero por otra resultó ser oxidante ya que la ausencia de suero evita la división celular produciendo la muerte del cultivo transcurrido el tiempo suficiente.

Aun así los resultados obtenidos muestran que el ácido maslínico puede actuar de forma parecida a como lo haría un factor de crecimiento sobre células sometidas a privación de suero, ya que es capaz de activar las vías de proliferación a dosis bajas del mismo.

En relación al efecto del AM sobre los procesos de proliferación/supervivencia y muerte celular, se ha de mencionar que éste puede variar en función de la dosis utilizada. Así, las bajas concentraciones de este compuesto pueden promover mecanismos de supervivencia mediante la activación de la vía de proliferación/supervivencia o el incremento de los niveles de p-AKT.

La serina/treonina quinasa AKT es una de las principales diana de PIP3 (fosfatidilinositol-(3, 4, 5)-trifosfato), y en humanos se han descrito 3 isoformas diferentes (AKT1, AKT2 y AKT3). La unión de AKT a PIP3 provoca un cambio conformacional en AKT que hace que sea fosforilada y, por tanto, activada por las quinasas dependientes de fosfatidilinositol (PDKs) (Nicholson, KM., y col 2002)

Entre las dianas de AKT se incluyen múltiples factores de transcripción y proteínas de señalización, de manera que la activación de AKT deriva en el incremento de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL, XIAPs (Smith, DL., y col. 2007; Nicholson, KM. y col., 2002; Romashkova, JA., y col 1999), y de las proteínas de supervivencia como la propia AKT (Smith,DL. y col., 2007., Nicholson, KM. y col., 2002) y la disminución de los niveles de expresión o actividad de diversas proteínas proapoptóticas, como FasL y Bim (Smith, DL. y col.2007., Nicholson, KM. y col., 2002., Dijkers, PF. y col., 2000).

En la mayoría de los tipos celulares, los dímeros de NFκB se encuentran en el citoplasma unidos a la proteína IκB (inhibidora de NF-κB), y en esta situación son transcripcionalmente inactivos. La fosforilación de esta proteína inhibidora promueve su propia ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma, lo que permite la liberación de NFκB y su translocación al núcleo donde regula la transcripción de genes que codifican para un gran número de proteínas (citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular y proteínas pro- y anti-apoptóticas (Karin, M., y col., 2002, Naugler, WE. y col., 2008).

Resultados similares fueron encontrados en células HepG2, en donde estresaban a las células con H₂O₂, y posteriormente, las trataban con polifenoles viéndose que la ruta de proliferación era la vía de las MAPKs (ERKs, JNKs) (Granado-Serrano y col., 2006). En este estudio, se vio que las altas concentraciones de los polifenoles, como la quercetina, pueden ejercer un efecto pro-apoptótico mediante la activación de la cascada de caspasas y la reducción de los niveles fosforilados de AKT y ERKs (Granado-Serrano y col., 2010).

V.2.2. Estudio del ciclo celular

Parte del procedimiento experimental para evaluar el efecto del AM sobre la proliferación, consta, a su vez, de un análisis del ciclo celular por citometría de flujo mediante la incorporación de yoduro de propidio (IP) en HT29 y HepG2.

Como se ha comentado en el capítulo de resultados con respecto al control sin suero el ácido maslínico independientemente de la concentración utilizada fue capaz de producir un 30% menos de arresto en la fase G₀/G₁ que el control sin suero donde aproximadamente el 93% de las células se encontraba en esta fase del ciclo. Este efecto fue más acentuado al inicio del tratamiento tanto en las células HT29, como en HepG2, disminuyendo con el tiempo de incubación. De forma análoga al menor arresto en la fase G₀/G₁ del ciclo produjo un incremento en las fase S y G₂/M.

El hecho más llamativo con respecto a los resultados obtenidos en el análisis del ciclo celular es que independientemente de la concentración de ácido maslínico utilizada el ciclo se “acelera”. Aunque tanto los resultados obtenidos por conteo, como en el análisis de los ratios muestran que a la concentración citotóxica IC_{50} y subcitotóxica $IC_{50/2}$ el número de células es menor que el obtenido en los controles positivos y negativos.

Este hecho podría explicarse si la disminución en la fase G0/G1 fuese un efecto inherente al ácido maslínico sobre células en cultivo privadas de suero, independientemente de que la concentración utilizada fuese más o menos citotóxica. Además esta “aceleración” del ciclo parece ocurrir antes del incremento en el número de células como muestran los resultados de los ratios lo que parece indicar que el incremento en el número de células en las fases correspondientes a la división celular es previo a un aumento del número de células presentes en el cultivo.

V.2.3. Análisis de expresión y de enzimas

La activación de Akt-1 y Akt-2 es inhibida por inhibidores de PI3K, lo que sugiere que su activación se produce en respuesta de PI3K. Finalmente, Akt-3 es fosforilada sobre residuos de serina en respuesta a insulina. Akt-3 se expresa en fibroblastos 3T3-L1, adipocitos y en células del músculo esquelético, estando involucrada en varios procesos biológicos como diferenciación celular, síntesis de glucógeno, regulación del consumo de glucosa, apoptosis y proliferación celular.

El NF- κ B se encuentra en el citoplasma unido a proteínas inhibidoras (I κ B). Las I κ B constituyen una familia estructuralmente relacionada, conformada por I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ , que contienen múltiples repeticiones de ankirina las cuales interactúan con los dominios de localización nuclear de las proteínas de la familia Rel (Rel Homolog Domain; RHD) previniendo su translocación.

En los I κ Bs se observa una región central que contiene repeticiones de ankirina y un dominio amino-terminal (N-ter) regulador que controla la degradación. En células no

estimuladas, NF- κ B se encuentra principalmente en el citoplasma donde es secuestrado mediante la interacción con estas proteínas inhibidoras.

Los I κ Bs, en respuesta a estímulos con agonistas, son degradados por el proteosoma 26S, liberando los dímeros de NF- κ B, los cuales se translocan al núcleo y modulan la expresión génica; la actividad transcripcional de ciertos dímeros de NF- κ B es además regulada por fosforilación, siendo éste un mecanismo adicional de control para su función. NF- κ B en el núcleo desencadena procesos de supervivencia incluyendo el aumento de la transcripción de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión. Estas enzimas participan en el control de los niveles de especies reactivas de oxígeno en la célula.

Los resultados obtenidos mediante los ensayos de expresión mostraron, el incremento en la expresión de las proteínas p-Akt en células HT29 y p-I κ B en células HepG2 a bajas dosis de ácido maslínico parece corroborar el resto de los ensayos realizados indicando que al menos dos vías moleculares relacionadas con la inducción del crecimiento celular parecen ser activadas por la acción de este compuesto sobre células en cultivo sin suero.

Existen numerosos estudios en donde se describe el papel protector de ciertos compuestos frente al estrés oxidativo, siendo estos anteriormente descritos como agentes antitumorales (Shen y col., 2011; Qian y col., 2011; Hiromi y col 2010). El hecho que hace que un compuesto sea antitumoral o ejerza un papel protector puede estar relacionado con las dosis empleadas y las líneas celulares estudiadas.

Estos resultados, han sido descritos en este estudio en donde el AM, descrito como antitumoral es capaz de tener a su vez un efecto protector de las células HT29 y HepG2 contra el daño oxidativo provocado por la privación de suero y este efecto lo realiza a bajas dosis del mismo.

El AM reduce el estrés oxidativo causado por el H₂O₂ en las células a través de un incremento, en general, de los niveles de enzimas antioxidantes, lo que resulta en un

aumento de las reservas de GSH. Resultados similares fueron encontrados en células HepG2, en donde estresaban a las células con H₂O₂, y posteriormente, las trataban con polifenoles (Granado-Serrano y col., 2006).

La enzima GR reduce el glutatión oxidado utilizando NADPH generado por otros sistemas (Proctor y Reynolds, 1984). Los resultados encontrados en HT29 y HepG2 sugieren que el AM restaura los niveles de GR alterados en la situación de estrés. Esta restauración de la actividad del enzima, es esencial para la eliminación del H₂O₂ y para evitar la acumulación de glutatión oxidado que es muy tóxico para la célula (Cascales, A, 1999).

La actividad de la GR, al igual que otras enzimas antioxidantes, se ha asociado con enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como el cáncer. Así, se ha demostrado que los pacientes con cáncer en la cavidad oral presentan una mayor actividad de GR en suero que los individuos sanos (Rawal y col., 1999). En relación a este hecho, nuestros resultados mostraron que en ausencia total de factores de crecimiento las células tumorales aumentaron aún más la actividad de la GR, relacionada con el proceso de estrés.

La glutatión peroxidasa (GPx) se localiza en el citosol y la mitocondria, y se considera como el principal sistema de defensa antioxidante en condiciones de “bajos” niveles de estrés oxidativo (Valko y col., 2006). Los resultados que encontramos para este enzima contribuyen a corroborar la potencialidad del AM para contrarrestar el daño oxidativo inducido por la falta de factores de crecimiento y reforzar las defensas antioxidantes. Resultados similares, fueron encontrados con otros autores y compuestos **285, 286.**

El AM también puede actuar como pro-oxidante dependiendo del tipo celular, dosis o duración del tratamiento, así que puede aumentar la producción de ROS e inducir apoptosis en las células cancerígenas, lo que puede prevenir o disminuir el desarrollo tumoral.

En relación al efecto del AM sobre los procesos de proliferación/supervivencia y muerte celular, se ha de mencionar que éste puede variar en función de la dosis utilizada. Así, las bajas concentraciones de este compuesto pueden promover mecanismos de supervivencia mediante la activación de la vía de proliferación/supervivencia o el incremento de los niveles de p-AKT. Sin embargo, a dosis altas, este compuesto parece ser capaz e inducir la muerte celular programada a través de la activación de señales implicadas en el proceso de apoptosis y la inhibición de proteínas asociadas con la proliferación/supervivencia.

Todo ello indica que el efecto de AM, depende de las condiciones experimentales (concentraciones, condiciones de cultivo, tratamiento, tipos celulares, duración del tratamiento...etc.), ya que este compuesto no resultó tóxico en las células normales incluso a alta dosis, resultado que concuerda con estudios previos (Reyez-Zurita y col., 2009). Otros autores, demostraron que el AM, tiene un margen de seguridad suficiente para su posible uso como nutraceutico, utilizando ratas como modelo experimental (Sánchez-González, M. y col., 2013).

Resultados similares fueron encontrados en células HepG2, en donde estresaban a las células con H₂O₂, y posteriormente, las trataban con polifenoles viéndose que la ruta de proliferación era la vía de las MAPKs (ERKs, JNKs) (Granado-Serrano y col., 2006). En este estudio, se vio que las altas concentraciones de los polifenoles, como la quercetina, pueden ejercer un efecto pro-apoptótico mediante la activación de la cascada de caspasas y la reducción de los niveles fosforilados de AKT y ERKs (Granado-Serrano y col., 2010).

Existen estudios en los que se ha comprobado que una fracción activa de polipéptidos procedentes de la planta *Achyranthes bidentata* (ABPP-E4), es capaz de prevenir la apoptosis inducida por privación de suero en células SH-SY5Y. Estas células, previa privación de suero, se trataron con ABPP-E4 y se realizó un estudio de viabilidad y apoptosis. Los resultados que encontraron fueron que hubo un incremento de la proporción Bcl-2/Bax y la inhibición de la activación de la caspasa-3; se estimuló la

activación de la vía de señalización de Akt/Gsk3 β ; de manera que se antagonizaba el efecto apoptótico y la pérdida de la viabilidad celular provocada por la privación de suero.

Estos resultados sugieren que el AAPP-E4, aunque ha sido descrito como antitumoral, podría ejercer un efecto protector contra la apoptosis neuronal inducida por la privación del suero mediante la modulación de las vías PI3K/Akt/Gsk3 β (Shen y col., 2011).

Otros estudios con AM, similares a los nuestros, han demostrado un efecto neuroprotector del compuesto y el mecanismo de acción (Qian y col., 2011). Estos autores han provocado estrés oxidativo sobre neuronas corticales. Con la presencia o ausencia de ácido maslínico, las neuronas corticales fueron sometidas a 1h de la privación de oxígeno-glucosa y 24 de reoxigenación. Los resultados mostraron que el ácido maslínico dosis-dependiente mejora las lesiones de las neuronas y no induce apoptosis.

El tratamiento con ácido maslínico normalizó la expresión/activación de caspasa y aumentó la proporción de Bcl-2/Bax. Además, el ácido maslínico inhibió la expresión de NO y de la iNOS inducidos por la privación de oxígeno-glucosa. Estos resultados indican que el ácido maslínico tiene efectos beneficiosos sobre la hipoxia de las neuronas por la supresión de la activación de la iNOS, lo que puede, a su vez, ofrecer cierta neuroprotección (Qian y col., 2011).

Otros estudios similares (Hiromi y col., 2010), provocaron, también, estrés celular por privación del suero y trataron este estrés con ciclofosfamida (CP). La CP ha sido utilizada como un agente antitumoral o inmunosupresor en clínica. En este trabajo, observaron que este compuesto promueve la supervivencia celular a través de la activación de la señalización intracelular en cultivos de neuronas corticales. Curiosamente, la CP estimuló la activación de las vías de PI3K y de MAPK/ERK, que se conocen como señalizaciones intracelulares promotoras de la supervivencia y aumentó la expresión de Bcl2 (factor anti-apoptótico).

Por otra parte, estudios con diferentes compuestos triterpénicos (eritrodiol, ácido uvaol, oleanólico y ácido maslínico) se han realizado estudios con objeto de sus efectos sobre la citotoxicidad, proliferación celular, ciclo celular, apoptosis, niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS), y daño oxidativo del ADN en la línea celular MCF-7 del cáncer humano de mama (Allouche y col., 2011).

Los resultados mostraron que eritrodiol, uvaol, y ácido oleanólico tienen un efecto citotóxico significativo e inhiben la proliferación de forma dosis y tiempo dependiente. A 100 μM , la inhibición del crecimiento se produjo por eritrodiol mediante la apoptosis, con la observación de la importante producción de ROS y daño a nivel del ADN, mientras que la inhibición del crecimiento producida por ácido oleanólico y uvaol se hace por detención del ciclo celular.

Por otra parte, a pesar de todo los triterpenos evaluados, ninguno de ellos, mostraron actividad de eliminación de radicales libres a la concentración de 10 μM . Los ácidos uvaol, oleanólico y maslínico, también reducen el nivel intracelular de ROS y previenen la lesión oxidativa inducida por H_2O_2 . En general, los resultados sugieren que los triterpenos ensayados puede tener el potencial para aportar una defensa natural importante contra el cáncer de mama humano (Allouche y col., 2011)

V.3. Estudios de proteómica

Desde hace algunos años extensas investigaciones se han realizado sobre las posibles propiedades anti-tumorales del AM. Nuestras publicaciones anteriores han descrito las potentes propiedades de diferenciación y de anti-proliferación del AM en líneas de cáncer de colon. De hecho, hemos demostrado que el AM induce parada en el ciclo celular en la fase G0 e induce apoptosis a través de la activación de caspasas (Reyes-Zurita y col., 2011).

Esto puede representar un mecanismo útil para la quimioprevención y quimioterapia contra el cáncer de adenocarcinoma de colon. En relación a esta actividad, en este nuevo

estudio se investigó otra función celular que puede ser una diana para la actividad anti-tumoral del AM, como es la dinámica del citoesqueleto, porque está claramente establecido que las alteraciones en la organización intracelular de la actina del citoesqueleto y su reordenamiento dinámico son esenciales para cambios en las células que resultan en el potencial metastásico y invasividad de las células del cáncer (Yap y col., 2012;Wittman y col., 2006).

Los resultados mostrados corroboran resultados anteriores reportados por autores anteriores (Reyes-Zurita y col., 2011; Yap y col., 2012 lo que demuestra que el AM inhibe la proliferación de las células HT29 e induce la detención en fase G1 del ciclo celular. El valor IC50 de $30 \pm 0,5 \mu\text{M}$ obtenido por nosotros después de 24 horas de exposición al AM fue significativamente inferior al $61 \pm 1 \mu\text{M}$ reportados por Reyes-Zurita y col., 2011 en la misma línea celular HT29, pero tras 72 horas de exposición.

Esto indica que el efecto anti-proliferativo del AM no es sólo dependiente de la dosis sino que también es dependiente del tiempo, siendo más eficaz en períodos más cortos de exposición. Para investigar los efectos del AM en las proteínas del citoesqueleto se utilizó unmetodología proteómica basado en 2-DE y análisis de MS.

Este procedimiento ha sido ampliamente utilizado para evaluar proteomas expresados diferencialmente en células cancerígenas en respuesta al tratamiento con un fármaco quimiopreventivo y también para buscar drogas biomarcadoras específicas (Ankenbauer y col., 1989). Nuestros resultados muestran que los niveles de expresión de las 14 proteínas diferentes relacionadas con el citoesqueleto e células HT29 de cáncer de colon humano son modificados en respuesta al AM.

Estas proteínas son proteínas estructurales, como las queratinas, citoqueratinas y β -actina, y también se han llegado a identificar proteínas de unión a actina como lamina B1, gelsolina 1, septina 2, villina 1, proteína 2 relacionada con moesina y actina. Todas las proteínas de unión a actina experimentaron un aumento en su expresión tras su exposición al tratamiento con AM. En cuanto a las proteínas estructurales, queratinas 2, 8, 9 y 19,

estas fueron “up-reguladas” (aumentaron su expresión) y las queratinas 8, 18, y la β -actina fueron “down-reguladas” en respuesta al AM, mientras que las 6 proteínas relacionadas con la nucleación de actina y la formación de citoesqueleto se “up-regularon”.

Los resultados descritos para moesina, villina 1 y β -actina fueron corroborados, a su vez, por Western Blot. En la mayoría de los casos, los mayores efectos se observaron a concentraciones de 3,75 μ M de AM. Estos resultados demuestran claramente que el AM no sólo produce un efecto anti-proliferativo, sino que también regula la organización del citoesqueleto en las células de adenocarcinoma HT29 humano. Esta interferencia con la estructura del citoesqueleto puede ser otro mecanismo a través del cual AM ejerce sus efectos anti-tumorales.

La lámina nuclear es una red de filamentos de 10 nm de diámetro situada en la cara interior de la membrana nuclear interna (Miller y col., 2001). Los componentes del citoesqueleto en el núcleo están implicados en la reticulación del ADN, el control de la transcripción y morfología de los cromosomas (McKeon y col., 1986; Fisher y col., 1986).

La lámina está compuesta de proteínas conocidas como láminas, que son proteínas miembros de la familia de filamentos intermedios (Paulin-Levasseur y col., 1989; Kaufmann y col., 1991). Las láminas de tipo B son expresadas en cierta medida en todas las células somáticas normales (Cance y col., 1992), pero varios estudios han reportado que la expresión de la proteína lámina se reduce en algunos tipos de cáncer (Broers y col., 1993; Kolber y col., 1990).

La expresión de Lamina B1, por ejemplo, se reduce en las primeras etapas de adenocarcinomas gástrico y de colon (Magro y col., 2005). Nuestros resultados muestran que el AM a una concentración de 3,75 μ M induce un aumento significativo, 1,4 veces mayor en la expresión de lamina B1 en células HT29, contrarrestando así los efectos negativos del adenocarcinoma sobre expresión de lamina B1.

Este aumento de la lamina B1 puede estar relacionado con un la detención en la fase G1 del ciclo celular y una disminución en la proliferación celular, afectando a los enlaces cruzados de ADN (cross-linking), a la regulación de la expresión génica y a la morfología cromosómica (1986; Spiliotis y col., 2005).

El cáncer es una patología acoplado con la desregulación de la motilidad celular, seguido de alteraciones muy evidentes en la arquitectura de la actina del citoesqueleto y el funcionamiento de proteínas de unión a la actina. La motilidad celular es un proceso complicado que requiere de la reordenación dinámica de la actina del citoesqueleto, impulsado por la polimerización de la actina y los ciclos de despolimerización.

La proteína gelsolina es una de las principales proteínas de unión a la actina implicadas en la motilidad celular a través de la regulación del citoesqueleto de actina (Wittmann y col., 2006). Cambios en la expresión de esta gelsolina se ha podido observar en un gran número de células tumorales humanas y se conectan a menudo con su desarrollo y progresión (Nishizuka y col., 2003).

En las células humanas de adenocarcinoma de colon los nivel de gelsolina y su distribución subcelular parece correlacionarse con su potencial metastásico (Wittmann y col., 2006). Una disminución significativa en la expresión de gelsolina se puede ver en las células de adenocarcinoma LS180 (Nishizuka y col., 2003).

Los resultados que hemos mostrado en la presente investigación es que el AM “up-regula” la expresión, significativamente, de la proteína gelsolina en células HT29. Dado que los niveles de gelsolina disminuyen en varios tipos de adenocarcinoma, el hecho de que el AM invierte esta tendencia indica su función en el control de la progresión tumoral. En este caso, los cambios inducidos por el AM parecen ser capaces de invertir el potencial metastásico de las células cancerosas.

Otras dos proteínas del citoesqueleto que pueden ser marcadores útiles de cáncer son villina 1 y moesina (Comín-Anduix y col., 2002). Villina 1 ha sido propuesta como un buen candidato para el cáncer de colon y moesina para el cáncer ovario.

Con respecto a las células HT29, moesina, junto con ezrina y radixina, han sido descritas formando parte de una vía de transducción de señales (Damania y col., 2012), la cual está envuelta en la respuesta inducida por el interferón- γ inducido STAT1. Nuestros resultados muestran que el AM up-regula la expresión de ambas proteínas, lo que sugiere que el AM también puede influir en esta vía de señalización implicada en la división celular.

Hemos demostrado que la proteína septina-2 también está up-regulada en las células HT29 en respuesta a la adición de AM. Esta proteína también se ha identificado como un posible biomarcador de cáncer gástrico (Mosmann y col., 1983), siendo considerablemente sobre-expresado en adenocarcinoma gástrico en comparación con muestras de tejidos adyacentes no tumorales.

Se ha propuesto que las alteraciones de expresión encontradas en septina-2 pueden conducir a trastornos de las dinámicas cromosómicas y subyace al desarrollo de la aneuploidía común para el cáncer (Gourlay y col., 2005).

El citoesqueleto se considera que es la espina dorsal de una célula, proporcionando con su forma y estructura. También juega un papel fundamental en la regulación de la transducción de señales, transcripción de genes, división celular y diferenciación (Odaka y col., 2000). La captación de AM por parte de las células HT29 conduce a cambios significativos en diversas proteínas que son fundamentales para el mantenimiento de la estructura de filamentos de actina y de filamentos intermedios.

Así, el AM induce una regulación por disminución en el nivel de β -actina, una proteína fundamental microfilamentos de actina de 6 nm implicada en el mantenimiento de la forma celular y el transporte inter e intracelular. Con respecto a los filamentos intermedios, el AM induce la sobre expresión (aumento) de la queratina 2, queratina tipo

II citoesqueletal 8, queratina tipo I citoesqueletal 9, citoqueratina 19, y la disminución de la queratina 8, queratina tipo I citoesqueleto 18 y citoqueratina 18.

Todos estos cambios demuestran que el AM afecta significativamente a la reorganización del citoesqueleto de la célula de HT29 de cáncer de colon, todos los cuales pueden resultar en una actividad anti-tumoral y anti-proliferativa en este tipo de células. Además de sus efectos sobre la apoptosis (Reyes-Zurita y col. 2011; Adam y col., 2009), esta interferencia en la organización y dinámica de los filamentos en la arquitectura del citoesqueleto también puede ser muy importante para la migración celular, en particular durante la formación de metástasis.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados del presente trabajo demuestran una evidente influencia del ácido maslínico en el comportamiento celular, en la actividad enzimática relacionada con el estrés oxidativo, en las vías de proliferación y una influencia sobre las proteínas del citoesqueleto.

1. Los estudios de viabilidad demostraron que el ácido maslínico ejerce una influencia sobre la supervivencia celular, específicamente en las líneas celulares B16-F10 y A10, y que ésta es diferente entre dichas líneas, de tal manera que se corroboró que el AM presenta un menor efecto antioxidante sobre líneas celulares tumorales, mientras que se observa un efecto claro del mismo en células normales. Este hecho está relacionado con la capacidad anticancerígena e inducción de apoptosis en células tumorales.
2. El ácido maslínico no afecta a la capacidad de supervivencia de las células normales en ausencia de estrés, incluso en dosis muy altas. Esto indica que el AM no es citotóxico en estas células.
3. Los análisis realizados mediante citometría de flujo demostraron una influencia directamente proporcional del tiempo y concentración de los compuestos oxidantes empleados (falta de suero, presencia de SNP y H_2O_2), con respecto al aumento de la actividad celular medida por DHR. Por su parte, estos análisis también permitieron determinar que el ácido maslínico es capaz de modular esta actividad celular de forma proporcional a la concentración usada al disminuir la concentración de H_2O_2 intracelular, generado en condiciones de estrés y, por ende, la actividad SOD.
4. El AM, a bajas dosis, puede estimular el sistema de defensa antioxidante de las células, restaurando los niveles de GSH y la actividad y la expresión de las enzimas

antioxidantes (GPx, SOD y catalasa) a bajas concentraciones, lo que induce cambios favorables que previenen o retrasan condiciones que favorecen el estrés oxidativo. Este compuesto desempeña un papel protector frente al estrés oxidativo.

5. El AM a una concentración baja no induce apoptosis en las células, sino que activa a las proteínas relacionadas con proliferación/supervivencia.
6. El AM a bajas concentraciones no induce apoptosis en las células cancerígenas estudiadas, sino que mejora la tolerancia celular frente al estrés oxidativo provocado por los diferentes agentes activando las proteínas claves en la vía de proliferación/supervivencia y también modulando la expresión de las enzimas antioxidantes.
7. El AM provoca una disminución dosis dependiente en la viabilidad de las células HT29 mediante la inducción de cambios significativos en la expresión de las proteínas del citoesqueleto. Estos cambios afectan a los niveles de proteínas estructurales que son fundamentales para el mantenimiento de la estructura celular, motilidad e incluso la capacidad invasiva de la célula; así conformación del citoesqueleto. Estos cambios, son la primera evidencia obtenida de los efectores reguladores el AM en el citoesqueleto, que puede llegar a ser una de las bases de su efecto anticancerígeno en las células de cáncer de colon.
8. El AM, en dosis bajas, parece ser capaz de mejorar la tolerancia celular intrínseca frente al estrés oxidativo mediante el aumento del potencial antioxidante y la modulación de señales relacionadas con la proliferación/supervivencia en cultivos celulares estudiados. Sin embargo, a dosis altas, este compuesto parece ser capaz de inducir la muerte celular programada a través de la activación de señales implicadas en el proceso de apoptosis y la inhibición de proteínas asociadas con la proliferación/supervivencia. Todo ello indica que las condiciones experimentales (concentraciones, condiciones de cultivo, duración del tratamiento, etc.) se han de

considerar seriamente, ya que pueden determinar la actividad biológica de este compuesto natural, lo que muestra la dificultad para predecir su efecto y la necesidad de entender sus mecanismos de acción molecular en cada contexto.

Apartir de estas conclusiones podemos concluir que el AM dependiendo de la dosis tiene efecto sobre las vías de apoptosis y de proliferación celular. El AM puede restablecer el equilibrio de las dos vías dependiendo de la dosis y del estado de la célula (estado normal o estrés) y también dependiendo de los tipos celulares (células normales o cancerígenas).

PERSPECTIVAS DE FUTURO

VII. PERSPECTIVAS DE FUTURO

En relación a los resultados obtenidos, se recomienda realizar nuevos ensayos para estudiar más profundamente el efecto del AM observado. De este modo se propone una serie de perspectivas que pueden servir de hipótesis y objeto de estudios derivados de éste.

1. Comprobar si el efecto antioxidante es efectivo frente a diferentes agentes oxidantes a los empleados en este trabajo, así como estudiarlo y observarlo en más modelos celulares.
2. Llevar estos ensayos a modelos en *in vivo*, para asegurar que el AM causa el mismo efecto en animales completos.
3. Profundizar bioquímicamente la respuesta antioxidante mediante el estudio del seguimiento de la ruta estrés y todas las proteínas implicadas en ella.
4. Relacionar la respuesta antioxidante del ácido maslínico con su efecto anticancerígeno y antiinflamatorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abboud, M. and Al-Awaida, W. (2010). Synchrony of G6PD activity and RBC fragility under oxidative stress exerted at normal and G6PD deficiency. *Clinical biochemistry*, 43 (4-5), 455–460.
- Adam Wax, VB. (2009). Biomedical applications of light scattering. McGraw-Hill, Burr Ridge, IL.
- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Aebi, U.; Cohn, J.; Buhle, L. and Gerace, L. (1986). The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature*, 323, 560-564.
- Ahmad, R., Rasheed, Z. y Ahsan, H. (2009). Biochemical and cellular toxicology of peroxynitrite: implications in cell death and autoimmune phenomenon. *Immunopharmacology Immunotoxicology* 31, 388–396.
- Ajila, CM. and Prasada, Rao. (2008). Protection against Hydrogen peroxide induced oxidative damage in rat erythrocytes by *Mangifera indica* L. Peel extract. *Food Chem Toxicol.* 46 (1), 303-309.
- Al-Jaber, H., Abrouni, K., Al-Qudah, M. and Abu Zarga, M. (2012). New terpenes from *Salvia palaestina* Benth. and *Salvia syriaca* L. growing wild in Jordan. *Journal of Asian natural products research*, 37-41.
- Allouche, Y., Warleta, F., Campos, M., Sánchez-Quesada, C., Uceda, M., Beltrán, G. and Gaforio, J. (2011). Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic capacities of pentacyclic triterpenes found in the skin of olives on MCF-7 human breast cancer cells and their effects on DNA damage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59 (1), 121–130.
- Alvarez, M., Trujillo, M. and Radi, R. (2002). Peroxynitrite formation from biochemical and cellular fluxes of nitric oxide and superoxide. *Methods in Enzymology*, 359, 353–366.
- Ames, B., Shigenaga, M. and Hagen, T. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (17), 7915–7922.

- Ankenbauer, T.; Kleinschmidt, JA.; Walsh, MJ.; Weiner, OH. and Franke, WW. (1989). Identification of a widespread nuclear actin binding protein. *Nature*, 342, 1197-1202.
- Banik, R. and Pandey, D. (2008). Optimizing conditions for oleanolic acid extraction from *Lantana camara* roots using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 27 (3), 241-248.
- Bernstein, H.; Payne, CM.; Kunke, K.; Crowley-Weber, CL.; Waltmire, CN.; Dvorakova, K.; Holubec, H.; Bernstein, C.; Vaillancourt, RR.; Raynes, D. A.; Guerriero, V. and Garewal, H. (2004). A proteomic study of resistance to deoxycholate-induced apoptosis. *Carcinogenesis*. 25, 681-692.
- Beutler, E. (1994). G6PD Deficiency. *Blood* 84(11): 3613-3636.
- Bianchi G., Vlahov G. and Pozzi N. (1994). The lipids of *Olea europaea*: pentacyclic triterpene acids in olives. *Phytochemistry*, 37, 205-207.
- Bittencourt, LS., Machado, DC., Machado, MM., Dos Santos, GFF., Algarve, TD., Marinowic, DR., Ribeiro, FAA, F Barbisan., ML, Athayde. and IB, Cruz. (2013). The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 53, 119–125.
- Blanchetot, C. and Boonstra, J. (2008). The ROX-NOX connection in cancer and Angiogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 18 (1), 35-45.
- Braca, A., Morelli, I., Mendez, J., Battinelli, L., Braghiroli, L. and Mazzanti, G. (2000). Antimicrobial triterpenoids from *Licania heteromorpha*. *Planta medica*, 66 (8):768-779.
- Broers, JLV.; Raymond Y.; Rot MK.; Kuijpers, H., Wagenaar, SS. and Ramaekers, FC. (1993). Nuclear A-type lamins are differentially expressed in human lung cancer subtypes. *Am. J. Pathol.* 143, 211-220.
- Buonocore, G., Perrone, S., and Tataranno, ML. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med* 15 (4): 186-190.
- Cadenas, E. (1995). Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. En: *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. Cap. 1, pp: 1-46. Ed. Ahmad, S. Chapman & Hall. New York.

- Cance, WG.; Chadhary, N.; Worman, HJ.; Blobel, G. and Cordon-Cardo, C. (1992). Expression of the nuclear lamins in normal and neoplastic human tissues. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 11, 233-246.
- Cardaci, S., Filomeni, G., Rotilio, G. and Ciriolo, M. (2008). Reactive oxygen species mediate p53 activation and apoptosis induced by sodium nitroprusside in SH-SY5Y Cells. *Mol Pharmacol.* 74:1234–1245.
- Carlberg, I. and Mannervick, B. (1977). Purification by affinity chromatography of yeast glutathione reductase, the enzyme responsible for NADPH-dependent reduction of the mixed disulfide of co-enzyme A and glutathione. *Biochimica et Biophysica Acta*, 484, 268–274.
- Cascales, A. In: Estrés oxidativo. Envejecimiento y enfermedad.(Ed Instituto de España) 47-90 (Realigraf, S.A., 1999).
- Chamley-Campbell, R., Campbell, G. and Ross, R. (1979). The Smooth Muscle Cell in Culture. *Physiological Reviews*, 59, 1–6.
- Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59 (3): 527-605.
- Chaudhuri, P. and Singh, D. (2012). A new triterpenoid from the rhizomes of *Nelumbo nucifera*. *Natural product research*, (June), 37-41.
- Chenghai, L., Zhengfeng, Y., Chunyan, Z., Wenwei, QD., L., Zhengfang, Y., Lei, W.,Jie, T., Min, Q., Jian, Luo. and Mingyao, L. (2010). Maslinic acid potentiates the anti-tumor activity of tumor necrosis factor a by inhibiting NFk-B signaling pathway. *Molecular Cancer*. 1186/1476-4598-9-73.
- Chung, A. and Langdon, R. (1963). Human Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase I. Isolation and properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 238 (7): 2309-2316.
- Comín-Anduix B., Boros LG., Marin S., Boren J., Callol-Massot C., Centelles, JJ. Torres, JL., Agell, N., Bassilian, S. and Cascante, M. (2002). Fermented wheat germ extract inhibits glycolysis/pentose cycle enzymes and induces apoptosis through poly (ADP-ribose) polymerase activation in Jurkat T-cell leukemia tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*. 277, 46408-46414.

- Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H.J., Lynch, H.T., Minsky, B., Nordlinger, B. and Starling, N. (2010). Colorectal cancer. *Lancet*. 20, 1030-1047.
- Damania, D., Subramanian, H., Tiwari, A.K., Stypula, Y., Kunte, D., Pradhan, P., Roy, H.K. and Backman, V. (2010). Role of cytoskeleton in controlling the disorder strength of cellular nanoscale architecture. *Biophysical Journal*, 99, 989-996.
- Danielson, U., Esterbauer, H., and Mannervik, B. (1987). Structure-activity relationships of 4-hydroxyalkenals in the conjugation catalysed by mammalian glutathione transferases. *The Biochemical journal*, 247 (3), 707–713.
- Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W., Koenderman, L. and Coffey, P.J. (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr. Biol.* 10, 1201-1204
- Dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A. and Nosworthy, N.J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* 83, 433-473.
- Farhud, D. and Yazdanpanah, L. (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) Deficiency. *Iranian J. Publ. Health* 37(4): 1- 18.
- Felton, G. (1995). Oxidative stress of vertebrates and invertebrates. En: *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. Cap. 10, pp: 356-434. Ed. Ahmad, S. Chapman & Hall. New York.
- Fernandez-Checa, J.C., Kaplowitz, N., García-Ruiz, C., Colell, A., Miranda, M., Ardite, E. and Morales, A. (1997). GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am J Physiol* 273(1): G7-17.
- Fernández-Navarro, M., Peragón, J., Amores, V., de La Higuera, M. and Lupiáñez, J. (2008). Maslinic acid added to the diet increases growth and protein-turnover rates in the white muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 147, 158-167.
- Fernández-Navarro, M., Peragón, J., Esteban, F., de la Higuera, M. and Lupiáñez, J. (2006). Maslinic acid as a feed additive to stimulate growth and hepatic protein-turnover rates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 144, 130-140.

- Fisher, DZ., Chaudhary, N. and Blobel, G. (1986). cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83, 6450-6454.
- Flohé, L. and Günzler, W. (1984). Assay of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105, 115–121.
- Frega N., Monzon M., Servidio G. and Lercker G. (1995). Study on the oxidative stability of extra virgin olive oil by the Racimat test. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, 72, 493-496.
- Friedl, P. and Wolf, K. 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer*. 3, 362-374.
- Frixione, E. (2000). Recurring views on the structure and function of the cytoskeleton: a 300-year epic. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 46, 73-94.
- García-Granados, A. (1998a). Use of maslinic acid as serin proteases inhibitor in the treatment of the disease produced by the acquire immunodeficiency viruses. Spanish Patent P9702528.
- García-Granados, A. (1998b). Use of maslinic acid as serin proteases inhibitor in the treatment of diseases produced by parasite of *Cryptosporidium* genus. Spanish Patent P9701029.
- García-Granados, A., Dueñas, J., Moliz, J., Parra, A., Pérez, F., Dobado, J. and Molina, J. (2000). Semi-synthesis of triterpene A-ring derivatives from oleanolic and maslinic acids. Part II. Theoretical and experimental C-13 chemical shifts. *J. Chem. Res.-S.*, 2, 0326–0339.
- Garcia-Ruiz, C. and Fernandez-Checa, J. (2006). Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. *J Gastroenterol Hepatol* 21 Suppl 3: S3-6.
- Giblin, F., McCready, J. and Reddy, V. (1982). The role of glutathione metabolism in the detoxification of H₂O₂ in rabbit lens. *Investigative ophthalmology & visual science*, 22 (3), 330–335.
- Goulas, V. and Manganaris, G. (2012). Towards an Efficient Protocol for the Determination of Triterpenic Acids in Olive Fruit: A Comparative Study of Drying and Extraction Methods. *Phytochemical analysis*, (5): 444-449.

- Gourlay, CW. and Ayscough, KR. (2005). The actin cytoskeleton in ageing and apoptosis. *FEMS Yeast Res.*, 5, 1193-1198.
- Granado-Serrano, AB., Martín , MA., Bravo ,L., Goya, L., and Ramos, S. (2006). Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation Bcl-2 and inhibition of PI-3-kinase/AKT and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *Journal of Nutrition*. 136 (11): 2715-2721.
- Guan, T., Li, Y., Sun, H., Tang, X. and Qian, Y. (2009). Effects of Maslinic Acid, a Natural Triterpene, on Glycogen Metabolism in Cultured Cortical Astrocytes. *Planta médica*. 75 (10): 1141-1143.
- Guan, T., Qian, Y., Tang, X., Huang, M., Li, Y. and Sun, H. (2011). Maslinic acid, a natural inhibitor of glycogen phosphorylase, reduces cerebral ischemic injury in hyperglycemic rats by GLT-1 up-regulation. *J Neurosci Res*. 89 (11):1829-39.
- Guan, T., Qian, YS., Huang, MH., Huang, LF., Tang, XZ.,Li, YM. and Sun, HB. (2010). Neuroprotection of maslinic acid, a novel glycogen phosphorylase inhibitor, in type 2 diabetic rats. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 8 (4), 293-297.
- Guerriero, G., Finizio, A. and Di Ciarcia, G. (2002). Stress-induced changes of plasma antioxidants in aquacultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A*, 132, 205–211.
- Halliwell, B. (2000). Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovasc Res* 47 (3): 410-418.
- Hayes, J. and Pulford, D. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprevention and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 30, 445–600
- He, X. and Liu, R. (2007). Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4366-4370.
- Hidalgo, M., Skalli, A., Abellán, E., Arizcun, M. and Cardenete, G. (2006). Dietary intake of probiotics and maslinic acid in juvenile dentex (*Dentex dentex L.*): effects on growth performance, survival and liver proteolytic activities. *Aquacult. Nutr.* 12, 256–266.

- Hiromi, K., Tadahiro, N., Naoki, A., Emi, K., Tuerhong, T., Motoshige, K. and Hiroshi, K. (2010). Cyclophosphamide promotes cell survival via activation of intracellular signaling in cultured cortical neurons. *Neuroscience Letters*. 470, 139–144.
- Hodge, D. and Salati, L. (1997). Nutritional Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene is mediated by a nuclear post transcriptional mechanism. *A. Biochem. Biophys.* 348 (2): 303-312.
- Huang, C., Chang, L., Anderson, M. and Meister, A. (1993). Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney γ -glutamyl cysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* 268, 19675–19680
- Huang, L., Guan, T., Qian, Y., Huang, M., Tang, X., Li, Y. and Sun, H. (2011). Anti-inflammatory effects of maslinic acid, a natural triterpene, in cultured cortical astrocytes via suppression of nuclear factor-kappa B. *European journal of pharmacology*, 672 (1-3), 169-174.
- Hussain, SA., Rasool, SN., Abdul, KM., Krushna, GS. and Akhtar, PM. (2012). Maslinic acid protects against isoproterenol-induced cardiotoxicity in albino Wistar rats. *Journal of Medicinal Food*. 15 (8), 741-746.
- Juan, M., Planas, J., Ruiz-Gutierrez, V., Daniel, H. and Wenzel, U. (2008). Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of maslinic and oleanolic acids, two pentacyclic triterpenes from olives, on HT-29 colon cancer cells. *The British journal of nutrition*, 100 (1), 36-43.
- Juan, M., Wenzel, U., Ruíz-Gutiérrez, V., Daniel, H. and Planas, J. (2006). Olive fruit extracts inhibit proliferation and induce apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr* 136, 2553-2557.
- Karin, M. and Lin, A. (2002). NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* 3, 221-227
- Kaufmann, SH., Mabry, M., Jasti, R. and Shaper, JH. (1991). Differential expression of nuclear envelope lamins A and C in human lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 51, 581-586.
- Kim, Y., Kim, D., Chun, O., Shin, D., Jung, H., Lee, C. and Wilson, D. (2005). Phenolic extraction from apple peel by cellulases from *Thermobifida fusca*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (24), 9560-9565

- Kim, Y., Yoon, S. and Riu, S. (2000). Cytotoxic triterpenes from stem bark of *Physocarpus intermedius*. *Planta Med.*, 66, 485-486.
- Kletzien, R. and Berdanier, C. (1993). Glucose-6-phosphate dehydrogenase: diet and hormonal influences on de novo enzyme synthesis. In *Nutrition and Gene Expression (Berdanier C D and Hargrove J L eds)*. CRC press, Boca Raton, 187-206.
- Kletzien, R., Harris, P. and Foellmi, L. (1994). Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a housekeeping enzyme subject to tissue specific regulation by hormones, nutrients and oxidant stress. *FABES J.*, 8: 174-181.
- Kocevar, N., Odreman, F., Vindigni, A., Frkovic GS. and Komel, R. (2012). Proteomic analysis of gastric cancer and immunoblot validation of potential biomarkers. *World Journal of Gastroenterology*. 18, 1216-1228.
- Kolber, MA., Broschat, KO. and Landa-González, B. (1990). Cytochalasin B induces cellular DNA fragmentation. *FASEB J.* 4, 3021-3027.
- Kombargi, W., Michelakis, S. and Petrakis, C. (1998). Effect of olive surface waxes on oviposition by *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol*, 91, 993-998
- Kontogianni, V., Exarchou, V., Troganis, A. and Gerothanassis, I. (2009). Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy-Comparison with HPLC methods. *Analytica chimica acta*, 635 (2), 188-195.
- Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
- Lam, KW., Wang, L., Hong, B. and Treble, D. (1993). Purification of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from bovine retina. *Current Eye Research*, 12(1): 9-15.
- Leopold, JA., Zhang, YY., Scribner, AW., Stanton, RC. And Loscalzo, J. (2003). Glucose-6-phosphate dehydrogenase overexpression decreases endothelial cell oxidant stress and increases bioavailable nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23:411-417.
- Levy, H. (1979). In Meister A (ed). *Advances in Enzymology. Rel. Areas Mol. Biol.*, 48: 97-192.

- Li, C., Yang, Z., Zhai, C., Qiu, W., Li, D., Yi, Z., Wang, L., Tang, J., Qian, M., Luo, J. and Liu, M. (2010). Maslinic acid potentiates the anti-tumor activity of tumor necrosis factor alpha by inhibiting NF-kappaB signaling pathway. *Molecular cancer*, 9 (73), 13.
- Litwin, M., Mazur, AJ., Nowak, D., Mannherz, HG. and Malicka-Blaszkiwicz, M. (2009). Gelsolin in human colon adenocarcinoma cells with different metastatic potential. *Acta Biochim. Pol.* 56, 739-743.
- Litwin, M., Nowak, D., Mazur, AJ., Baczynska, D., Mannherz, HG., Malicka-Blaszkiwicz, M. (2012). Gelsolin affects the migratory ability of human colon adenocarcinoma and melanoma cells. *Life Sciences*, 90, 851-861.
- Liu, J., Liu, Y. and Klaassen, C. (1995a). Protective effect of oleanolic acid against chemical-induced acute necrotic liver injury in mice. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 16, 97-102.
- Liu, J., Liu, Y., Parkinson, A. and Klaassen, C. (1995b). Effect of oleanolic acid on hepatic toxicant-activating and detoxifying systems in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275, 768-774.
- Liu, J., Sun, H., Wang, X., Mu, D. and Liao, H. (2007). Effects of Oleanolic Acid and Maslinic Acid on Hyperlipidemia. *Drug Development Research*. 68: 261-266.
- Liu, J., Wang, X., Luo, D., Sun, Hong B., Shang J. and Zhang L,. (2011). Anti-proliferative effect of pentacyclic triterpenes associated with glycogen accumulation in A549 cells. *Chinese Journal of New Drugs*. 20 (23), 2350-235.
- Liu, J., Sun, H., Shang, J., Yong, Y. and Zhang, L. (2011). Effect of olive pomace extracts on hyperlipidaemia. *Natural Product Research*. Vol. 25, 1190–1194.
- Liu, J., Sun, H., Shang, J., Yong, Y. and Zhang, L. (2011). Effect of olive pomace extracts on hyperlipidaemia. *Natural Product Research*. Vol. 25, 1190–1194.
- Lozinsky, O., Lushchak, O., Storey, J., Storey, K. and Lushchak, V. (2012). Sodium nitroprusside toxicity in *Drosophila melanogaster*: delayed pupation, reduced adult emergence, and induced oxidative/nitrosative stress in eclosed flies. *Archives of insect biochemistry and physiology*. 80 (3), 166–185.
- Lu, Y., Brush, J. and Stewart, T. (1999). NSP1 defines a novel family of adaptor proteins linking integrin and tyrosine kinase receptors to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase signaling pathway. *J Biol Chem*. 274 (15): 10047-10052.

- Lupiáñez, J., Adroher, F., Vargas, A. and Osuna, A. (1987). Differential behaviour of glucose 6-phosphate dehydrogenase in two morphological forms of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Biochem*, 19 (11), 1085-1089.
- Lushchak, O. and Lushchak, V. (2009). Possible pathways involved in activation of catalase and superoxide dismutase with sodium nitroprusside in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*, 81, 34–39.
- Magro, F., Fraga, S. and Soares-da-Silva, P. (2005). Interferon- γ -induced STAT1-mediated membrane retention of NHE1 and associated proteins ezrin, radixin and moesin in HT-29 cells. *Biochemical Pharmacology*. 70, 1312-1319.
- Márquez-Martín, A., De La Puerta Vázquez, R., Fernández-Arche, A. and Ruiz-Gutiérrez, V. (2006a). Suppressive effect of maslinic acid from pomace olive oil on oxidative stress and cytokine production in stimulated murine macrophages. *Free Radic Res*, (3): 295-302.
- Márquez-Martín, A., De La Puerta, R., Fernandez-Arche, A., Ruiz-Gutierrez, V. and Yaqoob, P. (2006b). Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. *Cytokine*, 36 (5-6): 211-217.
- Martín, R., Carvalho, J., Ibeas, E., Hernández, M., Ruiz-Gutiérrez, V. and Nieto, M. (2007). Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation. *Cancer Res*. 67, 3741–3751.
- McCord, J., and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein. *J. Biol Chem*, 244 (17), 6049–6055.
- McKeon, FD., Kirschner, MW. and Caput, D. (1986). Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature*. 319, 463-468.
- McKerrow, J., Sun, E., Osenthal, P. and Bouvier, J. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol*. 47:821-853.
- Medina, I., Lois, S., Lizàrraga, D., Pazos, M., Touriño, S., Cascante, M. and Torres, JL. (2006). Functional Fatty Fish supplemented with grape procyanidins. Antioxidant and proapoptotic properties on colon cell lines. *J Agric Food Chem*. 54, 3598-3603.

- Miller, CA.; Cohen, MD., Costa, M. (1991). Complexing of actin and other nuclear proteins to DNA by cis-diamminedichloroplatinum (II) and chromium compounds. *Carcinogenesis*. 12, 269-275.
- Moneriz, C.; Marín-García,P.; García-Granados, A.; Bautista, JM.; Diez, A. and Puyet, A. (2011). Parasitostatic effect of maslinic acid. I. Growth arrest of *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic stages. *Malaria Journal*. 1186/1475-2875-10-82.
- Montilla, M., Agil, P., Navarro, M., Jiménez, M., García-Granados, A., Parra, A. and Cabo, M. (2003). Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. *Planta Med.*, 69, 472-474.
- Mooi, L., Yew, W., Hsum, Y., Soo, K., Hoon, L. and Chieng, Y. (2012). Suppressive effect of maslinic acid on PMA-induced protein kinase C in human B-lymphoblastoid cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 13 (4), 1177–1182.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65, 55-63.
- Moss, SF., Krivosheyev, V., de Souza, A., Chin, K., Gaetz, HP., Chaudhary, N., Worman, HJ. and Holt, PF. (1999). Decreased and aberrant nuclear lamin expression in gastrointestinal tract neoplasms. *Gut*. 45, 723-729.
- Mossman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.
- Moyle,G. and Gazzard, B. (1995). Current knowledge and future prospects for the use of HIV protease inhibitors. *Drugs*, (5):701-712.
- Nader, B., Taketa, A., Pereda-Miranda, R. and Villarreal, M. (2006). Production of triterpenoids in liquid-cultivated hairy roots of *Galphimia glauca*. *Planta Med.* 72, 842-844.
- Nakano, T., Kanmuri, T., Sato, M y Takeuchi, M. (1999). Effect of astaxanthin rich red yeast (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout. *Biochim Biophys Acta*. 1426 (1): 119-125.
- Naugler, WE. and Karin, M. (2008). NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 19-26

- Nazari, Q., Mizuno, K., Kume, T., Takada-Takatori, Y., Izumi, Y. and Akaike, A. (2012). In Vivo Brain Oxidative Stress Model Induced by Microinjection of Sodium Nitroprusside in Mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, 120 (2), 105–111.
- Nishizuka, S., Chen, ST., Gwadry, FG., Alexander, J., Major, SM., Scherf, U., Reinhold, WC., Waltham, M., Charboneau, L., Young, L., Bussey, KJ., Kim, S., Lababidi, S., Lee, JK., Pittaluga, S., Scudiero, DA., Sausville, EA., Munson, PJ., Petricoin III, EF., Liotta, LA.; Hewitt, SM., Raffeld, M. and Weinstein, JN. (2003). Diagnostic markers that distinguish colon and ovarian adenocarcinomas: identification by genomic, proteomic, and tissue array profiling. *Cancer Res.*, 63, 5243-5250.
- Odaka, C., Sanders, ML. and Crews, P. (2000). Jasplakinolide induces apoptosis in various transforme cell lines by a caspase-3-like protease-dependen pathway. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7, 947-952.
- Olson, MF. and Sahai, E. (2009). The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin. Exp. Metastasis.* 26, 273-287.
- Park, S., Nho, C., Kwon, D., Kang, Y., Lee, K. and Park, J. (2012). Maslinic acid inhibits the metastatic capacity of DU145 human prostate cancer cells: possible mediation via hypoxia-inducible factor-1 α signalling. *The British journal of nutrition*, 1-13.
- Park, W. (2013). H₂O₂ inhibits the growth of human pulmonary fibroblast cells by inducing cell death, GSH depletion and G1 phase arrest. *Mol Med Rep.* Feb 1.
- Parra, A., Lopez, P. and Garcia-Granados, A. (2010). Bioactive compounds with added value prepared from terpenes contained in solid wastes from the olive oil industry. *Chemistry & biodiversity*, 7(2), 421-439.
- Parra, A., Rivas, F., Martin-Fonseca, S., Garcia-Granados, A. and Martinez, A. (2011). Maslinic acid derivatives induce significant apoptosis in b16f10 murine melanoma cells. *European journal of medicinal chemistry*, 46 (12), 5991–6001.
- Patočka, J. (2003). Biologically active pentacyclic triterpenos and their current medicine Signification. *J. App. Biomed.*, 1, 7-12.
- Paulin-L, M., Giese, G., Scherbarth, A. and Traub, P. (1989). Expression of vimentin and nuclear lamins during the in vitro differentiation of human promyelocyte leukemia cells HL-60. *European Journal of Cell Biology.* 50, 453-461.

- Peragón, J., Aranda, F., García-Salguero, L. and Lupiáñez, J. (1989). Influence of experimental diabetes on the kinetic behaviour of renal cortex hexose monophosphate dehydrogenases. *Int. J. Biochem.*, 21, 689-694.
- Ponnapalli, M., Annam, S., Ravirala, S., Sukki, S., Ankireddy, M. and Tuniki, V. (2012). Unusual isomeric corniculatolides from mangrove, *Aegiceras corniculatum*. *Journal of natural products*, 75 (2), 275-279.
- Proctor, PH. and Reynolds, ES. (1984). Free radicals and disease in man. *Physiol. Chem. Phys.*, 16: 175-195. 1984.
- Pungitore, C., Padron, M., León, G., García, C., Ciuffo, G., Martín, V. and Tonn, C. (2007). Inhibition of DNA topoisomerase I and growth inhibition of human cancer cell lines by an oleanane from *Junellia aspera* (Verbenaceae). *Cell Mol. Biol.*, 15, 13-17.
- Pungitore, CR., García, M., Gianello, J., Sosa, M. and TONN, CE (2005). Insecticidal and antifeedant effects of *Junellia aspera* (Verbenaceae) triterpenes and derivatives on *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.*, 41, 433–443.
- Qian, Y., Guan, T., Tang, X., Huang, L., Huang, M., Li, Y. and Sun, H. (2011). Maslinic acid, a natural triterpenoid compound from *Olea europaea*, protects cortical neurons against oxygen-glucose deprivation-induced injury. *European Journal of Pharmacology*. 670 148–153.
- Qian, Y., Guan, T., Tang, X., Huang, L., Huang, M., Li, Y. and Sun, H. (2011). Maslinic acid, a natural triterpenoid compound from *Olea europaea*, protects cortical neurons against oxygen-glucose deprivation-induced injury. *European journal of pharmacology*, 670 (1), 148–153.
- Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A. and Lunardiet, J. (1997). "Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients." *Electrophoresis*, 18: 307-16.
- Rafatian, G., Khodagholi, F., Farimani, M., Abraki, S. and Gardaneh, M. (2012). Increase of autophagy and attenuation of apoptosis by Salvigenin promote survival of SH-SY5Y cells following treatment with H₂O₂. *Molecular and cellular biochemistry*, 371 (1-2), 9–22.
- Rao, R., Miano, J., Olson, E. and Seidel, C. (1997). The A10 cell line: a model for neonatal, neointimal, or differentiated vascular smooth muscle cells? *Cardiovascular research*, 36 (1), 118–26.

- Rawal, RM., Patel, DD., Patel, BP., Patel, MM., Wadhwa, MK., Patel, PS. and Bhatavdekar, JM. (1999). Assessment of glutathione-S-transferase and glutathione reductase in patients with squamous-cell carcinoma of buccal mucosa. *Int. J. Cancer*. 83, 727-731.
- Reyes, F., Centelles, J., Lupiáñez J. and Cascante, M. (2006). (2 α , 3 β)-2, 3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new natural triterpene from *Olea europea*, induces caspase dependent apoptosis selectively in colon adenocarcinoma cells. *FEBS Lett.*, 580, 6302-6310.
- Reyes-Zurita, F., Pachón-Peña, G., Lizárraga, D., Rufino-Palomares, E., Cascante, M. and Lupiáñez, J. (2009b). The long-term effect of maslinic acid upon apoptosis induced in HT29 colon adenocarcinoma cells via caspase expression. *Comp. Biochem. Physiol.* (En prensa).
- Reyes-Zurita, F., Pachón-Peña, G., Lizárraga, D., Rufino-Palomares, E., Cascante, M. and Lupiáñez, J. (2011). The natural triterpene maslinic acid induces apoptosis in HT29 colon cancer cells by a JNK-p53-dependent mechanism. *BMC cancer*. 11 (1), 154.
- Reyes-Zurita, F., Rufino-Palomares, E., Lupiáñez J. and Cascante, M. (2009a). Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea L.*, induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Lett.*, 273, 44-54.
- Rodríguez-Rodríguez, R. and Ruiz-Gutiérrez, V. (2010). Functional properties of pentacyclic triterpenes contained in pomace olive oil. In: *Olives and olive oil in health and disease prevention*. Edited by VR Preedy and RR Watson. Academic Press, London, UK.
- Rodríguez-Rodríguez, R., Perona, J., Herrera, M. and Ruíz-Gutiérrez, V. (2006). Triterpenic compounds from "orujo" olive oil elicit vasorelaxation in aorta from spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 2096-2102.
- Romashkova, JA. and Makarov, SS. (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*. 401, 86-90.
- Romero, C., García, A., Medina, E., Ruíz-Méndez, M., Castro, A. and Brenes, M. (2010). Triterpenic acids in table olives. *Food Chemistry*, 118 (3), 670-674.
- Rudiyansyah and Garson, M. (2006). Secondary metabolites from the wood bark of *Durio zibethinus* and *Durio kutejensis*. *J. Nat. Prod.*, 69, 1530.

- Rufino-Palomares, E., Reyes-Zurita, F., Fuentes-Almagro, C., De la Higuera, M., Lupiáñez, J. y Peragón, J. (2011). Proteomics in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to elucidate the cellular response induced by the intake of maslinic acid. *Proteomics*, 11 (16), 3312–3325.
- Saimaru, H., Orihara, Y., Tansakul, P., Kang, Y., Shibuya, M. y Ebizuka, Y. (2007). Production of triterpene acids by cell suspension cultures of *Olea europaea*. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 55, 784-788.
- Sánchez-González M, Lozano-Mena G, Juan ME, García-Granados A. and Planas JM. (2013). Assessment of the safety of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea*. *L.Mol Nutr Food Res.* 57 (2): 339-46
- Sen, CK. (2000). Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Top Rerul.* 36, 1-30.
- Serra, C., Lampis, G., Pompei, R. and Pinza, M. (1994). Antiviral activity of new triterpenic Derivatives. *Pharmacol. Res.*, 29, 359-366.
- Shen, Y., Zhang, Q., Gao, X. and Ding, F. (2011). An Active Fraction of *Achyranthes bidentata* Polypeptides Prevents Apoptosis Induced by Serum Deprivation in SH-SY5Y. *Neurochem Res.* 36 (11): 2186-94.
- Singh, N. and Rajini, PS. (2008). Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against oxidative damage. *Chem Biol Interact.* 173 (2), 97-104.
- Sivaramakrishnan, V., Shilpa, PN., Praveen Kumar, VR. and Niranjali Devaraj, S. (2008). Attenuation of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinogenesis by a novel flavonol-Morin. *Chem. Biol. Interact.* 171, 79-88.
- Sloane, BF, Honn, KV., Sadler, JG., Turner, WA., Kimpson, JJ. and Taylor, JD. (1982). Cathepsin B Activity in B16 Melanoma Cells: A Possible Marker for Metastatic Potential. *Cancer Research*, 42, 980–986.
- Sreepriya, M. and Bali, G. (2006). Effects of administration of *Embelin* and *Curcumin* on lipid peroxidation, hepatic glutathione antioxidant defense and hematopoietic system during Nnitrosodiethylamine/Phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in Wistar rats. *Mol. Cell. Biochem.* 284, 49-55.

- Smith, DL., Nolden, LK., Mills, GB. and Lu, Y. (2007). In: Apoptosis, senescence and cancer. Eds Gewirtz, DA., Holt, SE. and Grant, S., Humana Press, New Jersey, 313-334.
- Spector, A. and Garner, W. (1981). Hydrogen peroxide and human cataract. *Exp Eye Res*, Dec. 33 (6): 673-681.
- Spiliotis, ET., Kinoshita, M. and Nelson, WJ. (2005). A mitotic septin scaffold required for Mammalian chromosome congression and segregation. *Science*. 307, 1781-1785.
- Sroka, Z. and Cisowski, W. (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and antiradical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol*. 41, 753-758.
- Stepp, M., Kindy, M., Franzblau, C. and Sonenshein, G. (1986). Complex regulation of collagen gene expression in cultured bovine aortic smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. 261 (14), 6542-6547.
- Stiti, N., Triki, S. and Hartmann, M.A. (2007). Formation of triterpenoids throughout *Olea europaea* fruit ontogeny. *Lipids*, 42, 55-67.
- Sultana, N. and Lee, N. (2007). Antielastase and free radical scavenging activities of compounds from the stems of *Cornus kousa*. *Phytother Res*. 21, 1171-1176.
- Taniguchi, S., Imayoshi, Y., Kobayashi, Y., Takamatsu, H., Ito, T., Hatano, H., Sakagami, H., Tokuda, H., Nishino, D., Sugita, S., Shimura, Y. and Yoshida, T. (2002). Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica calli*. *Phytochemistry*. 59, 315-323.
- Tort, L., Kargucin, B., Tom-es, P., Giralt, M. and Hidalgo, I. (1996). The Effect of Cadmium Exposure and Stress on Plasma Cortisol, Metallothionein Levels and Oxidative Status in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Liver. *Camp. Biochem. Physiol*. 114 (1), 29-34.
- Ullah, F., Hussain, H., Hussain, J., Bukhari, I.A., Khan, M., Choudhary, M., Gilani, A. and Ahmad, V. (2007). Tyrosinase inhibitory pentacyclic triterpenes and analgesic and spasmolytic activities of methanol extracts of *Rhododendron collettianum*. *Phytother Res*. 21, 1076-1081.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, MT., Mazur, M. and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39 (1): 44-84.

- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1-40.
- Van der Vliet, A., O'Neill, C.A., Cross, C.E., Koostra, J.M., Volz, W.G., Halliwell, B. and Louie, S. (1999). Determination of low-molecular-mass antioxidant concentrations in human respiratory tract lining fluids. *Am J Physiol.* 276 (21): 289-96.
- Vlahov, G., Rinaldi, G., Del Re, P. and Giuliani, A.A. (2008). ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the different components of epicuticular waxes of olive fruit (*Olea europaea*) *Dritta cultivar*. *Anal Chim Acta.* 624, 184-94.
- Vlietinck, A., De Bruyne, T., Apers, S. and Pieters, L. (1998). Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Med.* 64:97-109.
- Wang, R., Wei, S., Wang, L., Liu, R., Yi Ding, R., and Du, L. (2006). Constituents of the flowers of *Punica granatum*. *Fitoterapia.* 77, 534-537.
- Warburg, O. and Christian, H. (1931). Aktivierung von Kohlehydrat in roten Blutzellen. *Biochem. Z.* 238:131
- Weatherley, A. and Gill, A., (1984). Growth dynamics of white myotomal muscle fibres in the bluntnose minnow, (*Pimephales notatus*) Rafinesque, and comparison with rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Richardson. *J. Fish Biol.* 25, 13-24.
- Weatherley, A. and Gill, A., (1989). The role of muscle in determining growth and size in teleost fish. *Experientia*, 45, 875-878.
- Wen, X., Sun, H., Liu, J., Wu, G., Zhang, L., Wu, X. and Ni, P. (2005). Pentacyclic triterpenes. Part 1: the first examples of naturally occurring pentacyclic triterpenes as a new class of inhibitors of glycogen phosphorylases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 4944-4948.
- Wen, X., Zhan. P., Liu, J., Zhang, L., Wu, X., Ni, P. and Sun, H. (2006). Pentacyclic triterpenes. Part 2: Synthesis and biological evaluation of maslinic acid derivatives as glycogen phosphorylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16, 722-726.
- Wink, D.A., Cook, J.A., Pacelli, R., DeGraff, W., Gamson, J., Liebmann, J., Krishna, M.C. and Mitchell, J.B. (1996). The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: a direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Arch Biochem Biophys.* 331: 241-248.

- Wittmann-Liebold, B., Graack, HR. and Pohl, T. (2006). Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics*. 6, 4688- 703.
- Wu, D., Zhao, D., Li, D., Xu, D., Chu, W. and Wang, X. (2011). Maslinic acid induces apoptosis in salivary gland adenoid cystic carcinoma cells by Ca^{2+} evoked p38 signaling pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 383 (3), 321–330.
- Xu, H., Zeng, F., Wan, M. and Sim, K. (1996). Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. *J. Nat. Prod.* 59, 643-645.
- Yamazaki, D., Kurisu, S. and Takenawa, T. (2005). Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci.* 96, 379-386.
- Yang, Z., Li, H., Wang, L., Li, Y., Lu, S., Wen, X., Wang, J., Daikonya, A. and Kitanaka, S. (2007). Triterpenoids from *Hippophae rhamnoides* L. and their nitric oxide production-inhibitory and DPPH radical-scavenging activities. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo). 55, 15-18.
- Yap, WH., Khoo, KS., Lim, SH., Yeo, CC. and Lim, YM. (2012). Proteomic analysis of the molecular response of Raji cells to maslinic acid treatment. *Phytomedicine*. 19, 183-191.
- Yin, MC., Lin, MC., Mong, MC. and Lin, CY. (2012). Bioavailability, distribution, and antioxidative effects of selected triterpenes in mice. *J Agric Food Chem.* 60 (31): 7697-701.
- Zhang, L. and Ma, T. (1995). Antagonistic effect of oleanolic acid on anaphylactic shock. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 16, 527-530.
- Zhao, J. and Majewskiet, H. (2008). Endothelial nitric oxide attenuates $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger-mediated vasoconstriction in rat aorta. *Br J Pharmacol.* 154: 982–990
- Zheng, YK. and Oegema, K. (2008). Cell structure and dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 1-3.

* Corresponding author. Tel: + 34 958 243089; fax: + 34 958 249945.
** Corresponding author. Tel: + 34 953 212523; fax: + 34 953 211875.
E-mail addresses: jlcars@ugr.es (J.A. Lupiáñez), jperagon@ujaen.es (J. Peragón).

1874-3919/\$ - see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.02.031>

El ácido maslínico es un triterpeno pentacíclico presente en la capa cerosa que recubre el fruto y la hoja del olivo, perteneciente al grupo de los oleanano triterpenoides. Este compuesto ha mostrado de forma preliminar propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antioxidantes, activadoras del sistema inmune, antivirales, entre otras. Las propiedades antioxidantes del ácido maslínico han sido poco estudiadas, por lo cual, en este trabajo se resalta la necesidad de determinar la capacidad antioxidante de dicho compuesto en situaciones de estrés oxidativo sobre líneas celulares cultivadas *in vitro*, previamente tratadas con tres condiciones estresantes (privación de suero, presencia de peróxido de hidrógeno y nitroprusiato sódico).

Para llevar a cabo dicho estudio se realizaron diferentes ensayos utilizando líneas celulares de melanoma murino (B16-F10) y células normales de músculo liso (A10). Estos ensayos consistieron, en primer lugar, de estudios de viabilidad celular mediante incorporación de MTT en la determinación de la concentración IC_{50} en ambas líneas celulares. Los tratamientos siguientes fueron realizados con concentraciones inferiores a dicho IC_{50} . Posteriormente, fue determinada la actividad celular mediante citometría de flujo por uso de 1, 2, 3-dihidrorodamina y finalmente, se analizaron los niveles de expresión y de actividad de las enzimas relacionadas con la defensa antioxidante. Los resultados permitieron determinar que el ácido maslínico es efectivo en la protección contra el daño oxidativo celular causado a nuestras células. Este hecho demostró en las condiciones experimentales, el AM tiene un claro efecto sobre la actividad de estas enzimas, modificando la actividad de las mismas; y, por otro lado, también es capaz de inducir la mayor o menor expresión de estas enzimas, dependiendo del estado de estrés y dependiendo de la dosis del mismo y del tipo celular, ya que este efecto protector es mayor en las células normales estresadas, que las tumorales.

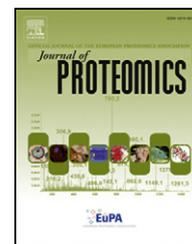
Teniendo en cuenta que estos compuestos pueden también afectar significativamente los procesos de crecimiento en condiciones normales, se decidió estudiar los aspectos moleculares relacionados con los posibles efectos proliferativos junto con su efecto protector apoptótico provocado por el estrés oxidativo ocasionado por la privación del suero en líneas celulares de origen humano cultivadas *in vitro*, ya que este efecto fue observado previamente en peces. Para llevar a cabo dicho estudio se han realizado diferentes ensayos utilizando como modelo las líneas celulares de carcinoma humano HT29 (carcinoma de colon) y HepG2 (hepatoma). Para corroborar y comprobar si realmente el ácido maslínico inducía un efecto proliferativo sobre células en cultivo, se estudió la acción de dicho compuesto sobre el ciclo celular por citometría de flujo y la actividad enzimática de la defensa antioxidante. Para continuar caracterizando este efecto y corroborar los resultados anteriores, se analizaron los niveles de expresión de las proteínas p-IkB y p-Akt, ambas implicadas en procesos de proliferación. Para ello, se determinó la concentración de proteínas por el método BCA. Los resultados mostraron una mayor cantidad de proteína a las concentraciones de $IC_{50/4}$ e $IC_{50/8}$, con respecto al control negativo tanto en el caso de HepG2, como en el caso de HT29. Resultados que concuerdan con los obtenidos en el conteo celular. Los ensayos de expresión por western-blot de los niveles de proteínas p-Akt y p-IkB mostraron una disminución dosis dependiente de la expresión de estas proteínas, así cuanto mayor es la concentración del ácido maslínico, menor es la expresión de las proteínas, estos resultados podrían explicar el efecto proliferativo del compuesto observado a bajas dosis.

Para profundizar sobre el mecanismo de acción de MA como agente antitumoral, hemos investigado sus efectos sobre el citoesqueleto. Se utilizó un procedimiento de proteómica basado en la electroforesis bidimensional en gel, análisis de masas et huellas dactilares de masa péptica. La incubación de las células HT29 con MA llevó a un arresto de la fase G_1 del ciclo celular. Después de 24 horas de exposición a $3,7 \mu M$ ($IC_{50/8}$) y $30 \mu M$ de MA (IC_{50}) catorce proteínas del citoesqueleto diferencialmente expresadas podrían ser reconocidas. Un grupo de estas proteínas, compuesto de queratina 2, queratina 8, queratina tipo II citoesqueletal 8, queratina tipo I citoesqueletal 9, queratina tipo I citoesqueletal 18, citoqueratinas 18 y 19, y β -actina, ejercen una función estructural, mientras que otro grupo, compuesto de lamina B1, gelsolina 1, septina 2, villina 1, proteína 2 relacionada con actina y moesina, está relacionada con la nucleación de la actina y la formación de citoesqueleto. Los cambios en la expresión de moesina, villina 1 y β -actina identificados por las técnicas de proteómica fueron corroborados por Western Blot. Esta es la primera evidencia obtenida de los efectos reguladores de MA en el citoesqueleto, que puede llegar a ser una de las bases de su efecto anti-proliferativo contra las células de cáncer de colon.



Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

Maslinic acid, a triterpenic anti-tumoural agent, interferes with cytoskeleton protein expression in HT29 human colon-cancer cells

Eva E. Rufino-Palomares^a, Fernando J. Reyes-Zurita^a, Leticia García-Salguero^a, Khalida Mokhtari^a, Pedro P. Medina^a, José A. Lupiáñez^{a,*}, Juan Peragón^{b,**}

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology I, Faculty of Sciences, University of Granada, Campus Fuentenueva, 18001 Granada, Spain

^bBiochemistry and Molecular Biology Section, Department of Experimental Biology, University of Jaén, Campus Las Lagunillas, 23071 Jaén, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 November 2012

Accepted 25 February 2013

Keywords:

Maslinic acid

Cytoskeleton

HT29

ABSTRACT

Maslinic acid (MA) is an anti-tumoural agent which shows potent anti-proliferative properties against the HT29 colon-cancer cells. To shed light upon the active mechanism of MA we have investigated its effects upon the cytoskeleton. We used a proteomics procedure based on two-dimensional gel electrophoresis, mass analysis and peptide mass fingerprinting. The incubation of HT29 cells with MA led to G1 cell-cycle arrest. After 24 hours' exposure to 3.7 μ M (IC_{50/8}) and 30 μ M (IC₅₀) MA fourteen differentially expressed cytoskeletal proteins could be discerned. One group of these proteins, made up of keratin 2, keratin 8, keratin type II cytoskeletal 8, keratin type I cytoskeletal 9, keratin type I cytoskeletal 18, cytokeratins 18 and 19, and β -actin, exert a structural function, whilst another group, made up of lamin B1, gelsolin 1, septin 2, villin 1, actin-related protein 2 and moesin, is related to the nucleation of actin and cytoskeleton formation. Changes in the expression of moesin, villin 1 and β -actin identified by the proteomics techniques were corroborated by Western blotting. This is the first evidence obtained of the regulatory effects of MA on the cytoskeleton, which may prove to be one of the bases of its anti-proliferative effect against colon-cancer cells.

Biological significance

In this paper we describe the changes in the expression of different cytoskeleton proteins identified by the proteomics techniques and corroborated by Western blotting. This is the first evidence obtained of the regulatory effects of MA on the cytoskeleton, which may prove to be one of the bases of its anti-proliferative effect against colon-cancer cells.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In recent decades colon cancer has become one of the leading causes of cancer-related deaths [1]. Conventional anticancer therapies have not yet achieved significant improvement in preventing the progression of colon-cancer. Maslinic acid (2- α ,

3- β -dihydroxyolean-12-en-28-oic acid) (MA) is a pentacyclic triterpenic compound abundantly present in the olive (*Olea europaea* L.) [2] (Fig. 1A). In olive tree of the Picual variety, the concentration reported of MA is 1.5 g/kg of dry weight in the fruit [3], 4.8 g/kg of dry weight in the leaf [3], and 17.03 mg/kg of virgin olive oil [4]. MA has important properties with regard

* Corresponding author. Tel.: +34 958 243089; fax: +34 958 249945.

** Corresponding author. Tel.: +34 953 212523; fax: +34 953 211875.

E-mail addresses: jlcara@ugr.es (J.A. Lupiáñez), jperagon@ujaen.es (J. Peragón).

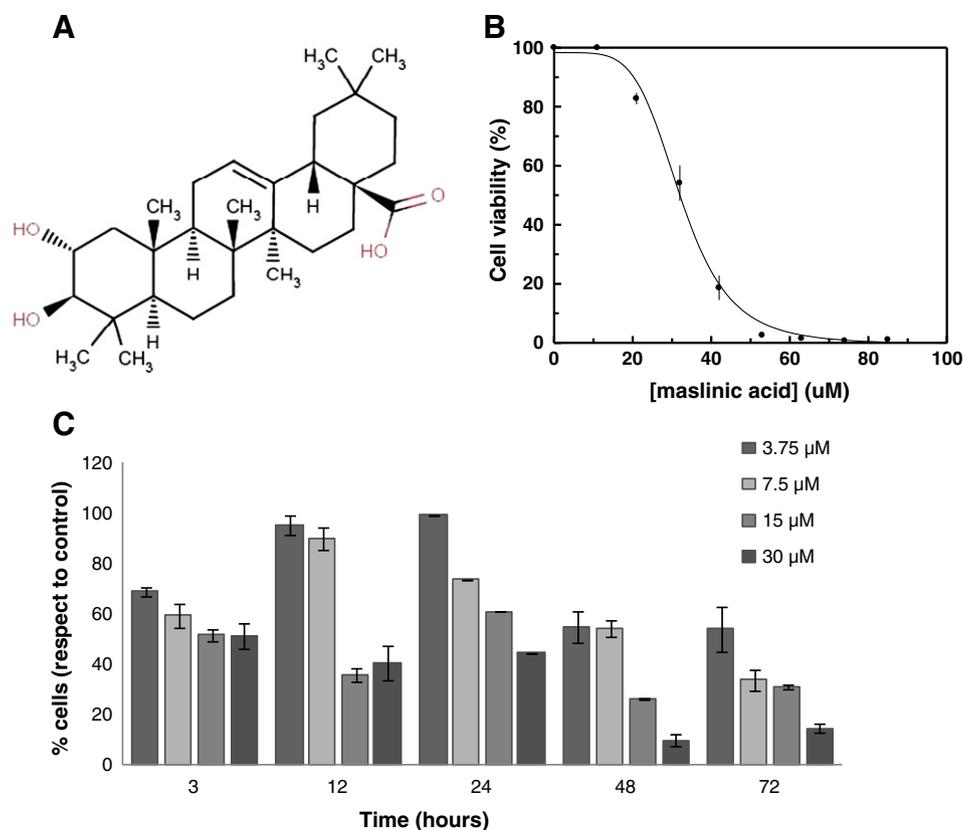


Fig. 1 – A. Structure of maslinic acid. B. Effect of maslinic acid on HT29 human colon-cancer cell proliferation. HT29 cells (6×10^3 cells/well) were seeded in 96-well tissue-culture plates followed by treatment with the indicated concentrations of MA for 24 h. Cell proliferation was determined by MTT assay. C. HT29 cells were treated with 3.75, 7.5, 15 and 30 μM of maslinic acid for 3, 12, 24, 48 and 72 h. Cell viability was determined in a Neubauer counting chamber and cell viability was expressed as a percentage compared to the untreated control. Results are mean value \pm SEM ($n = 6$) $p < 0.05$.

to maintaining cellular growth and health [5–8] and also preventing certain diseases [9,10]. Within this context it has recently been demonstrated that MA may act as an anti-tumoural agent. It has potent differentiating and anti-proliferation properties against HT29 and Caco2 colon-cancer cell lines, inducing cell-cycle arrest in the G0 phase and apoptosis through caspase activation in these cancer cells but not in normal intestinal cell lines. It induces an apoptotic process characterized by caspase-3 activation by a mechanism that appears to be independent of p53, occurring as it does via mitochondrial disturbances and cytochrome c release [11,12].

The cytoskeleton is considered to be the backbone of a cell as it provides the cell with its shape and structure [13]. In most eukaryotic cells, the cytoskeleton is made up of three major components: actin microfilaments, with a diameter of around 6 nm, which are essential for maintaining the shape of the cell and inter- and intracellular transport; microtubules, with a diameter of around 23–25 nm, which contain tubulin protein and are important for intracellular transport and cell division, during which they form spindle fibres; and intermediate filaments, with a diameter of around 10 nm, which constitute a family of proteins including keratin, desmin and peripherin, among others, all of which play a role in maintaining cell

shape and its internal organisation [14,15]. One critical step in the neoplastic process is the acquisition by tumour cells of a motile, invasive phenotype. Invasive cancer cells harbour protrusive actin structures known as lamellipodia and filopodia. These extensions depend largely upon a local dynamic reorganisation of the actin cytoskeleton, which in turn is finely tuned by multiple actin-binding proteins [16–18]. Some reports indicate that there are alterations in expression and interaction among several cytoskeletal proteins during early carcinogenesis [19]. It has recently been reported that the expression of some actin-binding proteins, such as gelsolin, villin, moesin and septin, increases concomitantly with the growth of colon-cancer cells [20–22].

Our aim therefore has been to investigate the effects of MA on cytoskeleton protein levels in HT29 cells according to the hypothesis that the anti-carcinogenic properties of MA may reside in its interference with the structure and function of the cytoskeleton. To this end we used the HT29 cell line as an experimental model to study colon adenocarcinoma. The tumorigenic capacity of these cells has been shown in nude mice, in which they form moderately well differentiated adenocarcinomas consistent with primary colon (grade II). On reaching confluence the cells express enterocyte differentiation characteristics. Doubling time is around 62 h (ATCC:

HTB-37). The line is positive for the expression of oncogenes: p53–, ras+, myc+, TGF b–, TGF a+ [8].

To identify the cytoskeleton proteins that are differentially expressed in the HT29 human adenocarcinoma cell line in response to MA we used a proteomic approach. The response of HT29 cells to MA was assessed by recording changes in the protein expression pattern as shown by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and the identification of these proteins by the analysis of trypsin-digested peptides via mass spectrometry (MS). We used peptide mass fingerprinting (PMF) combined with partial sequences obtained through matrix-assisted laser desorption/ionization and in-tandem time-of-flight MS analysis (MALDI-TOF/TOF) to identify the protein spots. Western blotting was used to assess the variation in their levels in response to MA. The cytoskeleton protein response to MA provides useful insights into the chemoprotective effect of MA against the development and proliferation of these human tumoural cells.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and drugs

The chemicals and materials used for 2-DE analysis were supplied by BioRad Laboratories (Hercules, USA) and GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Specific reagents used for making buffers and other solutions came from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, USA) and Fluka (Buchs SG, Switzerland).

Maslinic acid was obtained from olive pomace and kindly donated by Biomaslinic S.A. Granada, Spain. The extract is a chemically pure white powder composed of 98% maslinic acid and is stable when stored at 4 °C. It was dissolved before use at 10 mg/mL in 50% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 50% phosphate buffer solution (PBS). Stock solution was frozen and stored at 20 °C. The solution was diluted in cell-culture medium for assay purposes.

2.2. Cell line

Human colorectal adenocarcinoma cell line HT29 (ECACC no. 91072701), originally isolated from a colon cancer in a 72-year-old Caucasian male, was provided by the cell bank of the University of Granada, Spain. It was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM glutamine, 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS), 10,000 units/mL penicillin and 10 mg/mL streptomycin. The cell line was maintained in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C. Cells were passaged at pre-confluent densities in a solution containing 0.05% trypsin and 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (PAA).

2.3. Cell proliferation and cell cycle

Cell-proliferation was assayed according to a variation of the method described by Mosmann [23]. Samples containing 200 µL of cell suspension were cultured on 96-well plates (6 × 10³ cells/well). Cells were adhered by incubating for 24 h at 37 °C. Different MA solutions were then added separately to

make MA concentrations of between 0 and 212 µM a well and the cells were incubated for 24 h at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂. Sterile solution, filtered 5 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) dissolved in PBS and DMEM medium was added to all the wells at a final concentration of 0.5 mg/mL. Following 1 hour's incubation the formazan thus generated was dissolved with 100 µL DMSO per well. Optical density was measured on an ELISA plate reader (ELISA, ELx800, BioTek.) at 550 nm. Absorbance was proportional to the number of viable cells. The MA concentration leading to 50% inhibition of cell proliferation (IC₅₀) was determined.

We also counted the cells after their exposure to different times and doses of MA. HT29 cells were treated with 0, 3.75, 7.5, 15 and 30 µM of MA for 3, 12, 24, 48 and 72 h. Cell viability was assessed by Trypan-blue exclusion assay in a Neubauer chamber. Cell percentage viability was expressed as a percentage compared to the untreated controls.

The cell cycle was analysed by flow cytometry using a fluorescence-activated cell sorter (FACS) as described elsewhere [24]. 15 × 10⁴ HT29 cells/well were seeded in 12-well plates with 2 mL of medium. After 24 h 3.75 and 30 µM doses of MA were added and the cells were incubated for a further 24 h. The cells were subsequently washed with PBS, detached with trypsin and centrifuged. The supernatant was removed and the pellet was resuspended in 500 µL Tris–buffer solution (TBS) containing 10 mM of Tris and 150 mM of NaCl together with 25 µL of 1 mg/mL propidium iodide (PI) staining solution and 500 µL of Vindelov/PI solution (10 mM Tris, 10 mM NaCl, 10 µg/mL RNasa, 50 µg/mL IP, 0.01% Igepal). The final PI concentration was 100 µg/mL. The cells were incubated for 1 h at 4 °C before being analysed by flow cytometry.

2.4. Protein extraction for 2-DE

To prepare the samples, cells at 70% confluency were incubated for 24 h without FCS to synchronize the cell-cycle phase and subsequently incubated with IC₅₀ and IC_{50/8} concentrations of MA for 24 h. They were then washed three times with PBS, scraped off with a cell scraper (Renner) and put into 0.5 mL of lysis buffer containing 8 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 2% IPG buffer, 20 mM dithiothreitol (DTT), 100 mM HCl–Tris, 0.75 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (pH 8) before being immediately sonicated on ice for 5 min and shaken gently for 1 h at 4 °C. During this time the samples were moderately shaken in a vortex every 15 min. Lysates were centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4 °C. The supernatants were used for 2-DE and the protein concentration measured by CB-X™ Protein Assay (G-Biosciences, St Louis, USA). Three replicates of the homogenates were prepared for each experimental group, each being made up of 3 different populations of cells.

2.5. 2-DE

Protein extracts (100 µg) were incubated for 30 min in 450 µL of rehydration buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1-propane sulphonate (CHAPS), 30 mM DTT, 0.5% Pharmalyte 5–8 and bromophenol blue traces. The samples were loaded onto

17 cm (pH 4–7) Immobiline DryStrips (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). After 2 hours' passive and 10 hours' active (50 V) rehydration in a Protean IEF Cell (BioRad Laboratories, Hercules, USA) at 20 °C and 50 μ A/strip, the voltage was raised to 1000 and 4000 V in a 120-minute gradient, and to 8000 V in 30 min. The sample was maintained at 8000 to 50,000 V h for around 6 h. After isoelectric focusing, the strips were soaked for 15 min in an equilibration buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6 M urea, 30% glycerol, 2% sodium dodecyl sulphate (SDS), bromophenol blue traces and 20 mM DTT. The strips were then drained and soaked again for a further 15 min in the same mix plus 25 mM iodoacetamide. SDS-PAGE was done in 12% gels using the Protean Plus Dodeca cell (BioRad Laboratories, Hercules, USA) at 20 °C and 2.5 W/gel for 10 min, and 10 W/gel until separation was complete. The gels were stained with Sypro Ruby^R protein stain (BioRad Laboratories, Hercules, USA) compatible with MS analysis.

2.6. Quantitative analysis of gel images and statistical analysis

Gel images of three replicates per sample were made with a BioRad FX Pro Plus densitometer (BioRad Laboratories, Hercules, USA). Spot volumes, normalized by the total volume of all the validly matched spots in a set of gels, were quantified using the PDQuest Advanced software (BioRad Laboratories, Hercules, USA). Only spots showing at least a two-fold over-/under-expression ratio compared to any other sampling site were taken into account. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student's *t*-test were then used to choose the spots that showed altered expression patterns between the two experimental groups.

2.7. Protein digestion and MS analysis

Differentially expressed spots were automatically excised in an Investigator ProPic (Genomic Solutions, Cambridgeshire, UK). The gel pieces were digested with trypsin using a ProPrep II Automated Protein Digestion instrument (Genomic Solutions, Investigator Digilab, Cambridgeshire, UK) according to the following process: two 30-min destaining steps with 50% acetonitrile (ACN)/100 mM ammonium bicarbonate, two 15-min washes with 25 mM ammonium bicarbonate/50% ACN, dehydration for 5-min with 100% ACN, followed by drying. The sample was subsequently hydrated with 10 μ L of 12.5 ng μ L⁻¹ trypsin in ammonium bicarbonate for 45 min at 4 °C before being finally digested in a microwave for 2 \times 5 min. Digestion was stopped by adding 1 μ L of 10% trifluoroacetic acid (TFA). The peptides obtained were purified in a Pro MS device (Genomic Solutions, Cambridgeshire, UK) with a C18 microcolumn (ZipTip, Millipore, Billerica, USA) eluting with a matrix solution of 5 mg mL⁻¹ α -cyano-4-hydroxycinnamic acid dissolved in 70% ACN/0.1% TFA. 1 μ L aliquots of the eluted samples were directly spotted onto MALDI plates.

Mass analysis (MS) of the peptides in each sample was undertaken with a MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (4800 Proteomics Analyser, Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA) in the *m/z* range of 800 to 4000 and with an

accelerating voltage of 20 kV. Spectra were internally calibrated with peptides from trypsin autolysis ($M + H^+ = 842.509$, $M + H^+ = 2211.104$). The most abundant peptide ions were then subjected to fragmentation analysis (MS/MS) to provide information for use in determining the peptide sequence.

2.8. Database searching

Proteins were identified by PMF, which was confirmed by MS/MS analysis. The Mascot 2.0 search engine (Matrix Science Ltd., London, UK) was used for protein identification running on GPS ExplorerTM software v3.5 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) to search in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) protein database (updated monthly).

The search setting allowed one missed cleavage with the selected trypsin enzyme, a MS/MS fragment tolerance of 0.2 Da, a precursor mass tolerance of 100 ppm and cysteine carbamidomethylation and methionine oxidation as possible modifications. Proteins showing statistically significant ($p < 0.05$) changes in their expression were assigned positive identification after taking molecular-mass (*Mr*) and isoelectric-point (*pI*) values into consideration.

2.9. Western blotting

SDS-PAGE separation of soluble protein fractions in cell lysates was carried out according to Laemmli [25] in a Mini Protean II electrophoresis chamber (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Cytosolic extracts prepared as described in the section *Protein extraction for 2-DE* were mixed with 62.5 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH 6.8) buffer containing 20 g L⁻¹ SDS, 100 mL L⁻¹ glycerol, 25 g L⁻¹ β -mercaptoethanol, and 0.045 mmol L⁻¹ bromophenol blue and then heated for 5 min at 100 °C. Polypeptides were separated on 12% SDS-PAGE before being transferred to polyvinylidene fluoride membranes with a semi-dry electroblotting system at 1.5 mA cm⁻² for 45 min in a medium containing 25 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 192 mmol L⁻¹ glycine, 200 mL L⁻¹ methanol, and 1 g L⁻¹ SDS. Blots were blocked for 4–5 h at room temperature with a buffer containing 25 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 100 mmol L⁻¹ NaCl, 2.5 mmol L⁻¹ KCl (TBS) (pH 7.6), 1 mL⁻¹ Tween20, and 15 g L⁻¹ bovine serum albumin (BSA) (pH 7.6). Membranes were washed with TBS containing 1 mL L⁻¹ Tween 20 (TBS-T) for 15 min and then incubated with specific primary antibodies: anti-moesin 1:1000 (Sta. Cruz Biotechnology, sc-6410), anti-villin 1:1000 (Sta. Cruz Biotechnology, sc-136119), anti- β -actin 1:1000 (Sta. Cruz Biotechnology, sc-47778) and anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPDH) 1:10,000 (Sta. Cruz Biotechnology, sc-32233). After three 10-min washes with TBS-T containing 10 g L⁻¹ BSA (TBS-T-BSA) the membranes were incubated with a biotinylated goat antibody anti-rabbit-IgG, anti-mouse-IgG or anti-goat-IgG 1:10,000 to which horseradish peroxidase had been covalently coupled. Blots were developed using the ECL-Plus Western blotting detection system (Amersham) following the manufacturer's instructions. The specific signals were exposed to Konica Minolta film, which was scanned with a Hewlett-Packard scanner and quantifier using the Multi Gauge programme (Fuji Film Europe).

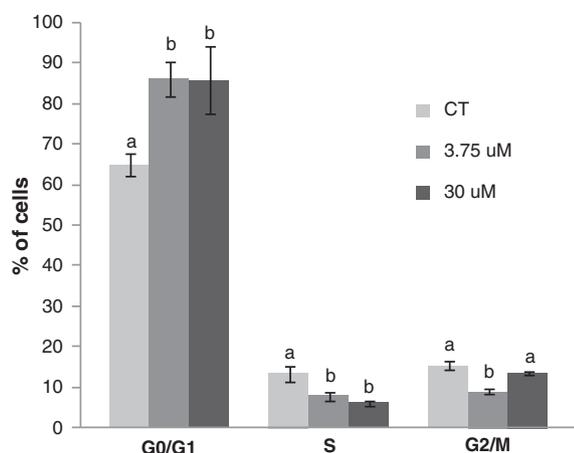


Fig. 2 – HT29 cell-cycle percentage distribution in response to treatment with 0 (Control, CT), 3.75 and 30 μM maslinic acid for 24 h. Cells were stained with propidium iodide (PI) and analysed by flow cytometry. PI flow was detected on FL2 and data displayed as a histogram showing the DNA content of cells in the G0/G1, S and G2/M cell-cycle phases. The cells were analysed for each data point. Values are expressed as mean ± SEM (n = 6) p < 0.05.

3. Results

3.1. MA inhibits proliferation of HT29 cells by a dose-dependent mechanism

We firstly examined the effect of MA upon the viability of HT29 colon-cancer cell lines by using the MTT assay (Fig. 1). HT29 cells were exposed to 0 to 212 μM of MA for 24 h and cell survival was then compared with untreated controls, as determined by formazan dye uptake. As shown in Fig. 1B, the percentage of living cells (viable formazan-accumulating cells) decreased concomitantly with dose. The concentration

of MA required for 50% inhibition of cell proliferation (IC_{50}) was $30 \pm 0.5 \mu\text{M}$. To study the effect of incubation time we also carried out a cell count after 3, 12, 24, 48 and 72 hours' exposure to MA (Fig. 1C). HT29 cells were incubated with four different concentrations of MA (0, 3.75, 7.5, 15 and 30 μM). In all cases the percentage of viable cells decreased concomitantly with the increase in the dose of MA. After 24 hours' treatment the decrease in cell percentage was gradual and dependent upon MA concentration. Thus for the proteomic studies we chose to expose the cells to 3.75 μM ($IC_{50/8}$) and 30 μM (IC_{50}) of MA for 24 h.

3.2. MA-induced G1 cell-cycle arrest in HT29 cultures

The proliferation and proportion of HT29 cells in different phases of the cell cycle after exposure to 3.75 and 30 μM MA for 24 h were observed by the incorporation of PI (Fig. 2). Flow cytometry analysis showed that MA led to G1 cell-cycle arrest. The increase in G1 cell population was accompanied by a decrease in the number of cells in both the S and G2 phases. With both doses of MA the cell percentages in the G0/G1 phase were 32% higher than in the control, suggesting that the effect of MA upon cell-cycle arrest in the G0 phase was not dosage dependent. This increase was accompanied by a concomitant decrease in the percentage of proliferating cells: 41% in phase S and 41% in phase G2/M with 3.75 μM of MA, and 13% in phase S and 54% in phase G2/M with 30 μM.

3.3. Proteomic analysis of cytoskeleton protein

Protein extracts from HT29 cells exposed for 24 h to 0, 3.75 and 30 μM of MA were analysed by 2-DE. Three gels were prepared for each treatment. The master gel contains the superposition of all the protein spots detected in these 9 gels. This master gel was chosen as a reference gel for the study, and the profiles of other gels were matched against it. 504 protein spots were detected in the master gel with molecular masses from 6.5 to 200 kDa. The isoelectric point (pI) ranged from 4 to 7.

Table 1 – Results deriving from peptide mass fingerprinting of protein spots from 2-DE gels.

Spot ^a	Identification	Species	Mass/PI (kDa/pI)	Peptides matches ^b	Access number (gi)	Mowse score ^c	Coverage (%) ^d
0013	Keratin 2	<i>Homo sapiens</i>	65.68/8.07	11	47132620	440	29
1307	Cytokeratin 19	<i>Homo sapiens</i>	44.06/5.04	31	90111766	875	76
1311	Keratin type II cytoskeletal 8	<i>Homo sapiens</i>	53.67/5.52	10	4504919	136	27
2610	Keratin type I cytoskeletal 9	<i>Homo sapiens</i>	62.25/5.14	10	55956899	116	24
3409	β-Actin	<i>Homo sapiens</i>	41.32/5.56	23	14250401	743	63
3411	Keratin type I cytoskeletal 18	<i>Homo sapiens</i>	48.03/5.34	33	4557888	860	70
3702	Lamin B1	<i>Homo sapiens</i>	66.65/5.13	24	15126742	363	45
4302	Cytokeratin 18	<i>Homo sapiens</i>	47.30/5.27	30	30311	777	72
4501	Keratin 8	<i>Homo sapiens</i>	53.77/5.52	26	49256423	558	57
6807	Gelsolin isoform 1	<i>Pan troglodytes</i>	72.40/8.03	17	114626487	267	40
8305	Septin 2	<i>Homo sapiens</i>	42.35/6.05	12	40788885	396	48
8802	Villin 1	<i>Homo sapiens</i>	93.12/5.93	11	62898357	76	16
9203	Actin-related protein 2	<i>Rattus norvegicus</i>	44.99/6.3	8	57164143	98	28
9704	Moesin	<i>Homo sapiens</i>	67.89/6.08	33	4505257	501	51

^a The ID number refers to spots listed in Fig. 3.

^b Number of peptides fragmented with homology.

^c MASCOT score > score corresponding to p < 0.001 (probability >99.9%).

^d Coverage percentage of the peptide sequence homology.

Proteins were considered to be differentially expressed between the two groups according to the following criteria: 1) there was a 2-fold difference in the abundance of spots; 2) the change was consistent for the three replicate analyses for each group. Quantitative analysis of the gels yielded 40 spots with significantly altered expression.

MS and MS/MS analyses were made after trypsin digestion. The results were used to undertake a combined database search. Of all the differentially expressed proteins 14 spots were identified as belonging to cytoskeleton proteins (Table 1,

Fig. 3). Identification relied on the matching of at least 3 peptides. Searches were made against all databases using major spectral peaks and matching errors ≤ 50 ppm. Most listed matches produced good MOWSE scores and high sequence coverage. The spots corresponding to cytoskeleton proteins were identified from protein or cDNA sequences already described in mammal species such as *Homo sapiens* (the most protein), *Rattus norvegicus*, and *Pan troglodytes*.

The cytoskeletal proteins identified were grouped into two categories according to their function: 1) proteins with a

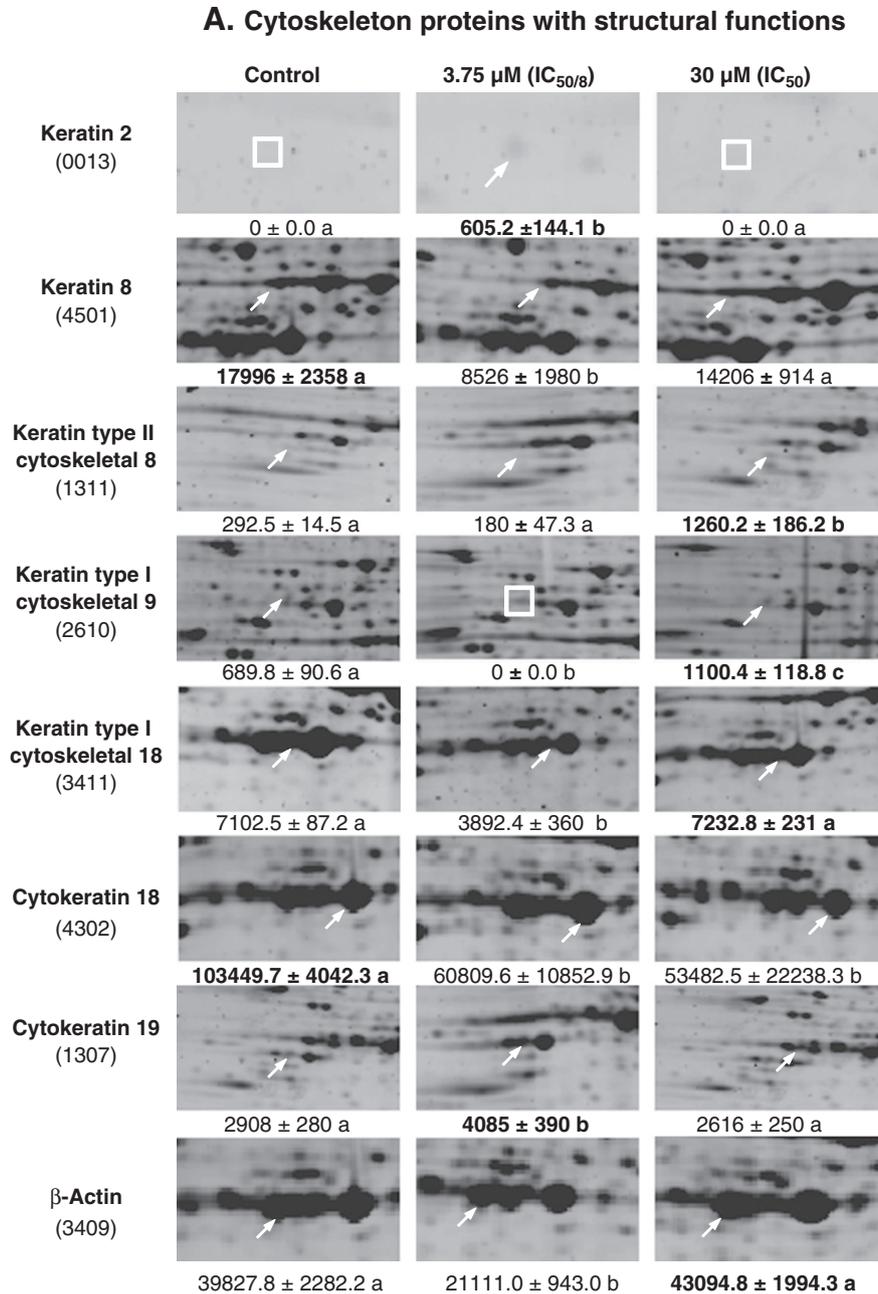


Fig. 3 – Focal 2-DE gel images showing the differential expression of the 14 proteins identified. Cytoskeletal proteins differentially expressed were grouped into 2 categories: 1) structural, and 2) related to nucleation and to the formation of actin cytoskeleton. Spot volumes (in arbitrary units) are given as means \pm SEM below representative 2-DE gel sections. The arrows indicate the intense spots and the squares the diffuse and hardly identifiable spots. Numbers in boldface indicate the sites with the highest volumes.

B. Proteins related to the nucleation of actin and cytoskeleton formation

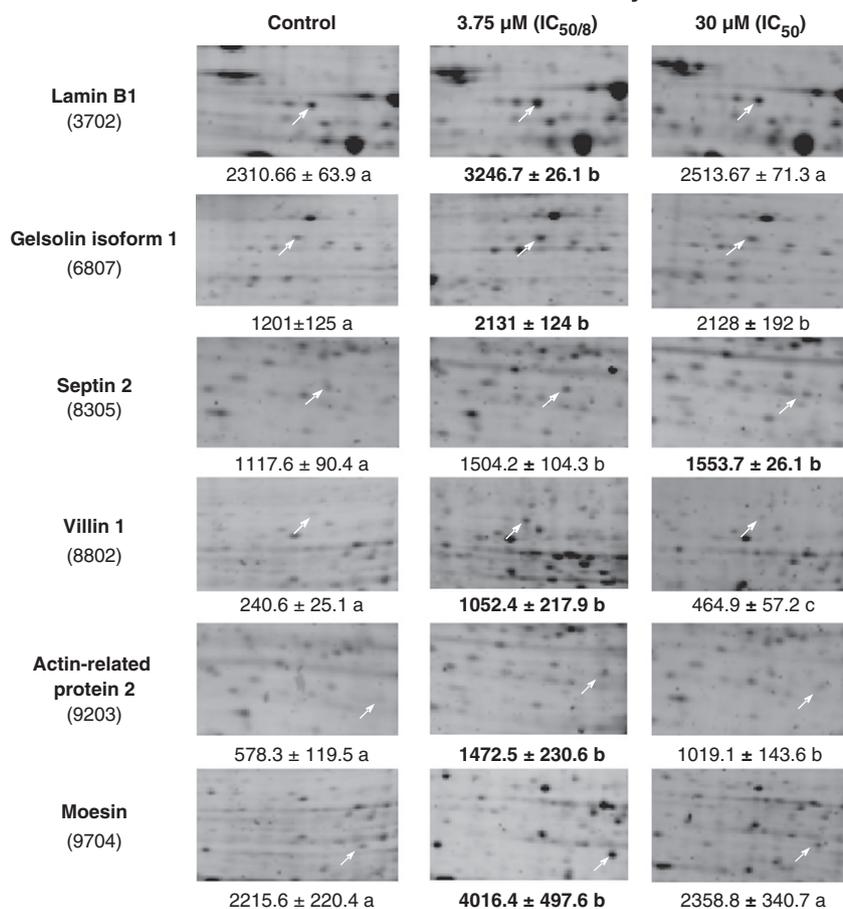


Fig. 3 (continued).

structural function, and 2) proteins related to the nucleation of actin and cytoskeleton formation. The proteins with a structural function were keratins of different types: keratin 2, keratin 8, keratin type II cytoskeletal 8, keratin type I cytoskeletal 9, keratin type I cytoskeletal 18, cytokeratin 18, cytokeratin 19 and β -actin. Proteins related to the nucleation of actin and cytoskeleton formation were: lamin B1, gelsolin isoform 1, septin 2, villin 1, actin-related protein 2 and moesin. The differences found in the expression of these proteins between the experimental treatments are shown in Fig. 3.

3.4. Effects of MA on the HT29 protein profile

MA triggered the up-regulation of 12 of the proteins identified: keratin 2, keratin type II cytoskeletal 8, keratin type I cytoskeletal 9, keratin type I cytoskeletal 18, cytokeratin 18, cytokeratin 19, β -actin, lamin B1, gelsolin isoform 1, septin 2, villin 1, actin-related protein 2 and moesin. Of these, 7 proteins: keratin 2, cytokeratin 19, lamin B1, gelsolin isoform 1, villin 1, actin-related protein 2 and moesin, were over-expressed after IC_{50/8} treatment, whilst 5 of them: keratin type II cytoskeletal 8, keratin type I cytoskeletal 9, keratin type I cytoskeletal 18, β -actin and septin 2 were over-expressed after IC₅₀ treatment. MA triggered the down-regulation of 4 of the proteins identified after IC_{50/8} treatment: keratin 8, keratin type I cytoskeletal 18, cytokeratin

18, and β -actin. In addition, it leads to down-regulation of two of these proteins, keratin 8 and cytokeratin 18, after IC₅₀ treatment.

3.5. Western blotting

To corroborate our findings with proteomics techniques we undertook an immunoblotting analysis to confirm the differential expression of 3 specific proteins: moesin, β -actin, and villin 1 (Fig. 4). HT29 cells were treated with 0, 3.75 and 30 μM MA for up to 24 h before being harvested and their total proteins extracted. The changes found in the expression of moesin (Fig. 4A), villin 1 (Fig. 4B) and β -actin (Fig. 4C) by immunoblotting agree in quality and number with those found previously in the proteomic analysis. These results corroborate the altered expression pattern seen by the proteomic approach for these three proteins assayed.

4. Discussion

Maslinic acid is a natural product present in relatively high concentrations in both olive fruit and oil and has many biological properties related to maintaining health and preventing some diseases. For some years now extensive research has been conducted into its possible anti-tumoural

properties. Our previous publications have described the potent differentiating and anti-proliferative properties of MA in colon-cancer lines. MA induces cell-cycle arrest in the G0 phase and apoptosis through caspase activation [10]. This may represent a useful mechanism for chemoprevention of and therapy against adenocarcinoma colon cancer. In this new study we have investigated another cell function that may be a target for the anti-tumoural activity of MA, the dynamics of the cytoskeleton, because it is clearly established that alterations in the intracellular organisation of the actin

cytoskeleton and its dynamic rearrangement are essential to cell changes that result in the metastatic potential and invasiveness of cancer cells [26,27].

The results shown in this work corroborate previous results reported by Reyes et al. [10] and Yap et al. [28] which demonstrate that MA inhibits proliferation of HT29 cells and induces G1 cell-cycle arrest. The IC_{50} value of $30 \pm 0.5 \mu\text{M}$ obtained by us after 24 hours' exposure to MA was significantly lower than the $61 \pm 1 \mu\text{M}$ reported by Reyes et al. in the HT29 cell line after 72 hours' exposure [10]. This indicates that the anti-proliferative action of MA is not only dose dependent but also time dependent, being more effective over shorter periods of exposure.

To investigate the effects of MA on cytoskeletal protein we used a proteomics procedure based on 2-DE and MS analyses. This procedure has been extensively used to assess differentially expressed proteomes of cancer cells in response to chemopreventive drug treatment and also to look for drug-specific biomarkers [29]. Our results show that the expression levels of 14 different proteins related to the cytoskeleton in HT29 human colon-cancer cells are modified in response to MA. These proteins are structural proteins such as keratins, cytokeratins and β -actin, and also actin-binding proteins such as lamin B1, gelsolin 1, septin 2, villin 1, moesin and actin-related protein 2. All the actin-binding proteins cited were up-regulated in HT29 cells exposed to MA. As far as the structural proteins are concerned, keratins 2, 8, 9 and 19 were up-regulated and keratins 8, 18, and β -actin were down-regulated in response to MA, whilst the 6 proteins related to the nucleation of actin and cytoskeleton formation were up-regulated. The results described for moesin, villin 1 and β -actin were corroborated by Western blotting. In most cases the greatest effects were observed at $3.75 \mu\text{M}$ MA. These results clearly demonstrate that MA not only produces an anti-proliferative effect but also regulates the organisation of the cell cytoskeleton in the HT29 human adenocarcinoma cell-line. This interference with the structure of the cytoskeleton may be another mechanism via which MA exerts its anti-tumoural effects.

The nuclear lamina is a meshwork of filaments 10 nm in diameter located on the inner face of the inner nuclear membrane [30]. The cytoskeletal components in the nucleus are involved in DNA cross-linking, transcription control and chromosome morphology [31,32]. The lamina is composed of proteins known as lamins, which are members of the

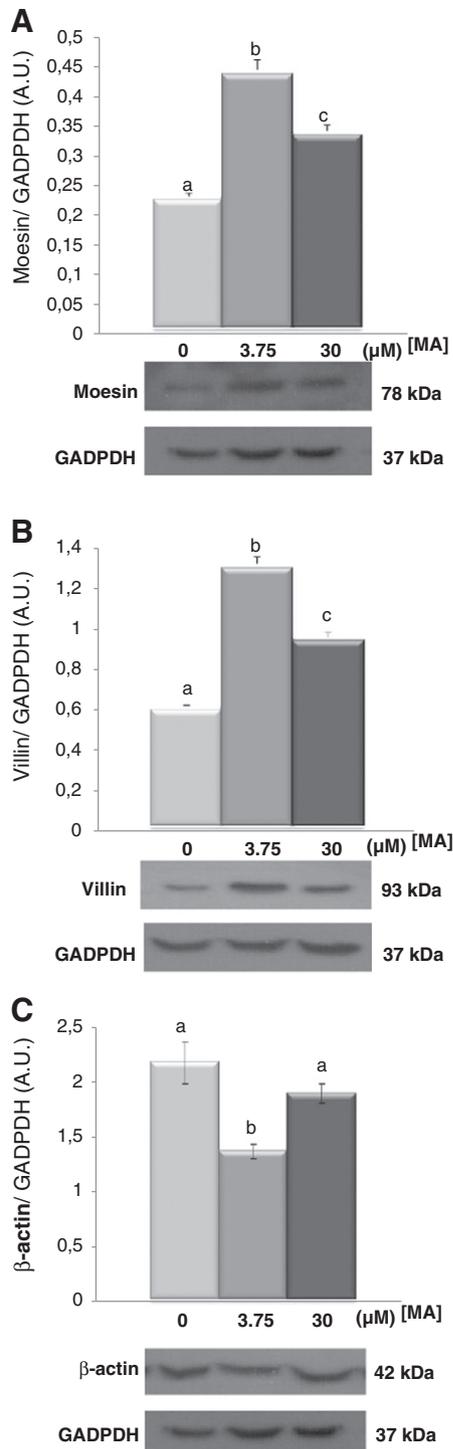


Fig. 4 – Western-blot analysis of moesin, villin 1 and β -actin protein levels in HT29 cells exposed to 0, 3.75 and $30 \mu\text{M}$ of maslinic acid. Proteins from cytosolic extracts of HT29 cells were subjected to 12% SDS-PAGE and then blotted onto a polyvinylidene difluoride membrane. The amount of protein load per lane was $50 \mu\text{g}$ in all cases. The polypeptide corresponding to the monomeric form of the proteins was detected with specific antiserum. The quantification of protein levels by densitometric analysis is shown in bar graphs. The results are the means \pm SEM of six values and are expressed as arbitrary units of integrated optical density compared to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPDH) signal. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

intermediate filament family [33,34]. B-type lamins are expressed to some extent in essentially all normal somatic cells [35] but several studies have reported that lamin expression is reduced in some cancers [36–38]. Lamin B1 expression, for example, is reduced in the early stages of colonic and gastric adenocarcinomas [39]. Our results show that 3.75 μM of MA induces a significant 1.4-fold increase in the expression of lamin B1 in HT29 cells, thus counteracting the negative effects of the adenocarcinoma on lamin B1 expression. This increase in lamin B1 can be related to an arrest in the G1 phase of the cell-cycle and a decrease in cell proliferation, affecting DNA cross-linking, the regulation of gene expression and chromosome morphology [31,32,40].

Cancer is a pathology coupled with the deregulation of cell motility followed by highly evident alterations in the architecture of the actin cytoskeleton and functioning of actin-binding proteins. Cell motility is a complicated process requiring dynamic rearrangement of the actin cytoskeleton, driven by actin polymerization and depolymerization cycles. Gelsolin is one of the major actin-binding proteins involved in cell motility via the regulation of the actin cytoskeleton [27]. Changes in gelsolin expression can be observed in a number of human tumour cells and are often connected with their development and progression [20]. In human colon adenocarcinoma cells the level of gelsolin and its subcellular distribution seem to correlate with their metastatic potential [27]. A significant decrease in gelsolin expression can be seen in LS180 adenocarcinoma cells, for example [20]. We have shown in this investigation that MA

significantly up-regulates gelsolin expression in HT29 cells. Given that gelsolin levels diminish in various types of adenocarcinoma the fact that MA reverses this tendency indicates its role in controlling tumoural progression. In this case, the changes induced by MA seem able to reverse the metastatic potential of cancer cells.

Another two cytoskeletal proteins that may be useful markers of cancer are villin 1 and moesin [22], villin 1 having been proposed as possibly a good candidate for colon-cancer and moesin for ovarian-cancer cells. With regard to HT29 cells, moesin, together with ezrin and radixin, have been described as forming part of a signal transduction pathway [41], which is involved in the response induced by interferon-γ-induced STAT1. Our results show that MA up-regulates the expression of both proteins, thus suggesting that MA may also influence this signalling pathway involved in cell division.

We have shown that septin-2 is also up-regulated in HT29 cells in response to MA. This protein has also been identified as a potential biomarker of gastric cancer [21], being considerably over-expressed in gastric adenocarcinoma compared to adjacent non-tumoural tissue samples. It has been proposed that altered septin-2 expression can lead to disordered chromosomal dynamics and underlies the development of the aneuploidy common to cancers [42]. Our results also indicate that this protein is another cell with anti-tumoural capacity targeted by MA.

The cytoskeleton is considered to be the backbone of a cell, providing it with its shape and structure. It also plays a

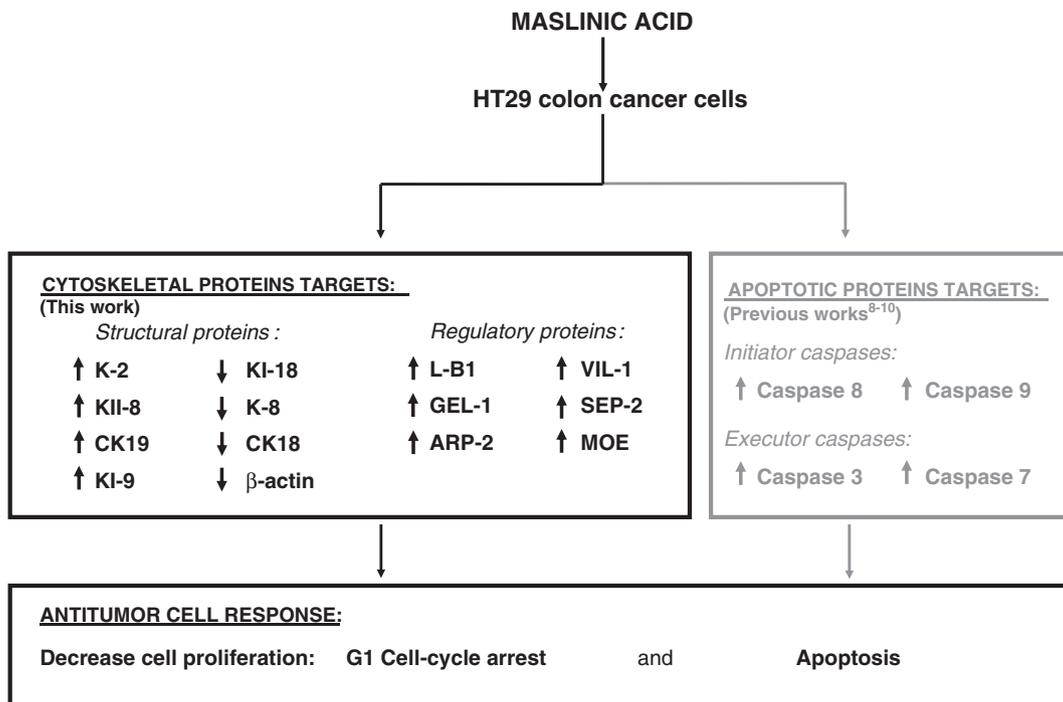


Fig. 5 – Scheme of the interference of MA in cytoskeleton proteins and its consequent relationship with anti-tumoural activity in HT29 colon-cancer cells. The figure represents the activity of MA on the up- and down-regulation of different cytoskeletal protein targets in HT29 colon cancer cells and its relationship with its anti-tumoural capacity in these cells. Abbreviations: (K-2) keratin 2; (K-8) keratin 8; (KII-8) keratin type II cytoskeletal 8; (KI-9) keratin type I cytoskeletal 9; (KI-18) keratin type I cytoskeletal 18; (CK-18) cytokeratin 18; (CK-19) cytokeratin 19; (L-B1) lamin B1; (GEL-1) gelsolin 1; (SEP-2) septin 2; (VIL-1) villin 1; (ARP-2) actin-related protein 2; and (MOE) moesin.

fundamental role in the regulation of signal transduction, gene transcription, cell division and differentiation [43]. The uptake of MA by HT29 cells leads to significant changes in various proteins that are fundamental to the maintenance of the structure of 6 nm actin filaments and 10 nm intermediate filaments. Thus, MA induces a down-regulation in the level of β -actin, a fundamental protein in the 6 nm actin microfilaments involved in maintaining cell shape, and inter- and intracellular transport. With respect to intermediate filaments, MA induces the up-regulation of keratin 2, keratin type II cytoskeletal 8, keratin type I cytoskeletal 9, cytokeratin 19; and the down-regulation of keratin 8, keratin type I cytoskeletal 18, and cytokeratin 18. All these changes demonstrate that it affects significantly the reorganisation of the cell cytoskeleton in HT29 colon-cancer cells, all of which may result in anti-tumoural and anti-proliferative activity in this type of cell. In addition to its effects on apoptosis [10–12], this interference in the organisation and dynamics of filaments in the architecture of the cytoskeleton may also be very important for cell migration, in particular during the formation of metastases.

Previous work conducted by our group has demonstrated that MA selectively induces apoptosis in HT29 colon-cancer cells via the activation of caspase-3 by a p53-independent mechanism, which occurs via mitochondrial disturbances and release of cytochrome c [10–12]. It has also been shown that actin dynamics can also play a role in apoptosis [44]. Studies with drugs affecting actin turnover have revealed that the induction of a cell-death pathway occurs simultaneously to a reduction in actin turnover [45]. It may also be that changes in actin dynamics affect the activation of caspases and that actin serves as a substrate for active caspase-3, with actin behaving as both a target and an effector of apoptosis in mammalian cells [44].

5. Conclusions

MA triggers a dose-dependent decrease in HT29 cell viability by inducing significant changes in the cytoskeleton of this human colon-cancer cell line. These changes are profound because they affect the levels of structural proteins fundamental to the maintenance of cell structure, motility and even the cell's invasion capacity. Therefore, we anticipate that the therapeutic potential of MA in colon-cancer therapy could be considered. A scheme of the interference of MA on cytoskeleton proteins and its relation with its anti-tumoural activity on HT29 cell is resumed in Fig. 5.

Acknowledgements

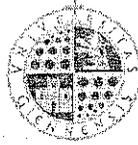
This work was supported by research grant BIO-157 of the Plan Andaluz de Investigación, Junta de Andalucía, Spain and an OTRI research contract (University of Granada), "Azucarera del Guadalfeo" S.L. and "Biomaslinc" S.A. The proteomic analysis was conducted in the Proteomic Unit of the Technical Research Services, University of Córdoba, by a member of ProteoRed (The Spanish Proteomics Network). The authors thank Raquel González-Carmona and Consuelo Gómez-Díaz for their technical assistance. Also, the authors thank Dr. Jon Trout for revising

and commenting upon their text. The authors declared that none of them have any competing financial interest.

REFERENCES

- [1] Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet* 2010;20:1030–47.
- [2] Vlahov G, Rinaldi G, Del Re P, Giuliani AA. ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the different components of epicuticular waxes of olive fruit (*Olea europaea*) Dritta cultivar. *Anal Chim Acta* 2008;624:184–94.
- [3] Guinda A, Rada M, Delgado T, Gutiérrez-Adán P, Castellano JM. Pentacyclic triterpenoids from olive fruit and leaf. *J Agric Food Chem* 2010;58:9685–91.
- [4] Allouche Y, Jiménez A, Uceda M, Aguilera MP, Gaforio JJ, Beltrán G. Triterpenic content and chemometric analysis of virgin olive oils for forty olive cultivars. *J Agric Food Chem* 2009;57:3604–10.
- [5] Rufino-Palomares EE, Reyes-Zurita F, García-Salguero L, Peragón J, de la Higuera M, Lupiáñez JA. Maslinic acid and ration size enhanced hepatic protein-turnover rates of gilthead sea bream (*S. aurata*). *Aquac Nutr* 2012;18:138–51.
- [6] Rufino-Palomares EE, Reyes-Zurita F, García-Salguero L, Peragón J, de la Higuera M, Lupiáñez JA. Maslinic acid, a natural triterpene, and ration size increased growth and protein turnover of white muscle in gilthead sea bream (*S. aurata*). *Aquac Nutr* 2012;18:568–80.
- [7] Rufino-Palomares EE, Reyes-Zurita F, García-Salguero L, Peragón J, de la Higuera M, Lupiáñez JA. The role of maslinic acid in the pentose phosphate pathway during growth of Gilthead Sea bream (*S. aurata*). *Aquac Nutr* in press. <http://dx.doi.org/10.1111/anu.12018>.
- [8] Rufino-Palomares EE, Reyes-Zurita F, Fuentes-Almagro C, de la Higuera M, Lupiáñez JA, Peragón J. Proteomics in the liver of gilthead sea bream (*S. aurata*) to elucidate the cellular response induced by the intake of maslinic acid. *Proteomics* 2011;11:3312–25.
- [9] Rodríguez-Rodríguez R, Ruiz-Gutiérrez V. Functional properties of pentacyclic triterpenes contained in pomace olive oil. In: Preedy VR, Watson RR, editors. *Olives and olive oil in health and disease prevention*. London: Academic Press/Elsevier Inc.; 2010. p. 1431–8.
- [10] Reyes FJ, Centelles JJ, Lupiáñez JA, Cascante M. ($2\alpha,3\beta$)-2,3-Dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new natural triterpene from *Olea europaea*, induces caspase dependent apoptosis selectively in colon adenocarcinoma cells. *FEBS Lett* 2006;580:6302–10.
- [11] Reyes-Zurita FJ, Rufino-Palomares EE, Lupiáñez JA, Cascante M. Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Lett* 2009;273:44–54.
- [12] Reyes-Zurita FJ, Pachón-Peña G, Lizárraga D, Rufino-Palomares EE, Cascante M, Lupiáñez JA. The natural triterpene maslinic acid induces apoptosis in HT29 colon cancer cells by a JNK-p53-dependent mechanism. *BMC Cancer* 2011;11:154.
- [13] Zheng YK, Oegema K. Cell structure and dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20:1–3.
- [14] Adam Wax VB. *Biomedical applications of light scattering*. Burr Ridge: McGraw-Hill; 2009.
- [15] Frixione E. Recurring views on the structure and function of the cytoskeleton: a 300-year epic. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000;46:73–94.
- [16] Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003;3:362–74.

- [17] Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci* 2005;96:379–86.
- [18] dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, et al. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* 2003;83:433–73.
- [19] Bernstein H, Payne CM, Kunke K, Crowley-Weber CL, Waltmire CN, Dvorakova K, et al. A proteomic study of resistance to deoxycholate-induced apoptosis. *Carcinogenesis* 2004;25:681–92.
- [20] Litwin M, Nowak D, Mazur AJ, Baczynska D, Mannherz HG, Malicka-Blaszkiwicz M. Gelsolin affects the migratory ability of human colon adenocarcinoma and melanoma cells. *Life Sci* 2012;90:851–61.
- [21] Kocevar N, Odreman F, Vindigni A, Frkovic Grazio S, Komel R. Proteomic analysis of gastric cancer and immunoblot validation of potential biomarkers. *World J Gastroenterol* 2012;18:1216–28.
- [22] Nishizuka S, Chen S-T, Gwadry FG, Alexander J, Major SM, Scherf U, et al. Diagnostic markers that distinguish colon and ovarian adenocarcinomas: identification by genomic, proteomic, and tissue array profiling. *Cancer Res* 2003;63:5243–50.
- [23] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
- [24] Comín-Anduix B, Boros LG, Marin S, Boren J, Callol-Massot C, Centelles JJ, et al. Fermented wheat germ extract inhibits glycolysis/pentose cycle enzymes and induces apoptosis through poly(ADP-ribose) polymerase activation in Jurkat T-cell leukemia tumor cells. *J Biol Chem* 2002;277:46408–14.
- [25] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [26] Olson MF, Sahai E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis* 2009;26:273–87.
- [27] Litwin M, Mazur AJ, Nowak D, Mannherz HG, Malicka-Blaszkiwicz M. Gelsolin in human colon adenocarcinoma cells with different metastatic potential. *Acta Biochim Pol* 2009;56:739–43.
- [28] Yap WH, Khoo KS, Lim SH, Yeo CC, Lim YM. Proteomic analysis of the molecular response of Raji cells to maslinic acid treatment. *Phytomedicine* 2012;19:183–91.
- [29] Wittmann-Liebold B, Graack HR, Pohl T. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics* 2006;6:4688–703.
- [30] Aebi U, Cohn J, Buhle L, Gerace L. The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* 1986;323:560–4.
- [31] Ankenbauer T, Kleinschmidt JA, Walsh MJ, Weiner OH, Franke WW. Identification of a widespread nuclear actin binding protein. *Nature* 1989;342:1197–202.
- [32] Miller III CA, Cohen MD, Costa M. Complexing of actin and other nuclear proteins to DNA by cis-diamminedichloroplatinum(II) and chromium compounds. *Carcinogenesis* 1991;12:269–75.
- [33] McKeon FD, Kirschner MW, Caput D. Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* 1986;319:463–8.
- [34] Fisher DZ, Chaudhary N, Blobel G. cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:6450–4.
- [35] Paulin-Levasseur M, Giese G, Scherbarth A, Traub P. Expression of vimentin and nuclear lamins during the in vitro differentiation of human promyelocyte leukemia cells HL-60. *Eur J Cell Biol* 1989;50:453–61.
- [36] Kaufmann SH, Mabry M, Jasti R, Shaper JH. Differential expression of nuclear envelope lamins A and C in human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1991;51:581–6.
- [37] Cance WG, Chaudhary N, Worman HJ, Blobel G, Cordon-Cardo C. Expression of the nuclear lamins in normal and neoplastic human tissues. *J Exp Clin Cancer Res* 1992;11:233–46.
- [38] Broers JLV, Raymond Y, Rot MK, Kuijpers H, Wagenaar SS, Ramaekers FC. Nuclear A-type lamins are differentially expressed in human lung cancer subtypes. *Am J Pathol* 1993;143:211–20.
- [39] Moss SF, Krivosheyev V, de Souza A, Chin K, Gaetz HP, Chaudhary N, et al. Decreased and aberrant nuclear lamin expression in gastrointestinal tract neoplasms. *Gut* 1999;45:723–9.
- [40] Kolber MA, Broschat KO, Landa-González B. Cytochalasin B induces cellular DNA fragmentation. *FASEB J* 1990;4:3021–7.
- [41] Magro F, Fraga S, Soares-da-Silva P. Interferon- γ -induced STAT1-mediated membrane retention of NHE1 and associated proteins ezrin, radixin and moesin in HT-29 cells. *Biochem Pharmacol* 2005;70:1312–9.
- [42] Spiliotis ET, Kinoshita M, Nelson WJ. A mitotic septin scaffold required for mammalian chromosome congression and segregation. *Science* 2005;307:1781–5.
- [43] Damanian D, Subramanian H, Tiwari AK, Stypula Y, Kunte D, Pradhan P, et al. Role of cytoskeleton in controlling the disorder strength of cellular nanoscale architecture. *Biophys J* 2010;99:989–96.
- [44] Gourlay CW, Ayscough KR. The actin cytoskeleton in ageing and apoptosis. *FEMS Yeast Res* 2005;5:1193–8.
- [45] Odaka C, Sanders ML, Crews P. Jaspilakinolide induces apoptosis in various transformed cell lines by a caspase-3-like protease-dependent pathway. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:947–52.



Universidad de Jaén

Juan Peragón Sánchez, Coordinador del Máster Universitario en Biotecnología y Biomedicina por la Universidad de Jaén,

CERTIFICA:

Que la comunicación titulada: "EFECTO DEL ÁCIDO MASLÍNICO, AGENTE ANTITUMORAL, SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO EN CÉLULAS HT29" de la que son autores: Eva E. RUFINO-PALOMARES, Fernando J. REYES-ZURITA, Leticia GARCÍA-SALGUERO, Khalida MOKHTARI, Pedro P. MEDINA, José A. LUPIÁÑEZ Y Juan PERAGÓN.

Ha sido presentada por Dña. Eva E. RUFINO-PALOMARES en las SEGUNDAS JORNADAS SOBRE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOMEDICINA DEL MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOMEDICINA POR LA UNIVERSIDAD DE JAÉN.

Dichas Jornadas se han celebrado el jueves, 20 de diciembre de 2012, en el Salón de Grados del Edificio D-1 (Zabaleta) del Campus Universitario Las Lagunillas de la Universidad de Jaén con una duración de 5 horas.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firma la presente en Jaén a 20 de diciembre de 2012.



Juan Peragón Sánchez
Área de Bioquímica y Biología Molecular
Departamento de Biología Experimental
Universidad de Jaén
Campus Las Lagunillas
23071 Jaén



Universidad de Jaén

SEGUNDAS JORNADAS SOBRE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOMEDICINA. MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOMEDICINA POR LA UNIVERSIDAD DE JAÉN

Jueves, 20 de diciembre de 2012, Salón de Grados del Edificio D-1 (Zabaleta)

Mesa Redonda 1 (9,30 h a 11,30 h):

1. 9,30 h. Dr. **Jesús Cobo Molinos**, "Estrategias de diferenciación de células madre mesenquimales (MSCs) a cartilago", Departamento de Ciencias de la Salud, Área de Cirugía, Universidad de Jaén. (MR1-C1)
2. 9,50 h. Dr. **Francisco Navarro Gómez**, "Mecanismos de ensamblaje y desensamblaje de las ARN polimerasas eucarióticas. Departamento de Biología Experimental. Área Genética, Universidad de Jaén. (MR1-C2)
3. 10,10 h. Dr. **Antonio Sánchez Baca**, "Análisis de la heterocromatina constitutiva: composición y función". Departamento de Biología Experimental, Área de Genética, Universidad de Jaén. (MR1-C3)
4. 10,30 h. Dr. **Juan de Dios Alché Ramírez**, "Desarrollo y aplicaciones de un sistema multiplex para el análisis de la expresión de alérgenos y productos génicos de interés en el polen del olivo". Grupo de Biología Reproductiva de Plantas. Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada. (MR1-C4)
5. 10,50 h. Dr. **Francisco J. Corpas Aguirre**, "Papel del metabolismo del óxido nítrico (NO) y tioles en los mecanismos de respuesta al estrés por arsénico en plantas". Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada. (MR1-C5)

11,30-12,00 h Descanso

Mesa Redonda 2 (12,00 h a 14,00 h):

1. 12,00 h. Dra. **Eva E. Rufino Palomares**, "Efecto del ácido maslínico, agente antitumoral, sobre la expresión de las proteínas del citoesqueleto en células HT29" Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. (MR2-C1)
2. 12,20 h. Dra. **Eva Siles Rivas**, "Efecto de PARP-1 en la respuesta adaptativa a la hipoxia". Departamento de Biología Experimental, Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Jaén. (MR2-C2)
3. 12,40 h. Dr. **Juan Alberto Marchal Ortega**, "Bases moleculares del síndrome de microcefalia primaria autosómica recesiva". Departamento de Biología Experimental, Área de Genética, Universidad de Jaén. (MR2-C3)
4. 13,00 h. Dr. **Antonio Cobo Molinos**, "DNA/rMVA: Ensayo de una nueva vacuna contra el virus del SIDA. Métodos y nuevas rutas de vacunación" Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén. (MR2-C4)
5. 13,20 h. **Pendiente de confirmación**

Organizadas por:

Juan Peragón Sánchez
Máster Universitario en Biotecnología y Biomedicina por la Universidad de Jaén
Área de Bioquímica y Biología Molecular
Departamento de Biología Experimental
Universidad de Jaén
Tel.: 953212523, Fax: 953 211875, E-mail: jperagon@ujaen.es

La vitamina A, como ácido retinoico, se ha relacionado con el control de la adiposidad en animales adultos. Sin embargo, poco se sabe sobre su impacto durante la lactancia sobre el desarrollo del tejido adiposo y la adiposidad en la edad adulta.

Crias de rata fueron tratadas con una dosis oral diaria de retinil palmitato (3 veces su ingesta diaria de vitamina A; VIA) o con vehículo (aceite de oliva; CON) durante la lactancia. Tras el destete, ratas CON y VIA fueron alimentadas durante 16 semanas con una dieta normal o hiperlipídica. Asimismo, ratas CON y VIA fueron sacrificadas el día del destete. Se analizaron parámetros relacionados con el metabolismo energético, la expresión génica, y la morfología del tejido adiposo blanco inguinal (TABi).

A pesar de no mostrar diferencias en el peso o la ingesta calórica, las ratas VIA desarrollaron una mayor adiposidad tras la alimentación con la dieta hiperlipídica, tal como mostró el análisis de la composición corporal, la leptinemia, y el aumento de la masa tisular, el diámetro celular, el contenido total de ADN y la expresión de leptina en el TABi. Las crías VIA presentaron en el TABi un porcentaje mayor de células pequeñas, y cambios en la expresión de genes coherentes con un mayor potencial de proliferación celular del depósito, que se correlacionaron con una menor expresión de marcadores adipogénicos. Se obtuvo evidencia de un aumento de las respuestas transcripcionales mediadas por ácido retinoico en tejidos de crías VIA.

En resumen, un incremento moderado de vitamina A en las primeras etapas de la vida postnatal puede influenciar a largo plazo la adiposidad corporal, a través de efectos sobre el tejido adiposo en esas etapas, posiblemente mediados por el ácido retinoico.

R06r-7

El ácido maslínico estimula las deshidrogenasas de la ruta de las pentosas fosfato en la dorada (*Sparus aurata*)

Eva. E Rufino-Palomares¹, Juan Peragón Sánchez², Fernando Reyes Zurita¹, Khalida Mokhtari¹, Leticia García Salguero¹ y José Antonio Lupiáñez Cara¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad de Granada, Granada, ²Área de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén, Jaén

El ácido maslínico (AM), utilizado como aditivo alimentario, estimula el crecimiento y recambio proteico en algunas especies de peces. En el presente trabajo, se han investigado los efectos del AM sobre el comportamiento

cinético y los niveles de expresión proteica de dos enzimas claves en el ciclo de las pentosas fosfato, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH). Doradas de 12 g de peso fueron alimentadas durante 210 días, en condiciones de piscifactoría, con dietas que contenían 0 (control) y 100 mg de AM (AM₁₀₀) por kg dieta mediante alimentación ad libitum (AL) y alimentación restringida al 1,5% del peso corporal (R). Los peces alimentados con AM presentaron un mayor crecimiento corporal al final del ensayo experimental. La actividad específica G6PDH y 6PGDH, V_{max}, eficiencia catalítica y actividad total incrementaron significativamente en el hígado y músculo blanco de doradas alimentadas con AM. La K_m se vio modificada principalmente en los grupos alimentados con dieta AM₁₀₀ y ración restringida. Los resultados de "Western-blot" mostraron un incremento en los niveles de expresión de la G6PDH y 6PGDH en doradas alimentadas con AM, independientemente del régimen de alimentación. Nuestros resultados muestran que, en la dorada, G6PDH y 6PGDH, son dos enzimas inducibles y regulados por AM. El AM, añadido a la dieta, es capaz de estimular el crecimiento de la dorada, tanto a nivel fisiológico, como a nivel molecular. *Nota:* Trabajo financiado por la Junta de Andalucía, la OTRI de la Universidad de Granada y las empresas Biomaslínic S.L., Granada y Azucarera del Guadalfeo, División de Acuicultura Marina, Salobreña, Granada.

R06-8

Valoración del estado nutricional de enfermos de Alzheimer

Magdalena Martínez Tomé¹, Fátima Olea Serrano², Miguel Mariscal Arcas², Antonia M. Jiménez Monreal³, Claudia Rosario Gómez², Luis García Diz⁴ y M. Antonia Murcia Tomás³

¹Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología Universidad de Murcia, Murcia,

²Departamento de Nutrición y Bromatología,

Universidad de Granada, Granada, ³Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología,

Universidad de Murcia, Murcia, ⁴Departamento de Nutrición y Bromatología. Universidad Complutense de Madrid, Madrid

Objetivo: Valorar el estado nutricional de pacientes con Alzheimer.

Diseño: Se realizó un estudio descriptivo, observacional y de carácter transversal.

Sujetos de estudio: 7 hombres y 18 mujeres con edad entre 63 y 91 años. Con un diagnóstico de Alzheimer grado GDS-4, pacientes de la UD del Hospital Virgen de la Arrixaca, junto con sus acompañantes.