

**EFFECTO DEL HIDROXITIROSOLO SOBRE LA
CARDIOTOXICIDAD PRODUCIDA POR
DOXORUBICINA**

Nuri El azem De haro

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II.

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos "José Mataix".

Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM).

Universidad de Granada (UGR).

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Nuri El Azem de Haro
D.L.: GR 1068-2013
ISBN: 978-84-9028-483-4

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis está dedicada a mi abuela y a mi abuelo, que han cuidado de mi no solo desde que nací, sino sobre todo, desde que vine a Granada a estudiar la carrera y hasta el día de hoy.

Sin el apoyo de mis padres, no hubiese podido ni terminar este trabajo, ni la carrera, ni muchas de las cosas que me han servido para llegar hasta aquí. Devolverles todo lo que han hecho por mí es ya imposible, pero espero poder darles aunque sea una parte.

A mi familia, a mis titas Ana e Inma, mis titos Antonio y Enrique y mis primos, por su gran labor en el papel de titas/os en el cuidado de su sobrino siempre que ha hecho falta y también cuando no hacía falta.

Tengo que agradecerles también a mis jefes Mayca y Pepe, que además de jefes son mis amigos, por confiar en mí, permitirme realizar la memoria de tesis con ellos y ayudarme con todo lo que he necesitado, a la vez que he aprendido muchísimas cosas, ya que son 2 trabajadores literalmente incansables.

A mi amigo Sergio, a quien admiro, porque es ya un excelente investigador, pero es aun mejor persona. No tengo la más mínima duda de que llegará muy alto y espero estar ahí en ese momento. Muchas gracias.

A mis amigos del laboratorio: Alicia, Elena, Encarni, Laura, Mari Ángeles, Naroa, Patricia, Silvia, Adrián, Alfonso, Agustín, Javi, Julio, Mario, Pedro. Sin duda, el mejor equipo con el que se puede trabajar. Gracias por hacer que todos los días me riese dentro del laboratorio y fuera también, y aunque Javi bajase la productividad con sus visitas, luego se trabajaba mejor y se recuperaba. Os echaré de menos pero no importa porque estaréis "ahí al lado".

1. Justificación y objetivos	
2. Introducción	1
2.1. Cáncer	1
2.1.1. Células madre cancerígenas	3
2.1.2. Cáncer de mama	6
2.1.3. Tratamiento del cáncer de mama	12
2.2. Doxorubicina	20
2.2.1. Mecanismo de acción de la doxorubicina	21
2.2.2. Resistencia a la doxorubicina	23
2.2.3. Doxorubicina y ERO	27
2.2.4. ERO y estrés oxidativo	30
2.2.5. Doxorubicina y daño cardíaco	41
2.2.6. Mitocondria y doxorubicina	48
2.2.7. Mitocondria. Estructura y composición	48
2.2.8. Cadena de transporte electrónico mitocondrial	50
2.2.9. Papel de la doxorubicina en la mitocondria	52

2.3. Aceite de oliva e hidroxitirosol	56
2.3.1. Aceite de oliva, aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares	61
2.3.2. Aceite de oliva y antioxidantes	64
2.3.3. Aceite de oliva y cáncer	67
2.3.4. Hidroxitirosol	69
2.3.5. Hidroxitirosol y cardioprotección	76
3. Material y métodos	79
3.1. Material	79
3.1.1. Aparatos de uso general	79
3.1.2. Material para el estudio anatomopatológico	80
3.2. Animales de experimentación	81
3.3. Modelo de inducción de cáncer de mama	81
3.4. Diseño experimental	84
3.5. Tratamiento con doxorubicina y/o hidroxitirosol	86
3.6. Extracción de muestras	88
3.6.1. Sangre y plasma	88
3.7. Bioquímica plasmática	90
3.8. Determinación de los niveles de hidroxitirosol	

y su metabolito alcohol homovanílico	96
3.9. Análisis histopatológico	99
3.10. Análisis mediante microscopía electrónica de las mitocondrias del músculo cardíaco	101
3.11. Marcadores de daño proteico por oxidación medido mediante cromatografía/espectrometría de masas (GC/MS)	101
3.12. Determinación de proteínas para el ensayo de actividad de los complejos mitocondriales I y IV	102
3.13. Actividad de los complejos mitocondriales I y IV	103
3.14. Análisis de ácidos grasos mediante GC/MS	110
3.15. Detección de apoptosis in-situ	110
3.16. Western Blotting	112
3.16.1. Análisis de los complejos mitocondriales y el factor inductor de apoptosis (AIF)	115
3.17. Análisis estadístico	116
4. Resultados	117
4.1. Aparición de tumores	117
4.2. Determinación de los niveles de hidroxitirosol y su metabolito alcohol homovanílico	117

4.3. Parámetros bioquímicos plasmáticos. Peso corporal y del corazón y relación entre peso del corazón/peso corporal	118
4.4. Perfil lipídico en corazón	119
4.5. Daño cardíaco mediante análisis histopatológico	120
4.6. Ultraestructura mitocondrial	122
4.7. Daño oxidativo molecular	123
4.8. Complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y factor inductor de apoptosis	128
4.9. Actividad de los complejos mitocondriales I y IV	131
4.10. Detección <i>in situ</i> de apoptosis	132
4.11. Western blot	134
5. Discusión	136
5.1. Cuantificación plasmática de hidroxitirosoles y alcohol homovanílico	136
5.2. Parámetros bioquímicos	137
5.3. Ultraestructura mitocondrial	140
5.4. Daño oxidativo en moléculas	141
5.5. Complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y factor inductor de apoptosis	142

5.6. Actividad de los complejos mitocondriales I y IV	144
5.7. Detección <i>in situ</i> de apoptosis	146
5.8. Western Blot	147
6. Conclusiones	149
7. Bibliografía	152

Abreviaturas

AIF: Factor inductor de apoptosis, **ALDH1:** Aldehído deshidrogenasa 1, **AP-1:** Proteína activadora 1, **CDK2:** Quinasa dependiente de ciclina 2, **CDK4:** Quinasa dependiente de ciclina 3, **CDKN1A:** Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1 α , **CPC:** Células progenitoras cardíacas, **CPK:** Creatin fosfoquinasa, **CXCR4:** Receptor de quimioquinas C-X-C tipo 4, **CypA:** Ciclofilina A, **DACH1:** Homólogo Dachshund 1, **DMBA:** 7, 12-dimetil-benz (α) antraceno, **DOX:** Doxorubicina, **ERK 1/2:** Quinasas reguladas por señal extracelular 1 y 2, **ERN:** Especies reactivas de nitrógeno, **ERO:** Especies reactivas de oxígeno, **ER α :** Receptor de estrógenos α , **ER β :** Receptor de estrógenos β , **FAD:** Flavinadenin dinucleótido, **FADH2:** Flavinadenin dinucleotido reducido, **FMN:** Flavin mononucleótido, **FMNH2:** Flavin mononucleótido reducido, **FPP:** Farnesil pirofosfato, **GMPc:** Guanosín monofosfato, **GOT:** Glutamina oxalacetato transaminasa, **GPx:** Glutation peroxidasa, **GR:** Glutation reductasa, **GSH:** Glutation reducido, **GSSG:** Glutation oxidado, **HDL:** Lipoproteínas de alta densidad, **HER-2:** Receptor de factor de crecimiento epidérmico, **HIF-1:** Factor inducible por hipoxia 1, **HMGCoA:** β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA reductasa, **IAP:** Proteínas inhibidoras de la apoptosis, **ICAM1:** Proteína de adhesión intercelular 1, **IL-1 α :** Interleucina 1 α , **IL-1 β :** Interleucina 1 β , **IL-6:** Interleucina 6, **IL-8:** Interleucina 8, **iNOS:** Oxido nítrico sintasa inducible, **IP3:** Inositol trifosfato, **IRF1:** Factor regulador de interferón 1, **LDH:** Lactato deshidrogenasa, **LDL:** lipoproteínas de baja densidad, **LTB4:** leucotrieno B4, **MDA:** malonil dialdehído, **MMP-1:** Metaloproteinasas de matriz 1, **NADH:** Nicotin amida dinucleótido, **NADPH oxidasa:** Nicotin amida dinucleótido fosfato oxidasa, **NFAT:** Factor nuclear de células T activadas, **NF- κ β :** Factor de transcripción nuclear κ β , **NOS:** Oxido nítrico sintasa, **PCNA:** Antígeno nuclear de células en proliferación, **SOD:** Superoxido dismutasa, **STAT-1 α :** Transductor y activador del transcrito 1 α , **TEM:** Transición epitelio-mesenquima, **TPM:** Poro de transición mitocondrial, **Transportadores ABC:** Transportadores casete de unión a ATP, **Transportadores MDR1:** Transportadores de multiresistencia a fármacos, **TxB2:** Tromboxano B2, **VCAM1:** Molécula de adhesión vascular 1, **Vit.C:** Vitamina C, **Vit.E:** Vitamina E

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La doxorubicina es una droga ampliamente utilizada en la terapia contra el cáncer de mama, por su buena eficacia a la hora de eliminar las células tumorales. Sin embargo, presenta una elevada cardiotoxicidad.

Está demostrado que la ingestión periódica de aceite de oliva en la dieta reduce los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares debido a la presencia de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante. Este trabajo de investigación que se presenta plantea la hipótesis de si es posible evitar o disminuir los niveles de cardiotoxicidad producida por la doxorubicina en animales con cáncer de mama administrando hidroxitirosol, uno de los compuestos fenólicos con mayor capacidad antioxidante del aceite de oliva.

El objetivo de este estudio fue comprobar el posible efecto cardioprotector del hidroxitirosol frente a la cardiotoxicidad producida por la doxorubicina, a dosis crónicas, en modelos de ratas con cáncer de mama.

Para llevar a cabo el estudio, se tomaron 36 ratas, a las que se les indujo cáncer de mama mediante la administración de 7, 12-dimetil-benz (α) antraceno (DMBA). Estas 36 ratas se dividieron posteriormente en 4 grupos: grupo DMBA (sin tratamiento), grupo hidroxitirosol (tratados con hidroxitirosol), grupo doxorubicina (tratados con doxorubicina) y grupo hidroxitirosol mas doxorubicina (tratados con hidroxitirosol y doxorubicina conjuntamente).

Los resultados obtenidos se detallan en el siguiente trabajo, pero resumidamente se puede afirmar que efectivamente, el hidroxitirosol es una sustancia con alta capacidad antioxidante, que previene en parte el daño producido por la doxorubicina sobre estructuras celulares vitales como la mitocondria.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. CÁNCER

El cáncer es una enfermedad en la que se producen alteraciones del ADN que provocan daños en los genes que controlan la proliferación y la apoptosis celular, provocando que la célula pierda la capacidad de autoregular su división. Estos daños sobre el ADN son mutaciones en los nucleótidos de los ácidos nucleicos producidos por errores de las propias enzimas del organismo al copiar el ADN durante la división celular, al reparar daños o por exposición a agentes carcinógenos. Las mutaciones del ADN deben perpetuarse en la célula una vez producidas e ir acumulándose (de 5 a 10 mutaciones) en posteriores divisiones para que aparezca el fenotipo canceroso en la célula. Se producen sobre genes encargados de la proliferación, supervivencia, reparación del ADN, motilidad, invasión y angiogénesis.

Los factores que condicionan la aparición del cáncer son fundamentalmente 2: uno es la predisposición genética del individuo a que sus genes sufran mutaciones que provoquen la aparición de cáncer y el otro factor determinante son las condiciones medioambientales que rodean al sujeto (modo de vida, exposición a agentes ambientales perjudiciales, factores nutricionales...etc.).

La formación de un cáncer pasa por varias fases: iniciación, promoción y progresión^{1,2}, y presenta un rápido crecimiento, invasión y destrucción de los tejidos adyacentes. Finalmente puede ocurrir una diseminación por el resto del organismo a través del torrente sanguíneo, produciendo la muerte del organismo en última instancia. Si no hay invasión de tejidos, se denomina *neoplasia benigna*, y si hay invasión, se llama *neoplasia maligna* (cáncer).

En condiciones normales, una célula está sometida a un riguroso control de su replicación, pero varios factores pueden provocar una alteración de estos mecanismos de regulación.

Los cambios en el comportamiento celular son consecuencia de una alteraciones sobre genes que regulan la proliferación, supervivencia, reparación del ADN e invasión bien como TP53, Rb, BRCA1, BRCA2... o protooncogenes como Ras, Myc, Ciclina D1, CDK2, CDK4...), entre

Introducción

otros. Al ser alterados estos genes, la célula pierde el control sobre su replicación y diferenciación, convirtiéndose en una célula que se divide constantemente. Estas alteraciones genéticas se producen por daños en el material genético producidos durante la síntesis del ADN previo a la mitosis o por la acción de agentes externos al organismo, mutágenos ambientales, capaces de dañar el ADN. El organismo posee sistemas de reparación de daño celular que evitan la aparición de fallos o su perpetuación en las nuevas células. En el cáncer, se alteran estos sistemas de reparación, ya que se ven afectados los genes que codifican estas enzimas/proteínas efectoras, y por tanto, el daño producido en el ADN se acumula y no se repara. Cuando el daño en el ADN es irreparable, se activan una serie de vías que conducen a la apoptosis de la célula, pero que en el caso de un cáncer también están alteradas o inactivadas, con lo cual, la célula con ADN aberrante seguirá además dividiéndose, a una velocidad superior a la normal y con una información genética defectuosa³.

Es entonces cuando estas células cancerosas empiezan a adquirir nuevas características. Son células que normalmente viven en condiciones de baja concentración de oxígeno (hipoxia) y escasez de nutrientes. En este estado empiezan a desarrollar nuevos fenotipos que les permiten invadir nuevos tejidos en otros lugares del organismo y producir metástasis. Las características fenotípicas de una célula cancerosa se resumen en la figura 1.

Fenotipo de una célula cancerosa 

- *Proliferación celular descontrolada.*
- *Pérdida de la capacidad de diferenciarse en células más especializadas.*
- *Inactivación de los sistemas reparadores de ADN.*
- *Inactivación de las rutas normales de apoptosis.*
- *Replicación constante.*
- *Producción de angiogénesis.*
- *Pérdida de la capacidad de anclaje y metástasis.*
- *Evasión del sistema inmune.*

Figura 1. Fenotipo de una célula cancerosa.

2.1.1. CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

No ha sido hasta el año 2003 en el que se dio un gran paso en el conocimiento que tenemos sobre las células madre tumorales. Este descubrimiento, consistió en la identificación de una subpoblación de células madre tumorales dentro de tumores de mama⁴. Aunque la teoría de la existencia de estas células madre se remonta a 1997, enunciada por Bonnet y Dick, no ha sido hasta 2003 cuando se ha podido constatar la existencia de estas células.

Estas células provienen de la mutación de células madre normales, así que poseen sus mismas características (autorenovación permanente y capacidad de producir células maduras del tejido específico donde se encuentren), pero añadiendo la malignidad, es decir, un crecimiento descontrolado. Las células madre tumorales poseen la habilidad de autorenovarse y también de generar nuevas células tumorales. En la figura 2 se muestra un esquema simplificado en el que se compara la división de una célula madre sana frente a una célula madre tumoral. Estas células madre tumorales además son capaces de generar nuevos

Introducción

tumores en distintos lugares del organismo, poseyendo una elevada capacidad para proliferar que las demás células tumorales no poseen.

Las células madre tumorales tienen un distintivo característico que las diferencia de las demás, y es que expresan en su superficie celular los marcadores CD44⁺/CD24⁻/Antígeno epitelial específico⁺ (ESA), y carecen de la expresión de CD2, CD3, CD10, CD16, CD18, CD31, CD64 y CD140. Poseen además una elevada expresión de aldehído deshidrogenasa (ALDH1). Este fenotipo CD44⁺/CD24⁻/ALDH1⁺ es además muy característico de células madre tumorales de mama, aunque dependiendo de la localización de estas células, expresarán un tipo de marcador u otro⁵.

Las células madre tumorales, debido a su gran capacidad para proliferar y formar nuevos tumores, son candidatas ideales para pensar que son las responsables de la aparición de metástasis, ya que estudios realizados demuestran que sólo unas pocas células de este tipo (del orden de cientos o miles)⁵ trasplantadas a ratones fueron capaces de generar un nuevo tumor. La motilidad, quimiotaxis y angiogénesis de estas células es mayor que la de las demás células, y sobreexpresan genes implicados en la invasión celular (genes codificantes de IL-1a, IL-6, IL-8, CXCR4, MMP-1 y uPA). La activación del protooncogen c-Jun (JNK), DACH1 o miembros de la familia de NF- κ B son moléculas que participan activamente en la regulación de la proliferación de estas células, promoviendo la división como JNK o NF- κ B, o evitándola debido a la inactivación de su mecanismo de acción como el caso de DACH1^{5,6,7}.

Una vez que estas células se diseminan por el organismo, se asientan en otro lugar diferente del que provienen y forman lo que se denomina "nicho". El "nicho" es el lugar donde las células madre tumorales van a empezar a dividirse, y juega un papel importante para permitir que las células madre tumorales comiencen a proliferar. Si las condiciones del "nicho" no son las idóneas, las células madre tumorales no podrán dividirse adecuadamente. Las señales aferentes en forma de factores secretados a las células madre tumorales procedentes de la matriz extracelular y de células del estroma van a determinar si las células madre tumorales se desarrollan en ese "nicho" en el que se han asentado.

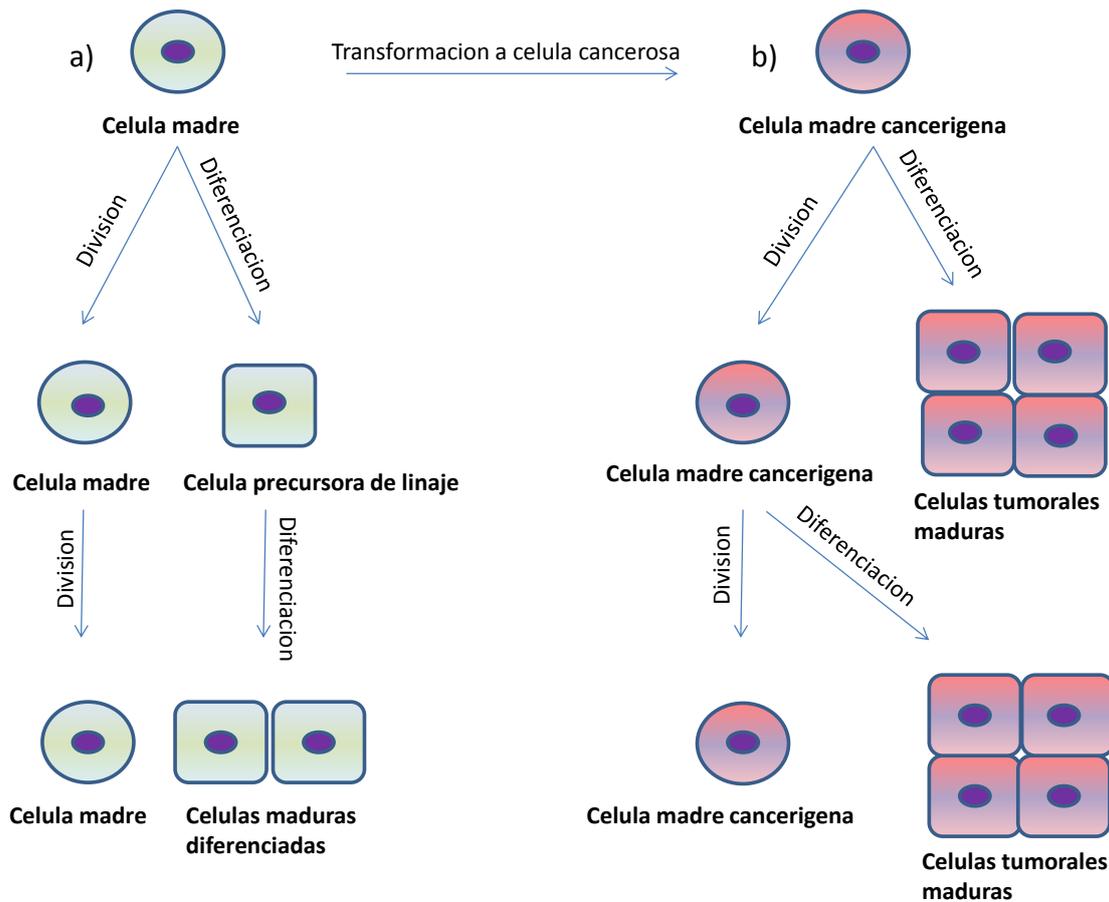


Figura 2. Esquema sobre la replicación de las células madre. A) Célula madre normal. Las células madre son capaces de autorenovarse y de generar además células hijas diferenciadas, que seguirán madurando hasta convertirse en células especializadas dependiendo del tejido en el que se encuentren. B) Célula madre cancerígena. La célula madre normal puede convertirse en cancerosa por la generación de una mutación en su ADN, y en los genes que regulan la división. La célula madre cancerígena también puede autorenovarse, pero produce además células tumorales maduras no diferenciadas y en exceso, que formaran el tumor.

Como se ha mencionado, las células madre cancerígenas son las responsables de las recaídas que sufren los pacientes de cáncer tiempo después de terminar el tratamiento. Esto significa que las células madre cancerígenas son capaces de resistir la quimioterapia, con lo cual, pueden volver a dividirse y formar un nuevo tumor. Este nuevo tumor además, será aun más resistente a la quimioterapia.

Por eso, nuevas líneas de investigación están surgiendo en los últimos años para comprender mejor cómo atacar eficazmente y conseguir eliminar estas células madre cancerígenas que son las responsables finales de la resistencia al tratamiento y la aparición de metástasis⁸.

Células madre cancerígenas de cáncer de mama

Las células madre cancerígenas de cáncer de mama son aquellas células madre mamarias que han sufrido una mutación en su genoma y han perdido la capacidad de regular su proliferación. Las mismas propiedades que hemos visto anteriormente en general para todos los tipos de células madre cancerígenas son compartidas por las células madre cancerígenas de mama, y se diferencian de otros tipos celulares de células madre cancerígenas en los marcadores de superficie que expresan y en las rutas de señalización intracelular que activan⁹ como ya se ha comentado.

Estas células madre cancerígenas de mama pueden aislarse mediante la creación de mamosferas *in vitro* e identificarse debido a que posee un fenotipo característico, ya que expresan en su superficie celular marcadores como CD44⁺/CD24⁻/ALDH1⁺.

El principal problema que presentan estas células es que posiblemente sean las responsables de la resistencia a la quimioterapia y radioterapia y también responsables de la reactivación del tumor una vez que ha finalizado el tratamiento, que suele suceder alrededor de un 40 % de los casos. Las células madre, que son capaces de resistir el tratamiento, constituyen un reservorio de células cancerígenas encargadas de reactivar el tumor y de producir metástasis una vez que el tratamiento ha cesado^{10, 11}. Durante el tratamiento, muchas células cancerígenas que no expresan el fenotipo CD44⁺/CD24⁻ consiguen adquirir este fenotipo y se vuelven así resistentes al tratamiento. Además, son capaces de expresar proteínas transportadoras que captan las moléculas de quimioterápico y las expulsan al exterior celular¹², con lo que se evita que actúen sobre su diana terapéutica que suele ser la replicación del ADN o los microtúbulos celulares. Por si esto no fuera poco, también expresan otras proteínas anti apoptóticas como Bcl o survivina y su tasa de reparación del ADN es mayor que en las células normales.

Así pues, uno de los objetivos prioritarios en la lucha contra el cáncer debe enfocarse en la acción sobre estas células madre cancerígenas. El conocimiento de las rutas de señalización que permiten a estas células auto renovarse es fundamental a la hora de desarrollar nuevas terapias. Ejemplos de estas rutas de señalización son la ruta Wnt, Notch o Hedgehog¹³. Estas rutas de señalización están implicadas además de en el proceso de división celular, en la transición epitelio-mesenquima (TEM), proceso clave por el cual las células madre cancerígenas adquieren alteraciones moleculares como la represión de E-caderina, que les permite obviar las uniones intercelulares y adoptar una morfología especial, permitiendo así a

Introducción

la célula tumoral obtener la capacidad invasiva y la motilidad necesarias para producir metástasis¹⁴.

2.1.2. CÁNCER DE MAMA

Como se puede observar en la siguiente gráfica (figura 3), la incidencia del cáncer de mama en la mujer es ampliamente superior que la de los demás tipos de cáncer, aunque su mortalidad no es tan elevada como la incidencia, y se debe a la prevención¹⁵.Aun así, sigue siendo en la mujer el tipo de cáncer de mayor mortalidad, y esto es lo que nos ha hecho enfocar nuestra investigación sobre el cáncer de mama en concreto.

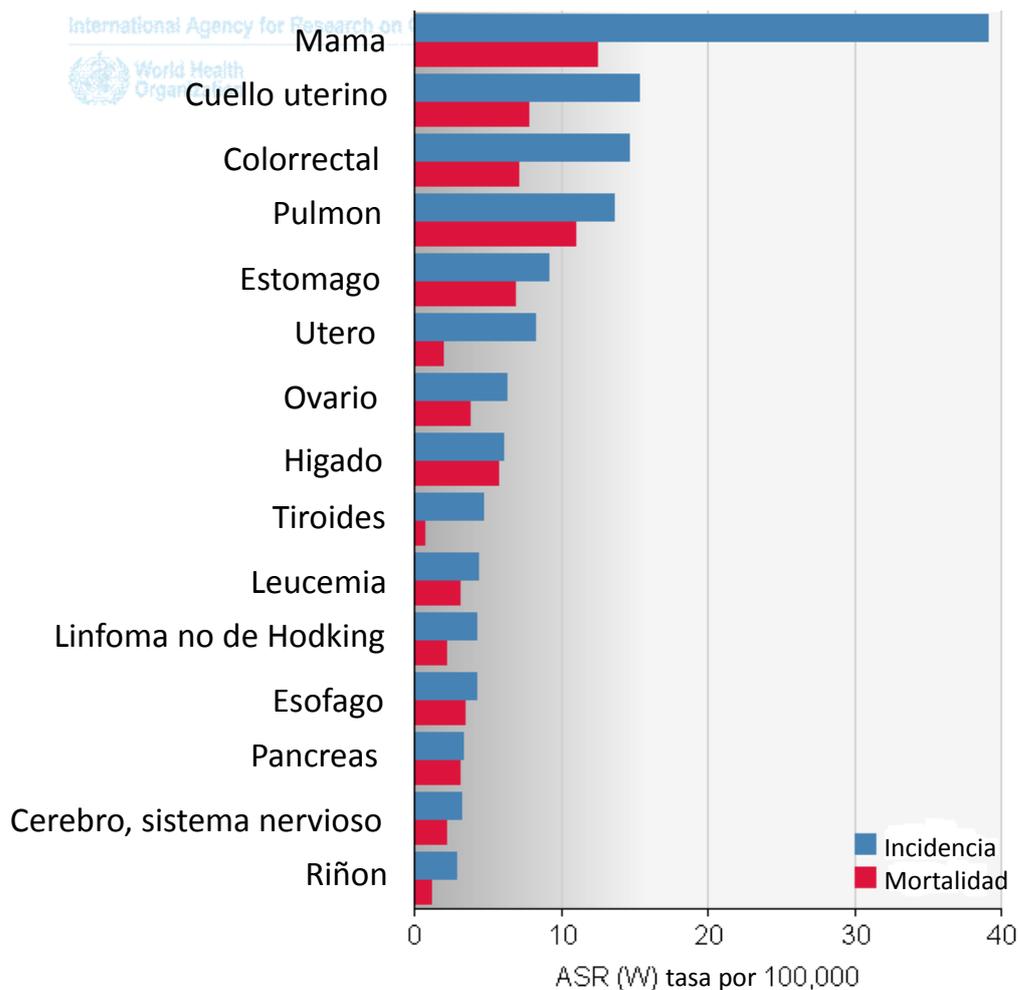


Figura 3. Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más frecuentes en mujeres en el mundo en el 2008, siendo ASR (w) la tasa estandarizada por cada 100.000 habitantes.

Tabla 1. Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más frecuentes en la mujer en el mundo en el 2008, siendo ASR (w) la tasa estandarizada por la población mundial¹⁶.

Cáncer	Incidencia		Mortalidad	
	Nº de personas	ASR (W)	Nº de personas	ASR (W)
Labios, cavidad bucal	92 524	2.5	44 545	1.2
Nasofaringe	26 589	0.8	15 625	0.4
Otros de faringe	28 034	0.8	19 092	0.5
Esófago	155 400	4.2	130 526	3.4
Estomago	348 571	9.1	273 489	6.9

Introducción

Colorectal	571 204	14.7	288 654	7
Hígado	226 312	6	217 302	5.7
Vesícula	86 828	2.2	66 638	1.7
Páncreas	133 825	3.3	128 292	3.1
Laringe	21 026	0.6	11 556	0.3
Pulmón	515 999	13.6	427 586	11
Melanoma de piel	97 820	2.7	20 512	0.5
Mama	1 384 155	39	458 503	12.5
Cuello uterino	530 232	15.3	275 008	7.8
Útero	288 387	8.2	73 854	2
Ovario	224 747	6.3	140 163	3.8
Riñón	104 363	2.8	44 349	1.1
Vejiga	88 315	2.2	37 974	0.9
Cerebro, sistema nervioso	111 098	3.2	77 629	2.2
Tiroides	163 968	4.7	24 177	0.6
Linfoma de Hodgkin	27 654	0.8	11 646	0.3
Linfoma no de Hodgkin	156 695	4.2	82 115	2.1
Mieloma múltiple	47 903	1.3	34 658	0.9
Leucemia	154 978	4.3	113 606	3.1
Total excluyendo el cáncer de piel no melanoma	6 044 710	165.1	3 345 176	87.6

El cáncer de mama es una proliferación maligna de las células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos de la mama.

Como ya se ha visto anteriormente, el cáncer de mama es el que más incidencia tiene entre las mujeres. En el mundo, se prevé que para el año 2030 la mortalidad de este tipo de

Introducción

cáncer aumente un 45 %, debido al crecimiento demográfico y envejecimiento de la población, sobre todo en países en vías de desarrollo, donde comienzan a crecer el número de casos de cáncer de mama. Afecta más a mujeres de edad avanzada. La mayor tasa de incidencia es en mujeres de 75 a 79 años. Las mujeres de raza blanca a partir de los 45 años tienen una tasa de incidencia mayor que las mujeres de raza negra, aunque las de raza negra poseen una mayor incidencia antes de los 45 años y su mortalidad a cualquier edad es mayor, seguramente debido a factores socioeconómicos que retrasan la detección de la enfermedad. En la figura 4 se puede ver una gráfica sobre la incidencia de cáncer de mama en mujeres en EE.UU. desde 1999 hasta 2007, divididas por grupos étnicos y en la figura 5 una gráfica sobre la tasa de mortalidad del cáncer de mama en los mismos grupos de mujeres.

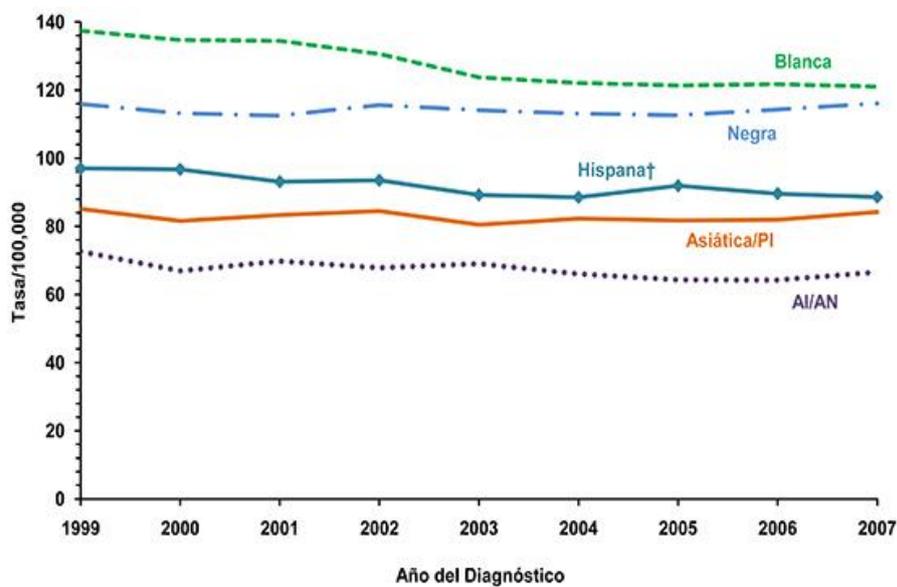


Figura 4. Cáncer de mama en mujeres. Tasas de incidencia por cada 100.000 habitantes, divididos por raza y grupo étnico, EE.UU., 1999-2007. AI/AN: mujeres indoamericanas nativas de Alaska; Asiáticas/PI: mujeres asiáticas nativas de las islas del pacífico; Blanca: mujeres de raza blanca; Hispana: mujeres de raza hispana; Negra: mujeres de raza negra.

Introducción

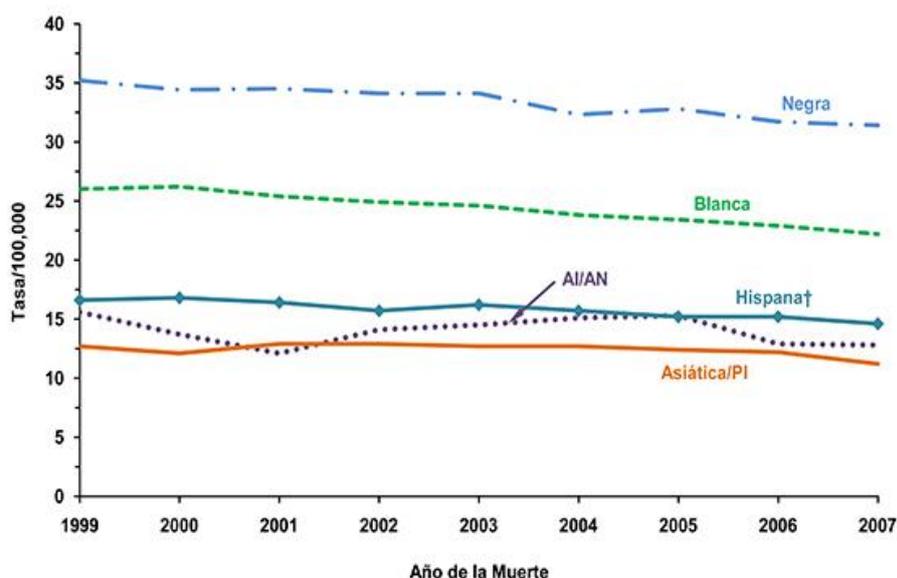


Figura 5. Cáncer de mama en mujeres. Tasas de mortalidad por cada 100.000 habitantes, divididos por raza y grupo étnico, EE.UU., 1999-2007. AI/AN: mujeres indoamericanas nativas de Alaska; Asiáticas/PI: mujeres asiáticas nativas de las islas del pacífico; Blanca: mujeres de raza blanca; Hispana: mujeres de raza hispana; Negra: mujeres de raza negra.

El cáncer de mama tiene un componente hormonal muy importante¹⁷. Estudios realizados demuestran que la extirpación de ambos ovarios, con la consiguiente pérdida de la producción de estrógenos y andrógenos, reduce hasta en un 75 % la aparición de cáncer de mama¹⁸. Los estrógenos son hormonas que promueven la proliferación celular. Una mayor concentración de estrógenos promoverá un mayor nivel de división celular, aumentando por consiguiente la probabilidad de errores en la replicación. En los países desarrollados, muchas mujeres han sido y siguen siendo tratadas con terapia hormonal sustitutiva para paliar los síntomas que acarrea la aparición de la menopausia, lo que hace que aumente el riesgo de estas mujeres de padecer cáncer de mama¹⁹. Gracias a estos estudios, actualmente, la terapia hormonal sustitutiva ha entrado en declive y se usa cada vez menos.

Además del componente hormonal, la aparición del cáncer de mama tiene un cierto componente genético que hace más susceptible a ciertas personas frente a la acción de agentes mutagénicos o de factores de crecimiento, que pueden iniciar o contribuir a la aparición del cáncer²⁰.

Entre los factores de riesgo que pueden aumentar la incidencia del cáncer de mama están: obesidad²¹, alcohol²² o la exposición a radiaciones ionizantes²³.

Introducción

La obesidad es causa de la aparición de cáncer de mama sobretodo en mujeres post-menopáusicas. En estas mujeres, hay un incremento de la actividad de la aromatasa en el tejido adiposo y un descenso en los niveles de globulina de unión a hormonas sexuales²⁴, lo que provoca que haya más estrógeno libre. El riesgo de padecer cáncer de mama aumenta en mujeres premenopáusicas un 16 % y en un 31 % en mujeres post-menopáusicas por cada incremento del índice de masa corporal de 5 Kg/m²²⁵.

El consumo frecuente de alcohol puede producir un incremento del riesgo de aparición de cáncer de mama de entre un 6 a un 10 %. Los mecanismos de acción propuestos son por un incremento en los niveles hormonales, un efecto carcinogénico de los metabolitos del alcohol o un efecto antagonista sobre la absorción y metabolismo del folato²⁶.

La aparición de la menarquía a edades tempranas, el no haber tenido descendencia p poca descendencia o tenerla a una edad avanzada son factores que también están asociados con un incremento en el riesgo de aparición de cáncer de mama²⁷. La altura es otro factor de riesgo, aunque no la altura en sí misma, sino la exposición a factores hormonales de crecimiento o factor de crecimiento parecido a la insulina durante la adolescencia que determinarán la altura de esa persona.

Por el contrario, un importante factor que contribuye a la disminución del riesgo de padecer cáncer de mama es la práctica regular de ejercicio físico²⁸. Esto puede deberse a la reducción de la grasa corporal, efectos sobre los niveles hormonales o mejora de la actividad del sistema inmune²⁹. En la tabla 2 se resumen los principales factores de riesgo que determinan la aparición de cáncer de mama.

Tabla 2. Resumen de los factores de riesgo que intervienen en la aparición de cáncer de mama.

Factores de riesgo

Edad

Raza

Peso

Xenoestrógenos y contaminantes ambientales

Radiaciones ionizantes

Introducción

Tabaco

Alcohol

Dieta

Ejercicio

Historia ginecológica

Patología mamaria benigna

Historia familiar

Patrón mamográfico

Anticonceptivos orales

Terapia hormonal sustitutiva

2.1.3. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA

Hay 3 elementos fundamentales que componen el protocolo de actuación en el tratamiento frente al cáncer de mama, que son: cirugía, radioterapia y quimioterapia junto con terapia hormonal y biológica.

Cirugía

Las técnicas quirúrgicas más comunes son:

1. Mastectomía conservadora

Consiste en la extracción del tumor sin extirpar completamente la mama. Se quita el tumor cogiendo parte del tejido circundante sano para asegurar la eliminación del tejido tumoral. Después de haber extirpado el tumor, se puede aplicar radioterapia o quimioterapia para asegurar la total eliminación de las células tumorales que hayan quedado en la zona después de la operación³⁰.

El empleo de esta técnica depende del tamaño del tumor, localización, tamaño de la mama, estética tras la intervención...etc., y se valorará su empleo entre el cirujano y la paciente.

2. Mastectomía conservadora del pezón

En determinadas ocasiones en las que las condiciones del tumor lo permitan, se puede optar por realizar una cirugía conservadora del pezón de la mama, con una finalidad estética para mayor satisfacción de la paciente³⁰.

3. Mastectomía contralateral preventiva

Consiste en la extirpación de la mama no afectada por el tumor como medida preventiva frente a la aparición de un nuevo tumor en esa mama. Se usa solamente cuando existen factores de riesgo que predispongan a la paciente a poder desarrollar un nuevo tumor en la mama no afectada. Estos factores son principalmente mutaciones en el gen BRCA1 o BRCA2 en la paciente junto con su historial familiar de cáncer de mama³¹.

4. Linfadenectomía axilar

Consiste en la extirpación de los ganglios linfáticos axilares. Se hace para evitar que células tumorales que hayan invadido los ganglios linfáticos axilares, y que por tanto tienen la capacidad de producir metástasis, sean capaces de diseminarse a otros lugares del organismo.

4.1. Ganglio centinela

Es una técnica que permite identificar el primer ganglio sobre el que drena el tumor. Si este ganglio no está afectado, podemos dar por seguro que no hay afectación de los demás ganglios y por lo tanto no hará falta extirparlos. Si por el contrario, el ganglio centinela está afectado, será necesario extirpar el paquete ganglionar axilar (figura 6), ya que no sabremos con certeza si los demás ganglios estarán afectados.

Introducción

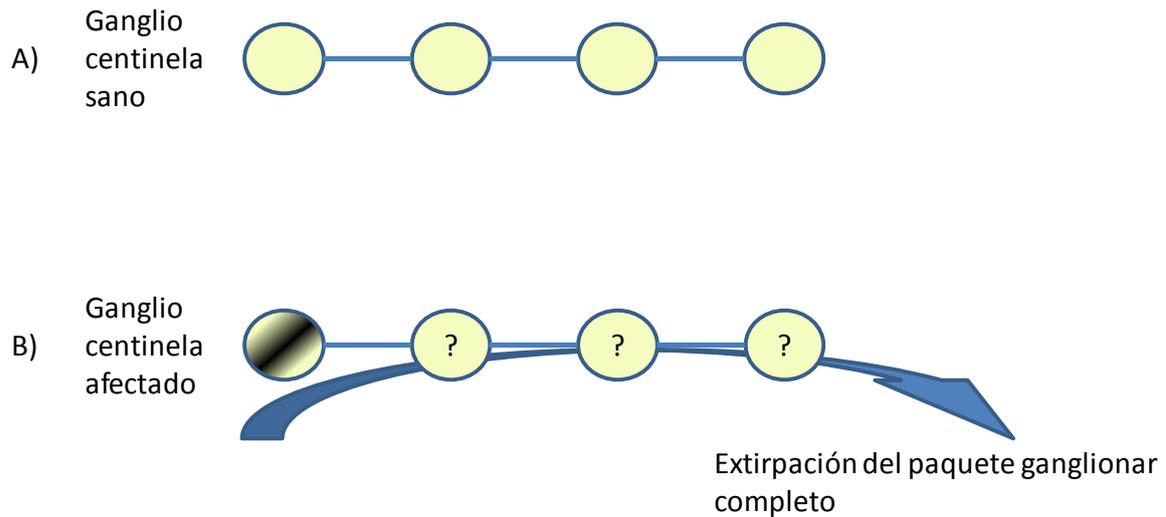


Figura 6. Esquema de la técnica del ganglio centinela. A) Ganglio centinela sano. El ganglio centinela está sano, esto significa que los demás ganglios también lo están. B) Ganglio centinela afectado. El ganglio centinela se encuentra afectado por células tumorales de la mama. Esto significa que el tumor se ha expandido y no sabemos si solamente está afectado el ganglio centinela o los demás ganglios posteriores, así que por seguridad, se extirpará todo el paquete ganglionar.

Aunque la determinación del ganglio centinela es una técnica que se ha usado y se sigue usando comúnmente en el tratamiento del cáncer de mama, estudios muy recientes en los que a grupos de pacientes se les extirpaba completamente el paquete ganglionar axilar y a otro grupo de pacientes únicamente se les extirpaba el ganglio centinela afectado, han demostrado que la extracción únicamente del ganglio centinela afectado frente a la eliminación completa del paquete ganglionar presenta las mismas tasas de supervivencia en un plazo de 5 años para ambos grupos, algo que actualmente está provocando que se replantee entre la comunidad científico/médica la necesidad de realizar la linfadenectomía axilar^{32, 33}.

Lo que sí es necesario es realizarle al tumor extraído un estudio anatomopatológico para descartar que pueda haber micrometástasis en casos en los que el estudio convencional sea negativo. La terapia adyuvante se debe administrar se extraiga o no el paquete ganglionar completo porque aumenta la supervivencia de la paciente³⁴.

Y como todas las cirugías, la linfadenectomía axilar presenta una serie de efectos secundarios que no tienen por qué aparecer obligatoriamente como por ejemplo dolor, seroma, inflamación o linfedema

Radioterapia

La radioterapia emplea un haz de rayos X sobre la zona tratada quirúrgicamente para tratar de eliminar los posibles restos de células cancerosas que no se hayan podido extirpar o que hayan quedado inevitablemente tras la intervención quirúrgica. La aplicación de radioterapia después de la cirugía reduce hasta en un 52 % la tasa de recurrencia del cáncer³⁰.

La aplicación de radioterapia puede ser externa o interna, siendo la externa la más frecuente, irradiando la zona a tratar con un emisor de rayos X desde fuera mientras el paciente permanece en la zona de irradiación mientras dura el tratamiento, que suele ser de pocos segundos al día durante 2 a 7 semanas y descansando generalmente 2 días a la semana. El paciente debe acudir todos los días a recibir el tratamiento, ya que debe dosificarse la dosis para no producir daños graves a los tejidos sanos.

Al afectar la radiación también a los tejidos sanos circundantes a la zona de tratamiento, ésta puede producir una serie de efectos secundarios que variarán dependiendo de cada paciente como: cansancio, eritema, caída del pelo, linfedema o modificaciones en el tamaño y consistencia de la mama.

Quimioterapia

La quimioterapia consiste en la administración de fármacos, generalmente por vía intravenosa, dirigidos a la destrucción del tumor. Estos fármacos normalmente afectan a la división celular, bloqueándola y produciendo la muerte tanto de las células tumorales como de las células sanas. Es muy probable que el tratamiento consista en una combinación de varios de estos medicamentos para conseguir una mayor eficacia en la eliminación del tumor³⁵.

Las terapias farmacológicas más usadas se muestran en la siguiente tabla (tabla 3):

Tabla 3. Terapias más usadas en el tratamiento del cáncer de mama.

Terapia	Quimioterápico
Combinaciones de quimioterápicos	Ciclofosfamida, Doxorubicina, 5-fluorouracilo. Ciclofosfamida, Doxorubicina. Ciclofosfamida, Epirubicina. Ciclofosfamida, Doxorubicina, Docetaxel. Ciclofosfamida, Doxorubicina, Paclitaxel o Docetaxel. Ciclofosfamida, Epirubicina, 5-fluorouracilo con o sin Docetaxel. Ciclofosfamida, Docetaxel. Gemcitabina, Paclitaxel.
Otros agentes quimioterápicos	Carboplatina. Cisplatina. Vinorelbina. Capecitabina.

La tendencia actual en el tratamiento de un paciente es elaborar una terapia individualizada, ya que cada individuo responde de manera diferente al proceso y cada tipo de cáncer es distinto. Hasta hace poco, se tenía en cuenta a la hora de elegir el tratamiento factores como el tamaño del tumor, tiempo desde su aparición, afectación de ganglios linfáticos y grado histológico, pero ahora y gracias al avance de nuevas técnicas de diagnóstico y análisis que permiten obtener mayor información acerca del tumor, la aplicación del tratamiento es aún más específica, con lo que se consigue una mayor eficacia y un menor riesgo para la salud del paciente. Para ello, se toman muestras del tumor y se analizan sus propiedades, como su histología, actividad proliferativa o expresión de receptores hormonales o receptores de factor de crecimiento epidérmico (HER2)³⁶.

El tratamiento quimioterápico puede administrarse antes de la cirugía (neoadyuvancia) para prevenir posibles metástasis o para reducir el volumen del tumor si fuese demasiado

Introducción

grande o después de la cirugía (adyuvancia) para terminar de eliminar las células tumorales remanentes en la zona.

Al igual que con la cirugía y la radioterapia, la quimioterapia presenta una serie de efectos secundarios que pueden variar de un paciente a otro como pueden ser: síntomas gastrointestinales, cansancio, caída del pelo, alteraciones dermatológicas y de la médula ósea e incluso otros efectos que dependerán del medicamento administrado.

Hormonoterapia

La hormonoterapia se utiliza para tratar tumores positivos para el receptor de estrógenos. Existen diversos fármacos, como por ejemplo el Tamoxifeno, que bloquean la acción de los estrógenos sobre estos receptores para evitar que llegue la señal de proliferación a la célula cancerosa. Son los antagonistas estrogénicos. El uso de tamoxifeno como adyuvante después de la cirugía reduce hasta en un 32 % el riesgo de reaparición del tumor³⁰. Esta probabilidad se suma al 52 % de reducción que aportaba la radioterapia, con lo cual el riesgo de volver a desarrollar cáncer se reduce drásticamente. El principal problema que tienen estos medicamentos es que también antagonizan estrógenos en el endometrio, y esto aumenta el riesgo de sufrir cáncer de endometrio.

Otro tipo de fármaco que actúa de manera parecida son los inhibidores de la aromatasa. La aromatasa es una enzima que participa en la síntesis de estrógenos, con lo cual, al estar inhibida, se disminuirá la síntesis de estrógenos. Ejemplos de estos fármacos son: Anastrozol, Letrozol o Examestano. Los inhibidores de la aromatasa están desbancando a los antagonistas de estrógenos como fármacos de primera elección frente a un cáncer de mama positivo para receptores de estrógenos.

Terapia biológica

Este tipo de tratamiento se utiliza para tumores HER2 positivos. Consiste en el bloqueo de los receptores HER2, para evitar que los factores de crecimiento que actúan sobre ellos puedan llegar e inducir a la división celular. Los fármacos empleados son anticuerpos monoclonales frente a este receptor, como el Trastuzumab o Herceptin³⁷.

Taxanos

Son un tipo de fármaco usado en la actualidad, normalmente en combinación con otras antraciclinas, en el tratamiento de la metástasis en cáncer de mama³⁸. Su mecanismo de acción consiste en la unión a la sub unidad β del heterodímero de tubulina, produciendo una polimerización de la tubulina, e impidiendo que los microtúbulos celulares se despolimericen. Esto provoca que se detenga el ciclo celular y que posteriormente la célula entre en apoptosis. Los taxanos más comúnmente usados en la actualidad para el tratamiento del cáncer de mama son el Paclitaxel y el Docetaxel³⁹.

Mostazas nitrogenadas

En este grupo tenemos a la Ciclofosfamida, cuyo mecanismo de acción es mediante la unión al ADN, alquilándolo y por lo tanto, inhibiendo su replicación, produciendo la muerte celular finalmente^{40, 41}.

Antimetabolitos

El 5-Fluorouracilo es uno de los más importantes antimetabolitos que se han empleado en los últimos 20 años en la terapia contra el cáncer. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la enzima timidilato sintasa, evitando que se sinteticen nucleótidos de timina. La falta de timina en el ADN evitará que éste se pueda replicar, provocando la muerte celular⁴².

También encontramos en este grupo al Metotrexato. Su mecanismo de acción es parecido al del 5-Fluorouracilo, pero inhibiendo a la dihidrofolato reductasa, que cataliza la reacción de conversión de dihidrofolato a tetrahidrofolato. Esto hará que se detenga la síntesis de purinas, ya que el tetrahidrofolato participa en la síntesis de éstas (figura 7). Las consecuencias serán la entrada en apoptosis de la célula^{43, 44}.

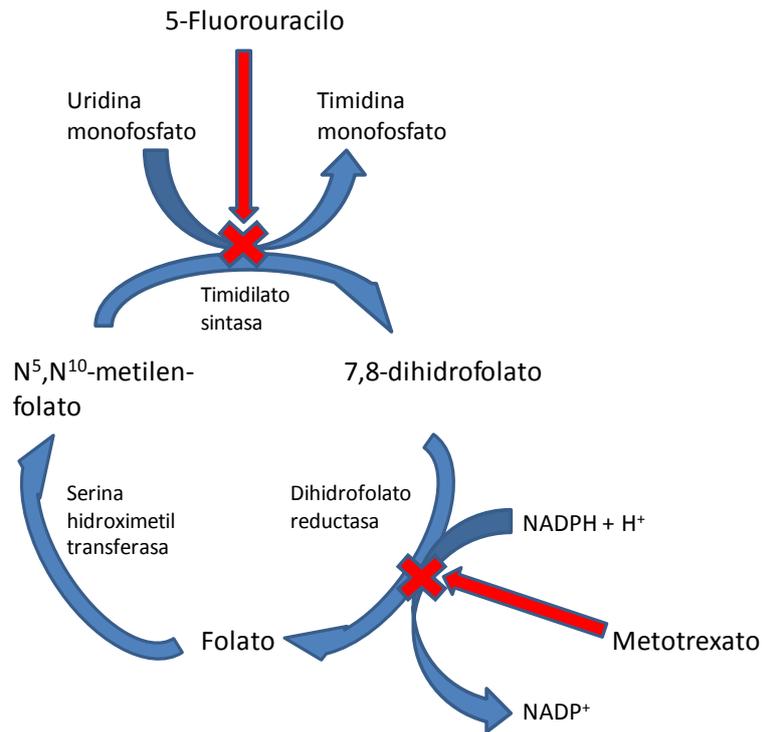


Figura 7. Mecanismo de acción de los antimetabolitos 5-Fluorouracilo y Metotrexato.

Antraciclinas

Las antraciclinas son las sustancias más utilizadas para el tratamiento del cáncer de mama por su elevada efectividad. Su mecanismo de acción conlleva la unión a la topoisomerasa II, enzima encargada de enrollar o desenrollar el ADN para permitir la síntesis de proteínas y la replicación del material genético. Al unirse a la topoisomerasa II, se inhibe su acción y la célula entra en apoptosis. Las primeras antraciclinas aisladas fueron la Doxorubicina y la Daunorubicina, y más tarde se sintetizaron nuevas moléculas derivadas de estas como la Idarubicina, Epirubicina o Mitozantrona. A pesar de su buena capacidad antitumoral, las antraciclinas presentan un grave problema, y es la aparición en la paciente de cardiotoxicidad dosis dependiente⁴⁵.

2.2. DOXORUBICINA.

La doxorubicina (figura 8), o 14-hidroxi-daunorubicina, es un antibiótico antraciclínico producido por el hongo *Streptomyces peucetius var. caesius*. Es una sustancia muy utilizada en el tratamiento de diferentes tipos de cánceres como el de mama, ovario, vejiga, pulmón o broncogénico, tiroides, gástrico, osteosarcomas y tejidos blandos, neuroblastoma, tumor de Wilms linfoma maligno tanto de Hodgkin y no Hodgkin, leucemia mieloblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda y sarcoma de Kaposi producido por síndrome de inmunodeficiencia adquirida. A pesar de su gran eficacia frente al tumor, su uso conlleva graves problemas asociados a la elevada toxicidad que origina.

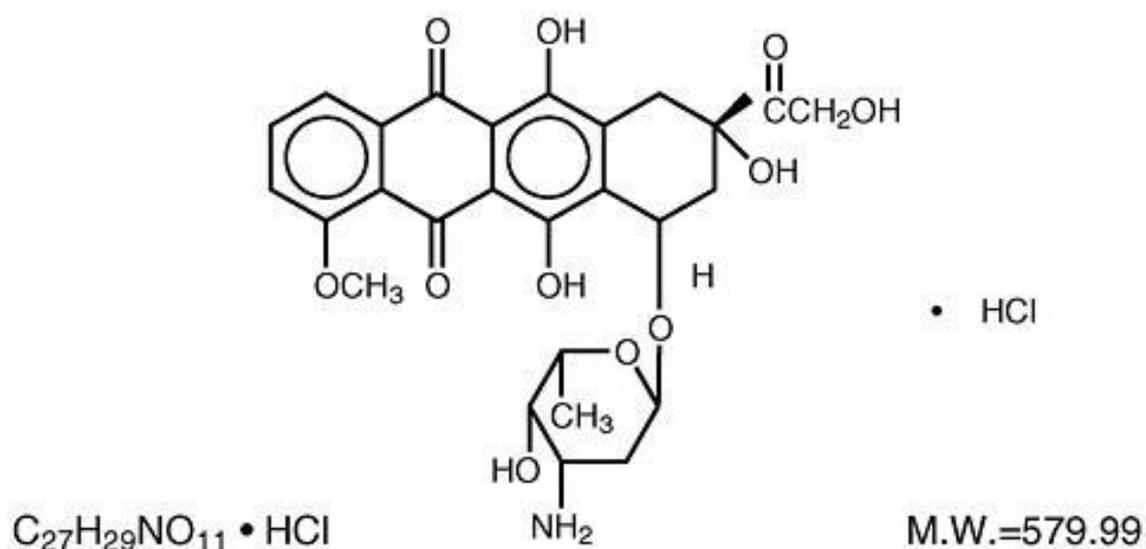


Figura 8. Formula química del 14-hidroxi-daunorubicina o doxorubicina.

En términos generales, esta molécula actúa, inhibiendo la replicación de las células, mediante la acción sobre el ADN para evitar su duplicación. Como todos los antineoplásicos, son sustancias que no discriminan entre células sanas y células tumorales, de ahí la elevada toxicidad asociada a estos agentes.

2.2.1. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA DOXORUBICINA

Realmente, existe cierta controversia en relación al mecanismo de acción de la Doxorubicina. No hay un único mecanismo de acción, sino que probablemente se dé una combinación de los siguientes procesos que vamos a explicar:

Inhibición de la topoisomerasa I y II mediante intercalado de la porción antraciclínica de la doxorubicina en el ADN.

Su acción sobre las topoisomerasas se basa en la estabilización de un complejo intermediario antraciclina-ADN-topoisomerasa II que evita la acción de desenrollado de la doble hélice de ADN (Figura 9). Esto lleva a una parada del ciclo celular en las fases G_1 y G_2 y conlleva una muerte celular programada al no poderse replicar el material genético^{46,47}. También es capaz de actuar sobre la topoisomerasa I⁴⁸. Una evidencia clara que apoya esta hipótesis se basa en que las células tumorales resistentes a la doxorubicina tienen menor concentración y actividad de esta enzima, y por lo tanto, se produce un menor daño sobre el material genético⁴⁹⁻⁵¹.

La activación del gen TP53 también es un factor importante en el mecanismo de acción de la Doxorubicina como veremos más adelante.

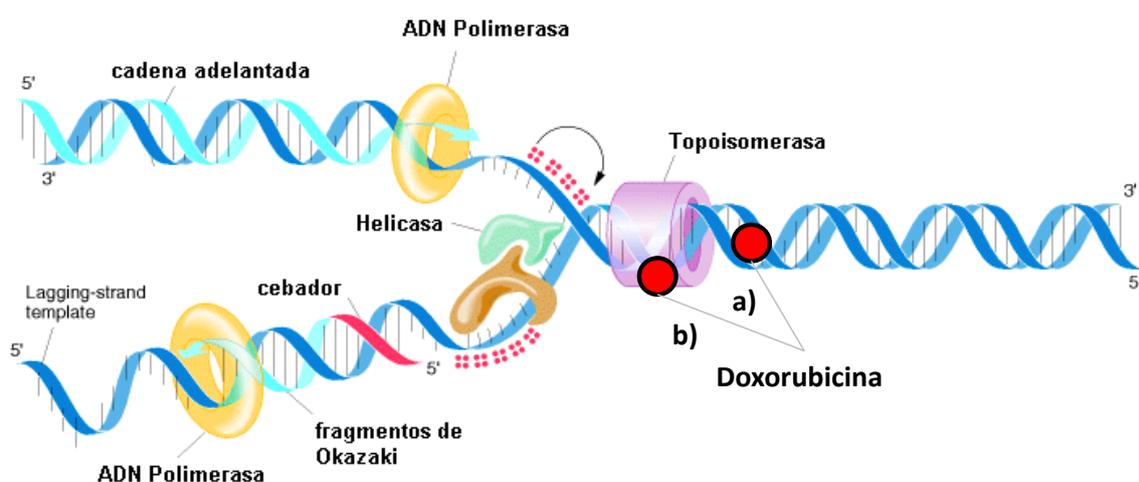


Figura 9. Mecanismo de actuación de la doxorubicina. a) La doxorubicina se une a las hebras de ADN evitando la actuación de la topoisomerasa, que no será capaz de desenrollar la doble hélice ante la presencia de la doxorubicina. b) La doxorubicina también es capaz de actuar directamente sobre la topoisomerasa e inhibirla.

Generación de radicales libres que dañan el material genético o producen peroxidación lipídica.

Doroshov y col. determinaron la inducción de daño oxidativo sobre el ADN de células mononucleares de sangre periférica en pacientes con cáncer de mama que recibían tratamiento con doxorubicina. Después de la administración, la oxidación de bases aumentó 4 veces⁵². Esta oxidación presumiblemente se produjo por la acción de ERO generadas tras ciclos de oxidoreducción de la doxorubicina⁵³. Estas bases oxidadas son mutagénicas ya que bloquean la replicación del ADN y la actividad de la ADN polimerasa permitiendo que se produzcan daños en el material genético⁵².

Uniones cruzadas en el ADN.

Las antraciclinas son capaces de formar enlaces covalentes con el ADN, aunque la concentración que se requiere para que esto ocurra excede la cantidad administrada a un paciente en tratamiento con antraciclinas⁵⁴. A través de la generación de ERO en presencia de hierro, la doxorubicina es capaz de generar formaldehído. Se han detectado niveles elevados de formaldehído en células cancerígenas sensibles a la doxorubicina pero no en células resistentes que poseen una mayor capacidad antioxidante⁵⁵. El formaldehído y la doxorubicina interaccionan y se forma un conjugado capaz de unirse al ADN covalentemente y de ralentizar el intercambio de hebras de ADN durante la meiosis hasta 640 veces^{56, 57}.

Interferencias en la apertura de la hebra de ADN y sobre la enzima helicasa.

Dosis bajas de doxorubicina son capaces de interferir en la separación de las hebras de ADN en líneas celulares MCF-7⁵⁸. Las uniones cruzadas son capaces de provocar este efecto, pero a dosis mayores, así que este efecto puede estar provocado por la acción sobre las helicasas. Esto lo demuestran varios trabajos en los que se comprueba la inhibición de la helicasa por acción de la doxorubicina^{59, 60}. Esta inhibición puede estar producida por la unión de la doxorubicina al ADN, que imposibilitaría a la helicasa moverse a través de las hebras de ADN para separarlas y permitir la replicación^{61, 54}.

Peroxidación lipídica.

Las antraciclinas, y por tanto la Doxorubicina, son capaces de favorecer el ataque del malonil dialdehído (MDA) al ADN y de aumentar su producción mediante la generación de ERO que producen peroxidación lipídica. El MDA es un compuesto capaz de reaccionar con nucleótidos de deoxiguanosina, deoxiadenosina y deoxicitidina, formando pirimidopurinona (M₁dG), que es mutagénico. La formación de M₁dG se acompaña de inhibición de ciclinas E y B y por lo tanto de una detención del ciclo celular⁴⁵.

2.2.2. RESISTENCIA A LA DOXORUBICINA

Los agentes quimioterápicos como la Doxorubicina provocan la aparición de resistencias a su acción por parte de las células tumorales. La eficacia del fármaco mejoraría drásticamente si se pudiese evitar la aparición de estas resistencias, ya que, además de eliminar un mayor número de células tumorales, evitaríamos tener que administrar mayores dosis, lo que conlleva inevitablemente mayor toxicidad.

Hay 3 componentes fundamentales implicados en la resistencia, que son: cambios producidos sobre la cantidad, actividad y estructura de la topoisomerasa; resistencia inducida por el proteasoma y finalmente el papel de las células madre cancerígenas.

Topoisomerasa

Los factores que afectan a la topoisomerasa y que pueden producir resistencia son diversos, entre ellos tenemos: la disminución de su cantidad⁶², aumento de la actividad catalítica mediante fosforilación⁶³, por mutaciones del gen codificante⁶⁴ o por una reducción de la susceptibilidad de formar complejos antraciclina-ADN-topoisomerasa debido a una mutación en la estructura de la topoisomerasa que consistía en una supresión de un residuo de alanina y las hacía menos propensas a formar el complejo⁶⁵. Este hecho ha sido demostrado en un estudio en el que se incubaron líneas celulares de melanoma con etoposido e inhibidor de glicoproteína P. Se observó que las líneas celulares resultantes presentaban niveles moderados de resistencia a la Doxorubicina. Entonces, se secuenció el ADN cíclico de la topoisomerasa presente en estas líneas celulares y se detectó la mutación que las hacía más

Introducción

resistentes. La prevalencia de esta topoisomerasa II mutante resistente a antraciclinas era mayor en las células cancerígenas que en las sanas⁶⁶.

Uno de los componentes responsables de la resistencia a las antraciclinas es la enzima Metnasa, ya que favorece la actuación de la topoisomerasa II frente a la inhibición producida por doxorubicina. Se barajan 2 posibles mecanismos por los cuales podría actuar esta enzima. El primero sería una unión directa y permanente a la topoisomerasa que evitaría la formación del complejo antraciclina-ADN-topoisomerasa. El segundo sería una unión transitoria que aumentaría la actividad en la apertura de la hebra de ADN a pesar de la acción inhibitoria de la doxorubicina, con lo cual el ciclo de división celular continúa en cualquiera de los casos^{67, 68}.

Otro posible mecanismo de aparición de resistencias a las antraciclinas reside en la hipótesis de que la administración también aumenta la cantidad de productos del gen p21 (WAF1/CIP1) que producen una detención del ciclo celular para permitir la reparación del ADN, y esto compite por la apoptosis que se pretende provocar al administrar el fármaco.

Proteasoma

Los proteasomas también han sido investigados como posibles agentes causantes de resistencia en el tratamiento con doxorubicina. Los proteasomas son estructuras celulares con actividad proteasa presentes tanto en citoplasma como en el núcleo celular. El proteasoma de 26 Svedberg (S), compuesto por 3 subunidades (una subunidad núcleo de 20 S y 2 subunidades estructurales de 19 S), juega un importante papel en la degradación de proteínas relacionadas con el crecimiento celular (ciclina como la ciclina B1, inhibidores de quinasas dependientes de ciclina como p21 o p27, supresores tumorales como p53 o el factor de transcripción NF- κ B)⁶⁹.

En tejidos en división, el proteasoma se acumula en el núcleo⁷⁰ y se ha visto que en condiciones típicas de tumores, como bajos niveles de glucosa o hipoxia, esta acumulación en el núcleo es aún mayor⁷¹. Bajo estas condiciones de estrés, y debido a la acumulación de proteasoma en el núcleo, la topoisomerasa II es degradada, por lo que forma menos complejos doxorubicina-ADN-topoisomerasa, contribuyendo a una disminución de la eficacia de la doxorubicina. Este proceso es reversible si se administran inhibidores del proteasoma⁷².

Otro posible mecanismo de acción de resistencia a la doxorubicina es el identificado por Kiyomiya y col.⁷⁰ En él, se describen 3 pasos. El primero es la entrada de la doxorubicina al

Introducción

citoplasma por difusión simple a través de la membrana y su unión a la subunidad 20S del proteasoma, formando un complejo doxorubicina-proteasoma. A continuación el complejo se transloca al núcleo a través de los poros nucleares mediante un proceso ATP dependiente. En el tercer paso, la doxorubicina se disocia del complejo y se une al ADN porque tiene mayor afinidad por él. En este caso, la disminución de la cantidad de proteasoma en el citoplasma provocará que haya un menor transporte de doxorubicina al núcleo y que por lo tanto ejerza menor efecto el fármaco.

Además, parece ser que la doxorubicina es capaz de aumentar la actividad del proteasoma, lo que aumentará también la degradación de factores de transcripción relacionados con la supervivencia de la célula. Esto, trasladado al contexto de una célula cardíaca, disminuirá las posibilidades de supervivencia del cardiomiocito^{73,74}.

Células madre tumorales

Por otro lado, las células madre tumorales son resistentes tanto a la radiación como a la quimioterapia. La resistencia a la quimioterapia se produce gracias a 2 mecanismos que poseen las células tumorales para este caso.

El primero es la presencia en una elevada cantidad de transportadores casete de unión a ATP (transportadores ABC), en concreto transportadores ABCG2 y transportadores *multidrug resistance 1*(MDR1)⁷⁵, que se encargan de bombear las moléculas del quimioterápico al exterior de la célula, previniendo así el daño a la célula y por tanto, la acción antitumoral del medicamento administrado.

El segundo mecanismo es una elevada producción de enzimas antioxidantes que previenen el daño de las ERO sobre las células. Estas ERO se producen en los tratamientos de radioterapia mediante la ionización de las células tumorales con rayos X y son capaces de provocar la apoptosis de la célula. También son parte del mecanismo de acción de muchos quimioterápicos, como la Doxorubicina, aparte de su capacidad de inhibir la topoisomerasa II. Las células madre tumorales tienen la capacidad de reducir y atenuar la producción de ERO mediante la síntesis de enzimas antioxidantes como la glutatión (GSH) y la activación de rutas como FOXO-1^{76,77}.

A partir del momento en el que las células madre tumorales han interactuado con el agente quimioterápico, adquieren resistencia a su efecto, y comienzan nuevamente a dividirse,

Introducción

produciendo una descendencia de células tumorales resistentes al fármaco. Estas células, formaran nuevos tumores resistentes a los tratamientos⁶.

A pesar de su gran eficacia frente al tratamiento de determinados tipos de cáncer, la doxorubicina presenta graves inconvenientes como su toxicidad sobre tejidos sanos, sobre todo por la producción de cardiomiopatías o por la resistencia que adquieren las células tumorales al medicamento. Al evitar el desenmarañamiento de la cromatina⁷⁸, evita también que se pueda producir la replicación del ADN. Por todo esto, las dosis acumulativas totales suelen limitarse para no exceder los 500-600 mg/m².

La doxorubicina tiene otro mecanismo importante de producción de daño en células del organismo además del de la inhibición de la replicación por interacción directa con el ADN o con su mecanismo de replicación. Muchos de los problemas que se generan en el organismo tras un tratamiento con doxorubicina están producidos por la producción de ERO.

2.2.3. ERO Y ESTRÉS OXIDATIVO

Las ERO son moléculas derivadas del oxígeno que poseen uno o más electrones desapareados en orbitales atómicos o moleculares. Esto hace que estas moléculas sean especialmente reactivas y tiendan a interactuar con otro tipo de moléculas. También existen las especies reactivas de nitrógeno (ERN), igual que las ERO pero derivadas de moléculas de nitrógeno. El principal proceso de aparición de ERO es mediante la adquisición de un electrón por parte de la forma molecular del oxígeno (O₂) para formar anión superóxido (O₂^{*}). Este radical libre formado puede reaccionar con otras moléculas como la superóxidodismutasa (SOD) generando peróxido de hidrógeno (H₂O₂), a partir del cual se puede generar el radical hidroxilo (OH^{*}), muy reactivo y capaz de dañar el ADN, proteínas, lípidos, glúcidos y otras estructuras celulares. El anión superóxido se genera en diferentes localizaciones, pero principalmente en la mitocondria, donde el continuo flujo de electrones en la cadena de transporte electrónica mitocondrial, sobretodo en los complejos I y III, hacen que algunos de estos electrones reaccionen con el O₂. El O₂^{*} generado así no es capaz de atravesar la membrana interna mitocondrial debido a la carga que posee, quedando atrapado dentro de la matriz mitocondrial, donde interactuará con los complejos de la cadena de transporte electrónico, con la membrana interna, ADNm...etc, o se convertirá en OH^{*}, que también

Introducción

acabará interaccionando con todos estos elementos. Otra ERO capaz de formarse a partir del O_2^{*-} es el radical peroxilo (ROO^*), responsable de procesos de peroxidación lipídica y posiblemente implicado en la carcinogénesis, ya que los radicales lipoperoxidos (ROO^*) producen un reactivo final, el MDAL, que es mutagénico.

Las ERN también son especies de radicales libres capaces de reaccionar con otras moléculas o estructuras celulares y dañarlas. La principal ERN es el óxido nítrico (NO^*), generado por la óxido nítrico sintasa (NOS) durante la reacción que convierte arginina en citrulina⁷⁹. En situaciones en las que se producen conjuntamente tanto NO^* como O_2^{*-} u O_2 , estas moléculas pueden reaccionar entre ellas y producir una molécula con una mayor capacidad oxidativa, el anión peroxinitrito ($ONOO^-$)⁸⁰. La toxicidad producida por este nuevo radical es capaz de producir daño suficiente en la célula como para hacerla entrar en apoptosis^{81, 82}.

Las ERO también se generan en otros orgánulos celulares como los peroxisomas. En ellos, se usa O_2 y H_2O_2 para la oxidación de sustancias como ácidos grasos, aminoácidos o poliaminas. Normalmente, no se genera una elevada cantidad de O_2^{*-} que pueda liberarse al citosol y dañar otras estructuras, pero cuando se producen situaciones de desequilibrio enzimático en las que fallen los mecanismos antioxidantes que evitan la formación de O_2^{*-} o OH^* , éstas pueden liberarse al exterior del peroxisoma.

Las células fagocíticas como los neutrófilos también son productoras de ERO bajo situaciones de inflamación con un fin defensivo. La enzima encargada en este caso de la producción de O_2^{*-} es la NAD(P)H oxidasa, aunque no sólo actúa en neutrófilos, sino también en otro tipo de células como fibroblastos, células musculares lisas del endotelio y/o cardiomiocitos, generando ERO que actúan como segundos mensajeros.

Visto esto, podríamos considerar que las ERO y ERN son moléculas perjudiciales que deberíamos evitar a toda costa, pero realmente esto es así sólo cuando hay un desequilibrio en su concentración.

Las ERO cumplen funciones fisiológicas dentro del organismo como puede ser:

- Producción de NO por parte de la enzima óxido nítrico sintasa (NOs).
- Mecanismo de defensa frente a patógenos en células fagocíticas.

Introducción

- Señalización de cascadas de transducción de señales en células no fagocíticas.
- Participar en la formación de GMP cíclico (GMPc), fundamental en procesos como la regulación del tono muscular en músculo liso o la inhibición de la agregación plaquetaria.
- Determinación de la concentración de oxígeno en el organismo.
- Adhesión celular.
- Apoptosis.

Y además participan en procesos de señalización celular como segundos mensajeros en procesos en los que son activados:

- Receptores de citoquinas y factores de crecimiento.
- Receptores pertenecientes a la familia de las Src quinasas y Janus quinasas.
- Tirosin fosfatasas.
- Serintreonin quinasas.
- Factores de transcripción nuclear como NF- κ B, AP-1, p53, factor nuclear de células T activadas (NFAT), factor inducible por hipoxia (HIF-1).

Por su parte, las ERN:

- Participan en procesos de neurotransmisión.
- Regulación de la presión sanguínea.
- Defensa del organismo.
- Relajación del músculo liso.
- Regulación de la respuesta inmunitaria⁸³.

Para mantener el equilibrio, las células poseen sistemas antioxidantes que se encargan de eliminar el exceso de ERO. Las defensas frente al daño oxidativo son de diferente naturaleza, como defensas físicas (por ejemplo la córnea en el ojo que protege frente a las ERO producidas por la radiación ultravioleta del sol)⁸⁴, defensas enzimáticas, mecanismos de reparación del daño producido y mecanismos de prevención.

Los sistemas enzimáticos de reparación comprenden enzimas como la SOD, glutathion peroxidasa (GPx) o catalasa. Los no enzimáticos comprenden sustancias como el ácido ascórbico (vit.C), α -tocoferol (vit.E), GSH, carotenoides, flavonoides, compuestos fenólicos, determinados tipos de proteínas u otros antioxidantes⁸⁵.

2.2.4. DOXORUBICINA Y ERO

La generación de especies reactivas de oxígeno por parte de la doxorubicina hace que se activen factores de transcripción que activan genes proapoptóticos, activando caspasas que fragmentan el ADN y que producen apoptosis. También activan al gen p53, que actúa sobre la mitocondria produciendo la liberación de citocromo c, AIF y una deficiencia de ATP, lo que conllevará en los 2 primeros casos a una fragmentación del ADN y apoptosis y en el caso de la deficiencia de ATP, a una necrosis de la célula. Por último, también afectan a la homeostasis celular del calcio, y provocaran una sobrecarga de calcio en la mitocondria, produciendo igual que en el caso anterior la apoptosis de la célula (Figura 10).

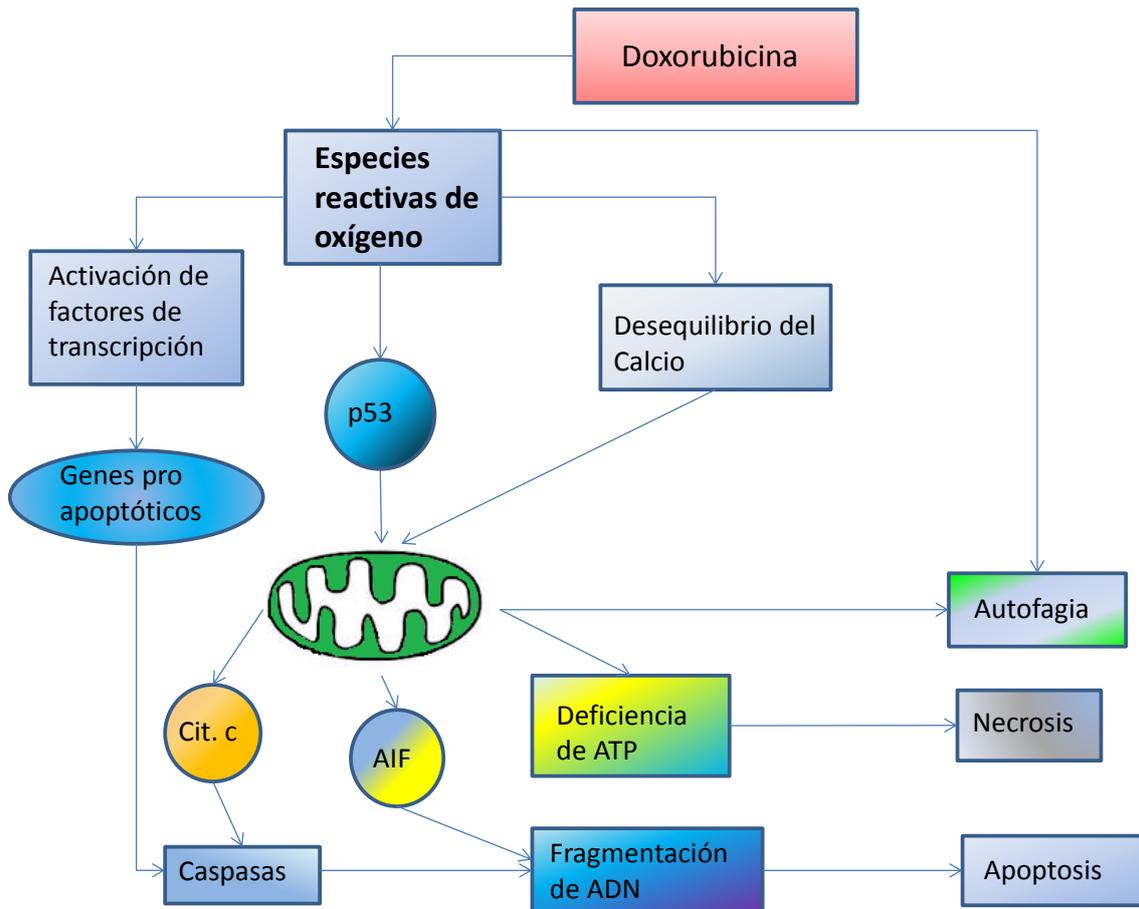


Figura 10. Consecuencias de la producción de especies reactivas de oxígeno por parte de la doxorubicina.

Las antraciclinas son capaces de aceptar un electrón y formar semiquinonas, que rápidamente se regeneran reduciendo oxígeno a ERO como $O_2^{\cdot-}$ o H_2O_2 (figura 11). Este proceso se produce por la acción de NAD(P)H oxidoreductasas como el citocromo p450, NADH deshidrogenasa mitocondrial (complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial), xantina deshidrogenasa u óxido nítrico sintasa endotelial^{86, 87} y de flavoproteínas que también poseen capacidad oxidoreductora.

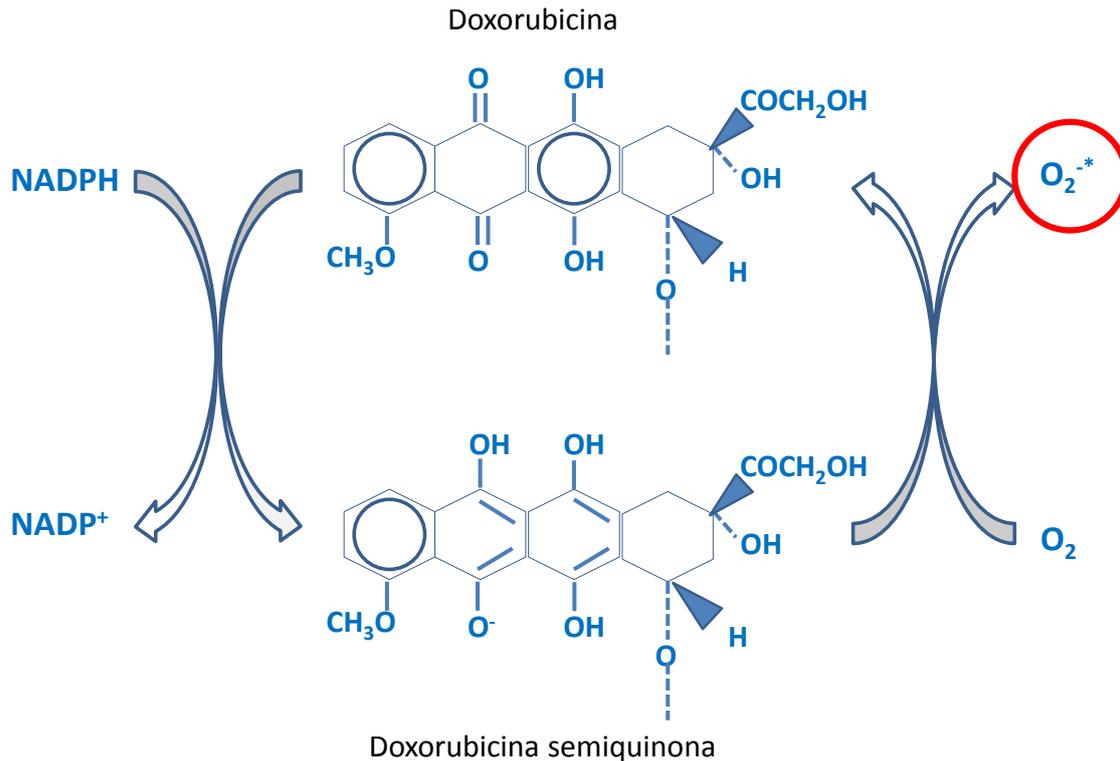


Figura 11. Ciclo de oxidoreducción de la doxorubicina. La doxorubicina se oxida aceptando un electrón del NADPH, pero rápidamente se reduce donando este electrón a una molécula de oxígeno, lo que convierte a la molécula de oxígeno en un anión superóxido.

La forma semiquinona de la Doxorubicina es capaz de intercalarse en las hebras de ADN⁸⁸ o en membranas, debido a su carácter lipofílico, dañando estructuras biológicas potencialmente importantes^{89, 90}. Por su parte, las ERO formadas durante la oxidoreducción de la Doxorubicina atacan rompiendo las hebras de ADN, modificando las bases, desoxirribosas o el entrecruzamiento de ADN⁹¹. Estos daños producidos son aún mayores en presencia de átomos de hierro, que son liberados por el O₂^{*-} de la ferritina, donde se encuentran almacenados, y que pueden formar un complejo con la doxorubicina en una relación 3:1 y catalizar las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, que convierte al O₂^{*-} + H₂O₂ en OH⁻ y OH^{*87}. Las zonas de actuación preferentes de las antraciclinas serán cerca del lugar donde se produzca el ciclo de oxidoreducción, esto es, alrededor del núcleo, retículo endoplasmático, y mitocondria.

El resultado final de esto, como consecuencia de las interacciones y daños que producen las ERO con el entorno, será la apoptosis de la célula, aunque por varios mecanismos posibles.

Hay 3 grandes vías de actuación para ello:

1. p53

A nivel de expresión genética, se sabe que la Doxorubicina es capaz de actuar sobre genes implicados en la replicación celular. Uno de los más importantes en este aspecto es el gen TP53, que codifica la proteína p53 y que se encuentra mutado en numerosos tipos de cáncer. Estas mutaciones en su mayoría son sustituciones de simplemente 1 nucleótido en la secuencia genómica de TP53⁹². Esto provoca que p53 no sea capaz de realizar su función, que es detener el ciclo celular para permitir la reparación del ADN y tampoco es capaz de inducir la apoptosis de la célula, con lo cual las células con esta mutación se siguen dividiendo y además, van acumulando mutaciones en su material genético que no son reparadas.

Este gen es muy importante en la protección frente a la aparición de numerosos tipos de cáncer, ya que las mutaciones en TP53 están presentes en el 50 - 55 % de los casos de cáncer. Las personas heterocigóticas para el gen TP53 (es decir, tienen un solo alelo con del gen) tienen un 90 – 95 % de posibilidades de desarrollar un cáncer⁹³, ya que al tener sólo una copia de este gen, si resulta mutado, no habrá posibilidad de compensar con el otro alelo. Esto nos puede servir como prueba diagnóstica en el caso de que queramos conocer la posibilidad de padecer un cáncer en algún paciente.

En condiciones normales, p53 permanece inactivo debido a que la MDM2 lo bloquea y ubiquitina, permitiendo el paso del núcleo al citoplasma para su posterior degradación por el proteasoma⁹⁴.

En situaciones de estrés celular, hipoxia, daño genético o activación de rutas oncogénicas que promueven la proliferación celular, p53 se estabiliza y deja de degradarse, acumulándose y translocándose al núcleo, donde actúa como factor de transcripción para detener el ciclo celular en las fases G₁/S o G₂/M o provocar directamente la apoptosis de la célula. El objetivo de detener el ciclo celular es el de reparar el daño en el ADN o, en el caso de que el daño sea irreparable, producir la muerte de la célula para evitar que ese material genético defectuoso se replique y pase a nuevas generaciones de células^{95, 96}.

p53 activa o inhibe más de 150 genes aunque los principales son: MDM2 (ubiquitin ligasa que se une a p53 para marcarlo y ser degradado), p21^{WAF1/Cip1} (codifica CDKN1A, una proteína inhibidora de las quinasas CDK2 y CDK4, por lo que su función será la de inhibir el

Introducción

ciclo celular), ciclina G, Bax (promueve la apoptosis), IGF-BP3 (bloquea señales proliferativas en la célula) o GADD45 (detiene el ciclo celular para permitir la reparación del ADN)^{93, 97, 99}.

La inhibición de la topoisomerasa II por parte de la Doxorubicina provocará la activación de p53 en respuesta a esta agresión y su unión al ADN para activar genes implicados en la reparación y regulación del ciclo celular. Es importante la concentración del fármaco a nivel celular, ya que se ha descrito que a bajas concentraciones, p53 activa a p21, que se encarga como ya hemos visto antes de regular el ciclo celular. Pero a mayores concentraciones, p53 activa a la proteína Bax, entre otras proteínas pro apoptóticas, que serán las encargadas de provocar la apoptosis. Este es uno de los mecanismos mediante el cual la doxorubicina consigue provocar la destrucción de la célula¹⁰⁰. La mutación de TP53 por lo tanto, puede significar un aumento de la resistencia al fármaco, ya que esta vía dejaría de funcionar correctamente. Aun así, existen otras vías de actuación que no necesitan de la activación de p53⁴⁵. Estas otras vías e incluso la activación de Bax o Bcl-2, también pueden ser activadas por ERO producidas por la Doxorubicina, con lo cual no será necesaria la activación del gen TP53 para producir apoptosis¹⁰¹.

Hay estudios que demuestran en líneas celulares que aún en ausencia de p53, las antraciclinas son capaces de detener el ciclo celular e incluso son más efectivas¹⁰².

Actualmente existe controversia entre la relación de las antraciclinas y p53, ya que hay teorías que apuntan que son capaces de actuar sin necesidad de la formación del complejo antraciclina-ADN-topoisomerasa II ni de la activación de p53. Algunos autores sugieren que a altas concentraciones de antraciclinas se provoca una cascada de hidrólisis de esfingomielina de las membranas celulares, lo que genera la formación de ceramidas y la posterior activación de rutas de muerte celular que no requieren la actuación de p53¹⁰³.

La función de la proteína p53 es la siguiente:

a) Detención del ciclo celular:

Los productos derivados de la activación de p53, como pueden ser p21, son capaces de unirse a complejos de ciclinas promotoras de la división celular (ciclina D1-Cdk4, ciclina E-Cdk2, ciclina A-Cdk2 o ciclina A-Cdc2). Al hacer esto, inhiben a las ciclinas y por lo tanto la proliferación. También se une al antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) e inhibe su actividad polimerasa, pero no así su actividad como proteína reparadora del ADN,

Introducción

facilitando una reparación del ADN sin provocar la replicación. Otros experimentos realizados para comprobar la manera de actuación de p53 demuestran que no solo es capaz de actuar bloqueando la división en la fase G₁ del ciclo celular, sino que también actúa sobre la fase G₂/M, evitando que una célula con material genético defectuoso pueda replicarse, o sobre la fase G₀, cooperando con la proteína Gas1, que es capaz de detener el ciclo celular en esta fase (figura 12), pero únicamente cuando se encuentra p53 en su estado normal, no mutado⁹³.

b) Apoptosis:

p53 es capaz de producir la apoptosis de la célula si ésta no está en condiciones de replicarse adecuadamente. Las condiciones son: un daño irreparable en el ADN, un ambiente celular no apto para la viabilidad de la célula o la activación de una ruta de replicación oncogénica. La manera de actuación de p53 en este caso depende de las condiciones del entorno y del tipo de célula. Puede actuar por medio de la transcripción de otros factores o sin la necesidad de ellos. 2 de los productos de la transcripción de TP53 anteriormente mencionados, Bax e IGF-BP3 son importantes intermediarios en la producción de apoptosis mediada por p53, ya que promueven la apoptosis⁹³.

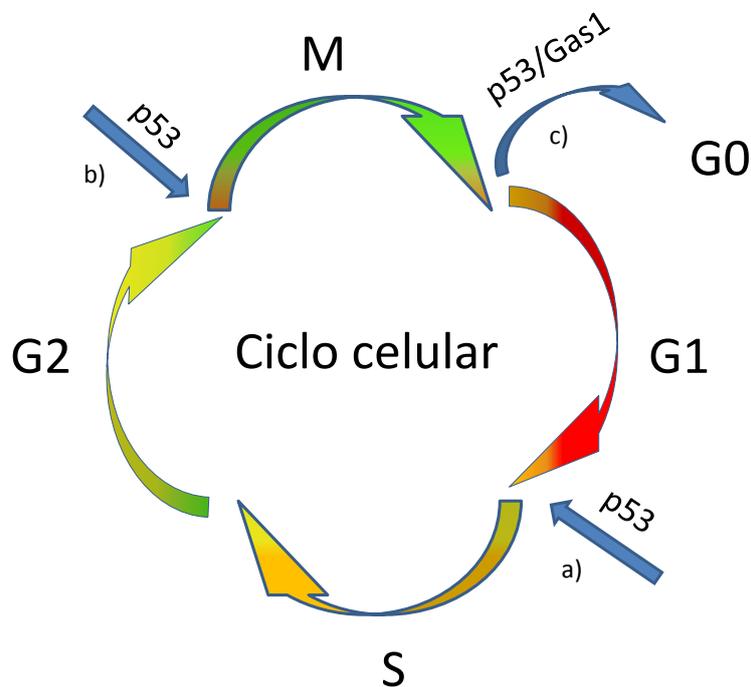


Figura 12. Ciclo celular y fases en las que interviene p53. a) p53 interviene evitando que la célula entre en fase S, evitando así la duplicación del material genético para evitar la mitosis. b) p53 actúa también entre la fase G₂ y la fase M, deteniendo el proceso de replicación celular. c) p53 junto con Gas1 promueven la entrada de la célula en fase G₀, durante la cual no se divide.

Introducción

Actualmente, una interesante teoría es la de la liberación de citocromo c de la mitocondria, produciendo apoptosis independientemente del estado de daño del ADN o de p53^{104, 105}. Las teorías más actuales se centran en el transporte al núcleo celular de las antraciclinas, el papel del daño oxidativo al ADN y el ataque de las antraciclinas a los telómeros del ADN.

p53 es activado también como ya hemos dicho por situaciones de estrés celular, como puede ser una situación de elevada generación de ERO, en el caso que nos incumbe, por la administración de doxorubicina¹⁰⁶. Una elevada generación de ERO activará a TP53. La proteína p53 activará tanto caspasas como a Bax. Las caspasas promoverán la apoptosis de la célula mediante una cascada de activación de caspasas, mientras que Bax actuará sobre la mitocondria, disminuyendo su potencial de membrana y produciendo la liberación de citocromo c¹⁰⁷.

La apoptosis mediada por citocromo c no es un proceso que se tenga claro totalmente, pero hay varias ideas. Una es que el citocromo c liberado al citosol se une a dATP, formando el apoptosoma. Este complejo se une a caspasa 9, y entonces activan a caspasa 3, que es una de las caspasas que finalmente producen apoptosis.

La otra idea es que el citocromo c se une a inositoltrifosfato (IP3), produciendo una liberación de calcio al citosol. El calcio activa calpaina (proteasa) y libera AIF¹⁰⁸.

Factor inductor de apoptosis (AIF)

AIF es una proteína de la familia de las NADH oxidasas producida como una proteína de 67 kDa, cuya forma madura es una proteína de 57 kDa sintetizada en la mitocondria gracias a una calpaina. La forma madura contiene un grupo flavin adenina dinucleotido (FAD). Esta proteína posee 3 funciones totalmente diferentes que se resumen en la figura 13. Por un lado, y como su nombre indica, es una proteína con capacidad de inducir una apoptosis independiente de caspasas, pero por otro lado, tiene un papel clave en la formación del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y además, también actúa como antioxidante. De hecho, AIF tiene 2 dominios fundamentales en su estructura, uno de unión al ADN (función apoptótica) y otro dominio con actividad oxidoreductora (función antioxidante).

La capacidad de producir apoptosis se produce una vez que AIF es liberado al citoplasma. AIF es separada primero de su lugar de unión a la membrana interna mitocondrial

Introducción

por calpainas y catepsinas. Son activadas en función del pH del medio. Una vez liberado AIF, se transloca al núcleo donde produce digestión y condensación de la cromatina en fragmentos de aproximadamente 50 kilobases. Además, AIF actúa sobre los poros mitocondriales, abriéndolos y comprometiendo así la viabilidad mitocondrial, tanto de la mitocondria desde donde se libera AIF como de mitocondrias adyacentes¹⁰⁹.

AIF está involucrada en multitud de procesos de apoptosis producidos por daño en el ADN (como en el caso de doxorubicina), activación de receptores de apoptosis, daño oxidativo, episodios de hipoxia/isquemia, ceramidas, desarrollo fisiológico animal, infección por agentes patógenos, neuropatologías...etc.

El mecanismo de degradación del ADN por parte de AIF se produce mediante unión de AIF a ciclofilina A (CypA), una peptidil prolil-cis-transisomerasa. El complejo AIF-CypA se transloca al núcleo, donde degradarán y fragmentarán el ADN.

Acerca de la acción oxidoreductora del AIF, se ha demostrado mediante ensayos con ratones Harlequin, genéticamente modificados para expresar un 80 % menos de AIF, que estos desarrollaban problemas en la retina y neurodegeneración, acompañado de una elevación en los parámetros indicadores de estrés oxidativo. Las neuronas y los cardiomiocitos son especialmente sensibles a la acción proapoptótica de las ERO, por lo que es absolutamente necesario mantener unos niveles adecuados de AIF mitocondrial. Así, como agente oxidoreductor, permite mantener una adecuada integridad estructural y funcional dentro de la mitocondria, evitando el daño oxidativo producido por las ERO producidas en la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

Sin embargo, la acción más importante que AIF ejerce dentro de la mitocondria es la de participar en la síntesis del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y en menor medida del complejo III. Ensayos realizados sobre ratones en los que se reducía la expresión de AIF en musculo estriado daban como resultado cardiomiopatías, atrofia del musculo esquelético y finalmente la muerte del animal a los 4 meses de edad.

Ensayos realizados en líneas celulares AIF^{-/-} demostraron una pérdida de las subunidades NDUFB6, NDUFS7, NDUFB8, NDUFA9¹¹⁰ y Grim19, así como una disminución de la expresión post transcripcional de complejo I. Para el complejo III, disminuía también la cantidad de algunas subunidades como UQCRC1, UQCRC2 y UQCRFS1, pero no su expresión. No hay ninguna otra alteración en cuanto a los demás complejos mitocondriales, composición de membranas, concentración y tipo de proteínas mitocondriales, expresión de ADN

mitocondrial (ADNm)...en estas líneas deficientes en AIF. Esto sugiere un papel de AIF basado en el ensamblado de las diversas subunidades principalmente del complejo I y en menor medida del III, pero sin formar parte de su estructura. Estas deficiencias de AIF provocan una serie de síntomas clínicos como neurodegeneración con ataxia o degeneración retinal progresiva^{111, 112}. Otros ensayos también concluyen lo mismo. Una disminución de la expresión de AIF conlleva una reducción de la cantidad y función del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial sin que haya reducción en los demás complejos^{113, 114}. Estos estudios se realizan principalmente con líneas celulares AIF deficientes o que no expresan la proteína en absoluto y con ratones *Harlequin* que presentan una reducción de la expresión de AIF. Una deficiencia total no se puede estudiar en seres vivos porque la falta de AIF, y por lo tanto, la falta de complejo I y de funcionalidad de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, produce la muerte de cualquier embrión¹¹⁴.

Funciones de AIF



- Proapoptótico cuando se libera al citosol, translocándose al núcleo y degradando el ADN.
- Participa en la formación del complejo I de la cadena de transporte electrónica mitocondrial.
- Antioxidante dentro de la mitocondria, ya que posee un dominio NADH oxidasa.
- Una deficiencia de complejo I es la causa de mas del 30 % de las enfermedades mitocondriales.

Figura 13. Funciones de AIF.

2. Regulación de la concentración de calcio

La administración de doxorubicina genera ERO, que son capaces de interactuar con los sistemas reguladores de calcio, como el retículo endoplasmático o los canales de calcio. El calcio normalmente participa en procesos de señalización celular, como segundo mensajero. El problema viene cuando en situaciones de estrés oxidativo se produce una liberación excesiva.

Introducción

Las mitocondrias de animales tratados con doxorubicina son más sensibles a los estímulos que provocan la liberación del calcio almacenado en los orgánulos celulares, principalmente en el retículo endoplasmático, al citosol. Si se produce esta liberación, conllevará un aumento de la recaptación de este ión por parte de la mitocondria. Esta sensibilidad puede deberse a la acción de las ERO sobre el poro de transición mitocondrial, que provocan su apertura. Pero las ERO no solo actúan sobre el poro de transición mitocondrial, sino que muchos canales de calcio dependen del estado redox, por lo que se abrirán ante la presencia de una elevada concentración de ERO, permitiendo la entrada del ión a la mitocondria. La sensibilidad del poro de transición mitocondrial al calcio viene determinada por varios factores como el pH, la concentración de fosfato, concentración de ADP y estado redox de la célula.

La mitocondria, ante una sobrecarga de calcio, será incapaz de funcionar correctamente, produciéndose un descenso en los niveles de ATP¹¹⁵. Además, se generarán aún más ERO, que desgastarán los niveles de NADP (H) intracelular, aumentando la vulnerabilidad de la célula frente al daño oxidativo, ya que el NADP (H) actúa como enzima antioxidante. La elevada concentración de calcio también aumentará la permeabilidad de la membrana mitocondrial, aumentando la apertura del poro de transición mitocondrial, lo que producirá la salida de citocromo c y AIF al citosol. Todos estos factores en conjunto provocarán la entrada de la célula en apoptosis¹¹⁶.

3. Activación de factores de transcripción

Hay también factores de transcripción que se activan cuando se administra doxorubicina, como el caso de las protein quinasas activadas por mitógenos (p38 MAPK), entre las cuales encontramos la quinasa N-terminal JNK¹¹⁷. p38 es necesario para la sobreexpresión de otra molécula llamada atrogina-1 por parte de la doxorubicina. La atrogina-1 es la encargada de activar a JNK. A través de la degradación de la fosfatasa MAPK-1, que se encarga de inactivar a JNK.

JNK tiene como dianas biológicas a otros factores de transcripción encargados de la regulación del ciclo celular, como p53, c-Myc o AP-1, así como moléculas que no son factores de transcripción pero que están íntimamente relacionadas con la replicación celular, como las proteínas de la familia Bcl-2. JNK se activa, entre otras, por la acción de ERO y parece ser que inhibe mediante fosforilación a proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2 y activa

Introducción

proteínas pro apoptóticas mitocondriales como Bax, activándose el proceso de apoptosis celular¹¹⁸.

Se ha visto que durante episodios de isquemia-reperfusión, se incrementan los niveles de atrogina-1 y JNK, produciendo una disminución de la cantidad de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y un aumento de la pro-apoptótica Bax, activación de caspasa 9 y caspasa 3, resultando en la apoptosis del cardiomiocito¹¹⁹.

Hay otros genes que se activan cuando se administra doxorubicina. Estos genes codifican transportadores de membrana encargados de la eliminación intracelular de agentes tóxicos como la doxorubicina. Son transportadores de la familia ABC. En concreto, el ABCB1, se sobreexpresa cuando se administra doxorubicina. Como su función es la de transportar tóxicos fuera de la célula, esto repercutirá en un aumento de la resistencia al fármaco¹²⁰.

Recientes estudios afirman que la doxorubicina ataca directamente a células progenitoras cardíacas (CPC) mediante diversos mecanismos de actuación como incremento de la producción de ERO¹²¹, expresión del gen TP53, desgaste de telomerasas y apoptosis. Estas CPC son las encargadas de regenerar el tejido cardíaco cuando hay una lesión, pero el tratamiento con doxorubicina reduce drásticamente los niveles de estas células, ya que son más sensibles a daños oxidativos y entran fácilmente en procesos de muerte celular^{122, 123}. Esto hace que la lesión que produce la doxorubicina en el tejido cardíaco sea aún más grave. El conjunto de alteraciones que se producen sobre los miocitos, destrucción de las CPC, alteración de la contractilidad por disminución de la actividad de los canales de Ca²⁺ pueden ser las responsables del daño en el corazón producido por doxorubicina¹²⁴.

2.2.5. DOXORUBICINA Y DAÑO CARDIACO

Las antraciclinas (doxorubicina, daunorubicina, epirubicina e idarubicina) son los fármacos antineoplásicos más efectivos. Desgraciadamente, a pesar de ser uno de los agentes terapéuticos más utilizados en el tratamiento de numerosos tipos de cáncer, su uso está limitado por la aparición de efectos secundarios tanto a dosis agudas como crónicas¹²⁵. Las reacciones agudas aparecen minutos tras la administración del fármaco e incluyen náuseas, vómitos, mielosupresión y arritmia. Las crónicas pueden desarrollarse entre semanas y meses e incluso a los 10 años después de haber terminado de tomar el tratamiento aparecen estos problemas¹²⁶ produciendo daños en corazón, hígado, cerebro o riñón. En el corazón y en el

Introducción

cerebro los daños producidos son mayores, ya que tanto los cardiomiocitos como las neuronas son células post mitóticas, y una vez destruidas no son reemplazadas. En corazón este daño es especialmente grave, por la alta vulnerabilidad de este tejido frente al daño inducido por radicales libres debido a la alta tasa metabólica y a la reducida capacidad antioxidante. Esta cardiotoxicidad dosis dependiente puede causar cardiomiopatías, hipotensión, taquicardia, dilatación cardíaca, fallo ventricular e insuficiencia cardíaca^{127, 125}. En el electrocardiograma de un paciente que recibe tratamiento con doxorubicina podemos apreciar la aparición de taquicardias, achatamiento de la onda T, prolongación del intervalo Q-T o disminución de la amplitud de la onda R. Las ecografías cardíacas revelan una disminución del volumen de eyección del ventrículo izquierdo, que es dosis dependiente, lo que refleja un declive de la función tanto sistólica como diastólica, acompañado de un gran incremento en la presión diastólica final del ventrículo izquierdo¹²⁸. A nivel sérico, se ven incrementadas la enzima glutamina oxalacetato transaminasa (GOT), lactato deshidrogenasa (LDH), y creatin fosfo quinasa (CPK). A nivel ultraestructural, el daño se refleja como pérdida de miofibrillas, dilatación del retículo sarcoplásmico, vacuolización citoplasmática, agrandamiento de la mitocondria y un mayor número de lisosomas^{129, 130}.

Se conoce el mecanismo de acción de la doxorubicina. Esta molécula actúa principalmente inhibiendo la replicación de las células por la unión y formación de un complejo topoisomerasa-doxorubicina-ADN que inactiva a la topoisomerasa. La activación de TP53 también es un factor que provoca apoptosis en la célula¹³⁰. En cardiomiocitos, el daño producido por doxorubicina provoca una acumulación de p53 previa activación de ATM quinasa¹³¹. La ruta de señalización ERK/p53 es una de las principales vías por la cual actúa p53. Al activarse, los niveles de Bcl-2 (antiapoptótica) disminuyen e incrementan los de Bax y p53 que son proapoptóticos, caspasa 3, ruptura de la poli (ADP-ribosa) polimerasa y un colapso del potencial de membrana mitocondrial, provocando como resultado final la apoptosis de la célula¹³².

Aunque hay estudios que sugieren que el principal daño a nivel de cardiomiocitos y células no tumorales se produce por la sobreproducción de ERO y no por la expresión de p53, mientras que la apoptosis de células tumorales se produce por la activación de TP53 y no por la producción de ERO¹³³.

En el caso de las ERO, uno de los mecanismos de daño indirecto que ejercen sobre los cardiomiocitos es la formación de aductos de ADN. Los radicales libres promueven la lipoperoxidación y la formación de MDAL, que reacciona con deoxiguanidina, deoxicitidina y

Introducción

deoxiadenosina. Estos productos son altamente mutagénicos, bloqueando la replicación del ADN y aumentando la frecuencia de error de lectura de la ADN polimerasa⁴⁵.

La doxorubicina es capaz de generar ERO por varios mecanismos:

a) Producción de semiquinonas

La doxorubicina se transforma en una semiquinona inestable al aceptar electrones de NAD(P)H reductasas en el complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. La semiquinona reacciona con O_2 para formar $O_2^{\cdot-}$ y vuelve a su estado original. Este proceso es cíclico, generándose grandes cantidades de $O_2^{\cdot-}$ que darán lugar a la formación de otras ERO o ERN como H_2O_2 , OH^{\cdot} o $ONOO^-$ ^{125,134}.

b) Activación de NAD(P)H oxidasas

La activación de estas NAD(P)H oxidasas provocará la generación de ERO como $O_2^{\cdot-}$ que reaccionará con NO para formar $ONOO^-$. El $ONOO^-$ está implicado en la activación de metaloproteinasas, relacionadas con el desarrollo de cardiotoxicidad¹³⁵.

c) Mecanismos no enzimáticos

La forma semiquinona de la doxorubicina, el $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 son capaces de liberar hierro desde la ferritina y aconitasa citoplasmática. Este hierro reaccionará con la doxorubicina para generar OH^{\cdot} ^{45,134}.

d) Productos del metabolismo de la doxorubicina

Al metabolizarse, la doxorubicina se convierte en doxorubicinol, capaz de liberar hierro de la aconitasa citoplasmática como la doxorubicina. Otro de los productos generados es una aglicona lipofílica capaz de difundir a través de la membrana mitocondrial y acumularse dentro. Este metabolito es capaz de activar ciertas reacciones que darán como resultado la producción de ERO y que provocarán el mal funcionamiento de la cadena de transporte electrónico mitocondrial¹³⁴.

Introducción

Estos mecanismos descritos para la doxorubicina participan tanto en la muerte de células cancerosas como en la producción de efectos tóxicos sobre el cardiomiocito. La doxorubicina tiene la capacidad de modificar la composición química, estructura y función de las membranas biológicas, sobretodo la mitocondrial, debido a la peroxidación que es capaz de producir por la producción de ERO¹³⁶⁻¹³⁸. La doxorubicina tiene gran afinidad por un fosfolípido muy presente en la membrana interna de la mitocondria, la cardiolipina. La unión de la doxorubicina a la cardiolipina es lo que hace que el fármaco se acumule fácilmente en la mitocondria y genere ahí ERO, dañando a las estructuras mitocondriales como a la cadena de transporte electrónico, ADNm, membrana interna...etc^{125,130}.

La producción de ERO conlleva también la activación de otro agente importante, NF- κ B. NF- κ B es un complejo proteico encargado de controlar la transcripción del ADN, y que está involucrado en la respuesta a diversos tipos de estímulos celulares, como la presencia de citoquinas (interleucinas o factor de necrosis tumoral), antígenos bacterianos o virales, radiación ultravioleta, lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas o la presencia de ERO. NF- κ B es uno de los principales productores de ERO en el organismo, siempre y cuando aparezcan los estímulos necesarios para activarlo. Está demostrado que la doxorubicina activa a NF- κ B. El proceso consiste en que la producción de ERO causada por la administración de doxorubicina es capaz de degradar a las proteínas inhibitoras de NF- κ B (I κ B), con lo cual NF- κ B queda libre y activada, provocando apoptosis tanto de células endoteliales como de cardiomiocitos^{139, 140}.

La liberación de Ca²⁺ también juega un papel importante en la cardiotoxicidad producida por la doxorubicina. Se conoce que la administración del fármaco induce una liberación de Ca²⁺ intracelular que llega a alterar el proceso normal de transporte de este ion en el tejido cardíaco. Esto provoca perturbaciones en la contracción y relajación del músculo¹⁴¹. La cardiomiopatía producida tras la administración crónica de doxorubicina muestra una disminución de la actividad de la protein quinasa II ARNm calcio/calmodulina dependiente, que se correlaciona con un fallo en la función cardíaca, expresión reducida de proteínas en el sarcómero y un mayor daño en el tejido cardíaco¹⁴².

¿Por qué afecta entonces la doxorubicina más al tejido cardíaco que a otros tejidos como hígado o riñón? las características especiales del corazón con respecto a los demás órganos marcan la diferencia en este aspecto (figura 14). Por ejemplo, en el retículo endoplasmático de las células hepáticas hay una elevada concentración de citocromo p450 que protege frente a la producción de ERO porque provocan que el ciclo de oxidoreducción de la Doxorubicina se produzca cerca del retículo endoplasmático. En el tejido cardíaco, la

Introducción

expresión y actividad de p450 en el retículo es menor, así que el ciclo de oxidoreducción se dará en su mayor parte en la mitocondria¹⁴³.

Otro factor es que el tejido cardiaco está sujeto a una tasa metabólica mucho más elevada que el resto de los tejidos, y es capaz de generar más energía mediante fosforilación oxidativa gracias a que la densidad mitocondrial en corazón es de alrededor de un 25 % por célula. La cadena de transporte electrónico mitocondrial es una importante fuente de ERO, ya que un pequeño porcentaje de los electrones que circulan a través de la cadena escapan de los complejos (principalmente del complejo I) y son capaces de interactuar con el O_2 para formar $O_2^{\cdot-}$. La elevada cantidad de mitocondrias sirven como fuente de ERO y diana de la Doxorubicina para producir aún más ERO, ya que, como veremos más adelante, esta antraciclina tiende a acumularse en la membrana interna mitocondrial. Cuanto mayor sea el número de mitocondrias, mayor será la acumulación de Doxorubicina y la generación de ERO¹⁴⁴. Si además de esto, tenemos en cuenta que el corazón posee una menor capacidad antioxidante caracterizada por una expresión 150 veces menor de catalasa y 4 veces menor de SOD que otros órganos como el hígado y que la Doxorubicina es capaz de inducir una disminución de la actividad de la glutatión peroxidasa. Esta disminución puede estar provocada por varios factores, como la oxidación de la molécula de selenocisteína responsable de la acción reductora de la glutatión peroxidasa que provocaría la pérdida de la capacidad antioxidante de la enzima o por la producción de MDAL que igualmente sería capaz de oxidar el sitio activo de la enzima o de formar enlaces cruzados con la enzima e inactivarla^{145, 146}. Así, nos queda un tejido con una alta susceptibilidad de sufrir la acción de cualquier tipo de radical libre, siendo el daño producido mucho mayor.

Causas de susceptibilidad del tejido cardiaco frente a DOX



- Baja concentración de p450 que protege frente a la DOX.
- Tasa metabólica mayor en el corazón.
- Mayor densidad mitocondrial y producción de ROS.
- Menor capacidad antioxidante.

Figura 14. Causas de la mayor susceptibilidad del tejido cardiaco frente al daño oxidativo producido por la doxorubicina.

Por lo tanto, la unión de estos factores como relativamente poca abundancia de retículo endoplasmático y oxidoreductasas nucleares, junto con la elevada cantidad de mitocondrias, hacen que la reducción de la doxorubicina se produzca con muy alta probabilidad en la mitocondria¹⁴⁷.

Papel de los antioxidantes

Teniendo en cuenta que la principal causa de daño por parte de la doxorubicina parece ser la producción excesiva de daño oxidativo, mediante la generación excesiva de ERO, es lógico pensar que la disminución de la producción de EROs dará lugar a un menor daño en las células afectadas. No podemos disminuir la cantidad de ERO que genera la doxorubicina (exceptuando futuras modificaciones en la forma farmacéutica o en su estructura química), así que la manera que tenemos de disminuir la cantidad de estas sustancias es mediante el empleo de antioxidantes. De hecho, hay numerosos estudios en los que se prueban diferentes sustancias con poder antioxidante con el objetivo de eliminar estas ERO, como la coenzima Q₁₀(CoQ₁₀)¹⁴⁸, extractos de semillas de uvas¹⁴⁹, antioxidantes presentes en la dieta como las vitaminas E, C, A, flavonoides, selenio o los componentes con acción antioxidante del aceite de oliva¹³⁰ o fármacos como el Carvedilol¹⁵⁰ y principios activos como el Dexrazosano¹⁵¹. La

Introducción

alimentación es una fuente importante de antioxidantes, y es importante conocer las características de cada componente presente en los alimentos.

La vitamina E juega un papel muy importante a la hora de proteger tejidos y células frente al daño oxidativo y de evitar la peroxidación lipídica y proteica. Ratas pretratadas con vitamina E antes de la administración de doxorubicina presentaron un electrocardiograma normal, así como menores niveles de fosfocreatin quinasa y lactato deshidrogenasa¹⁵². Sin embargo, esta capacidad es muy limitada y la vitamina E no es capaz de prevenir la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial¹⁵³ ni de prevenir la cardiotoxicidad crónica^{125, 130}.

La vitamina A también ha demostrado tener buena capacidad antioxidante y carioprotectora a nivel del miocito en ratas tratadas con doxorubicina, pero no consigue prevenir la aparición de problemas cardíacos provocados por la doxorubicina a largo plazo¹⁵⁴. Un estudio llevado a cabo por Ateşşahin y col¹⁵⁵. en el que se realizó un tratamiento con licopeno previo a la administración de doxorubicina mostró una normalización de los niveles de MDAL y una disminución de los niveles de GSH junto con una preservación del tejido cardíaco frente al daño producido por doxorubicina.

Los flavonoides son otra de estas sustancias presentes en los alimentos que poseen propiedades antioxidantes y capacidad de proteger frente a la cardiotoxicidad producida por la doxorubicina. Son capaces de quelar moléculas de hierro y de neutralizar las ERO formadas por la reacción de Fenton y Haber-Weiss¹⁵⁶ ensayos realizados con un flavonoide semisintético, el 7-monohidroxietyl rutosido (monoHER), han demostrado gran capacidad cardioprotectora para esta molécula^{157, 158} gracias a su capacidad para reducir la peroxidación lipídica, la producción de $O_2^{\cdot*}$, ferrocitocromo c y el uso de O_2 por parte de la doxorubicina¹⁵⁹. Además, su acción antiinflamatoria también protege el tejido cardíaco, ya que esta sustancia previene la sobreexpresión de moléculas de adhesión vascular 1 (VCAM1) y E-selectina en neutrófilos¹⁶⁰ y provoca la disminución de la producción de N-ε-(carboximetil) lisina, molécula que se acumula en el tejido cardíaco cuando se produce un daño¹⁶¹.

Los niveles de CoQ₁₀ en la membrana mitocondrial, su biosíntesis y la actividad de los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial que dependen de esta molécula, se encuentran reducidos tras la administración de doxorubicina¹⁶². Estudios preclínicos han demostrado que la suplementación y tratamiento con CoQ₁₀ antes de la administración de doxorubicina disminuyen los niveles de oxidación lipídica y la cardiotoxicidad sin interferir en la actividad antitumoral de la doxorubicina¹⁴⁸. Un estudio más reciente en el que se administra mitoquinona (un análogo de la CoQ₁₀) intraperitonealmente a

Introducción

ratas junto con doxorubicina y sin doxorubicina, protege el tejido cardíaco mediante la expresión de subunidades II de citocromo c oxidasa y Va¹⁶³.

La ingesta de Selenio refuerza la capacidad antioxidante de los cardiomiocitos y disminuye el daño provocado por la doxorubicina en ellos¹³⁰. Esto lo consigue incrementando la concentración de GSH y la actividad de la glutatión peroxidasa y catalasa en corazón¹⁶⁴.

En nuestro caso, sabemos que el aceite de oliva contiene numerosas sustancias con poder antioxidante, así que hemos estudiado en concreto la capacidad del hidroxitirosol, para poder así conocer mejor el mecanismo de acción de esta sustancia y su posible papel como antioxidante, como sustancia protectora frente a este y otros muchos daños producidos por la liberación de ERO.

Hay otras sustancias no relacionadas con la dieta, sino que son sintéticas y que mediante este efecto antioxidante, consiguen disminuir los efectos perjudiciales de la doxorubicina sobre el tejido cardíaco. Actualmente, se sabe que el Carvedilol, con actividad antagonista α -adrenérgico, posee una alta capacidad antioxidante, por lo que se ha estudiado sus efectos sobre la producción de ERO y el daño asociado a los cardiomiocitos, demostrándose su efecto cardioprotector¹⁶⁵⁻¹⁶⁷.

También tenemos al Dexrazosano, el único principio activo cardioprotector disponible para uso clínico. Su aplicación es en casos de tratamientos de determinados tipos de cáncer en los que la medicación produzca daños a nivel cardíaco, como en el caso de los tratamientos con antraciclinas como la doxorubicina. Su mecanismo de acción es mediante la unión a moléculas de hierro intracelular y mediante retirada de las moléculas de hierro unidas a doxorubicina, lo que evita que este hierro acoplado a doxorubicina produzca ERO^{165, 168}.

Estas 2 sustancias a pesar de tener un mecanismo de acción distinto, actúan de manera antioxidante, evitando la producción de ERO, poseyendo efecto cardioprotector.

2.2.6. MITOCONDRIA Y DOXORUBICINA

La mitocondria es una estructura fundamental en el estudio de numerosas patologías causadas por una alteración en su funcionamiento, como puede ser en el caso de la diabetes, miopatías, encefalomiopatías, neuropatías, ataxias, retinitis pigmentosa u otras enfermedades como la neuropatía de Leber o el síndrome de Leigh entre otros. Las alteraciones en su función

Introducción

pueden deberse a daños en su estructura que provoquen una apertura de los canales que regulan la homeostasis interna de la mitocondria, daños en el ADNm que provoquen una síntesis de moléculas defectuosas o daños en los componentes de la cadena de transporte electrónico. Gran parte de estos daños están causados por la generación de una elevada cantidad de ERO en el interior o exterior de la mitocondria.

En el corazón, las mitocondrias constituyen sobre el 30 % del total del volumen del cardiomiocito, y se alinean en filas entre las miofibrillas. Se sitúan cerca del retículo endoplasmático y del núcleo. Esto hace que haya un correcto flujo de ATP y Ca^{2+} entre la mitocondria y los demás orgánulos.

2.2.7. MITOCONDRIA. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN

La mitocondria es el lugar donde tiene lugar todo el proceso de producción de ERO por parte de la doxorubicina, y el orgánulo que va a sufrir el mayor daño dentro de la célula.

La mitocondria es la fuente de energía de la célula, obteniendo ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa. Es tal su importancia que incluso posee su propio ADNcuyaparticular estructura lo hace vulnerable frente al ataque de las ERO, y su daño es un proceso fundamental en la iniciación de la apoptosis celular. Su estructura se divide en: membrana externa, espacio intermembrana, membrana interna y matriz mitocondrial¹⁶⁹.

- Membrana externa

La membrana externa es una bicapa lipídica con numerosos poros (porinas) y proteínas transportadorasque permiten el paso de sustancias a través de ella. Su composición es muy parecida a la de la membrana citoplasmática, es decir, proteínas, glúcidos, fosfolípidos, colesterol¹⁶⁹.

- Espacio intermembrana

En el espacio intermembrana se acumulan los protones derivados del paso de electrones a través de la cadena de transporte electrónico que posteriormente serán usados por la ATP sintasa para producir ATP. Además, ciertas enzimas, como la creatin quinasa o la

Introducción

carnitina se encargan de transportar ácidos grasos desde el citosol hasta la matriz mitocondrial para degradarlos mediante la b-oxidación^{169,170}.

- Membrana interna

La membrana interna esquizá la parte más interesante de la mitocondria, ya que en ella se encuentra la cadena de transporte electrónico mitocondrial, el complejo responsable de la generación de la energía en forma de ATP necesaria para los procesos vitales en las células. La forma una membrana que forma pliegues dentro de la matriz mitocondrial llamados crestas mitocondriales, lo que sirve para aumentar la superficie de la membrana y así poder albergar un mayor número de enzimas. Es muy selectiva al paso de sustancias al interior de la matriz, ya que no contiene poros como en el caso de la membrana externa, sino que las sustancias que pasan lo hacen mediante transportadores específicos. Las enzimas que se encuentran en la membrana interna mitocondrial son las propias de la cadena de transporte electrónico NADH deshidrogenasa (complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), complejo citocromo bc₁ (complejo III), citocromo c oxidasa (complejo IV) y ATP sintasa, aunque también podemos encontrar otras enzimas como el ya comentado AIF, succinato deshidrogenasa, β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa o carnitina ácido graso aciltransferasa. Posee una elevada concentración de cardiolipina, factor clave en la producción de ERO por parte de la doxorubicina¹⁶⁹.

- Matriz mitocondrial

Aquí se encuentran las enzimas típicas del ciclo de Krebs y del ciclo de oxidación de los ácidos grasos, ya que es aquí donde se producen estas reacciones. También posee ribosomas y enzimas relacionadas con la síntesis proteica, ya que los productos del ADNm son sintetizados aquí. Ejemplos de estas enzimas son: fumarasa, aconitasa, citrato sintasa, enzimas de la β-oxidación...etc¹⁶⁹.

- ADN

El ADNm es un ADN distinto del nuclear, es más pequeño y codifica diferentes proteínas. Tiene una estructura bicatenaria y circular, cerrada, sin extremos, como los genomas bacterianos. En una mitocondria puede haber de 1 a 15¹⁷⁰ genomas mitocondriales y

están en constante replicación. Contiene 16.569 pares de bases y codifica 37 genes, de los cuales 2 son ARN ribosómicos, 22 son ARN de transferencia y 13 son proteínas de la cadena de transporte electrónico. El ADNm no posee la misma estructura que el ADN nuclear, y por ejemplo, no está asociado a histonas, lo que lo deja en una situación de verdadera vulnerabilidad frente al ataque de ERO, a lo que hay que añadir que sus sistemas de defensa y reparación son también menores que los del ADN nuclear, así que la tasa de mutación es 10 veces mayor que las del ADN nuclear¹⁶⁹.

2.2.8. CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL

La cadena de transporte electrónico mitocondrial consta de 4 complejos proteicos como ya hemos mencionado antes (complejos I, II, III y IV), localizados en la membrana interna mitocondrial (figura 15). La función de cada uno de estos complejos es la de transportar electrones desde un equivalente de NADH o flavin adenin dinucleótido (FADH₂) hasta una molécula de O₂, produciendo una molécula de H₂O. Durante este transporte de electrones, los complejos bombean H⁺ desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana, generando un gradiente de pH y electroquímico. En presencia de ADP, la ATP sintasa bombea H⁺ desde el espacio intermembrana hasta la matriz mitocondrial de nuevo y la energía producida durante este proceso de bombeo se usa para formar ATP¹⁶⁹. El proceso detallado es el siguiente:

- Complejo I

El NADH es oxidado a NAD⁺, reduciendo flavin mononucleótido (FMN) a flavin mononucleótido reducido (FMNH₂). Los 2 electrones implicados en el proceso van a un transportador de la cadena de transporte electrónico, la ubiquinona, que difunde por la membrana hacia el complejo III para transportarle estos 2 electrones. En el proceso han difundido 4 H⁺ hasta el espacio intermembrana^{169, 172}.

- Complejo II

El complejo II no es una bomba de protones. Lo que hace es transferir electrones desde el succinato a la ubiquinona^{169, 173}.

Introducción

- Complejo III

El complejo III recibe los 2 electrones de la ubiquinona y los transfiere a 2 moléculas de citocromo c, que difundirán como antes hizo la ubiquinona hacia el complejo III, pero ahora hasta el complejo IV. En el proceso bombea 2 H⁺ al espacio intermembrana^{169, 174}.

- Complejo IV

El complejo IV recibe los 4 electrones desde los citocromos c y los transfiere a una molécula de O₂, produciendo 2 moléculas de H₂O. También bombea 4 H⁺ al espacio intermembrana^{169, 175}.

- ATP sintasa

La ATP sintasa es el paso final en la cadena de transporte electrónico. Utiliza el gradiente generado de H⁺ para conseguir energía y formar ATP a partir de ADP^{169, 176}.

Introducción

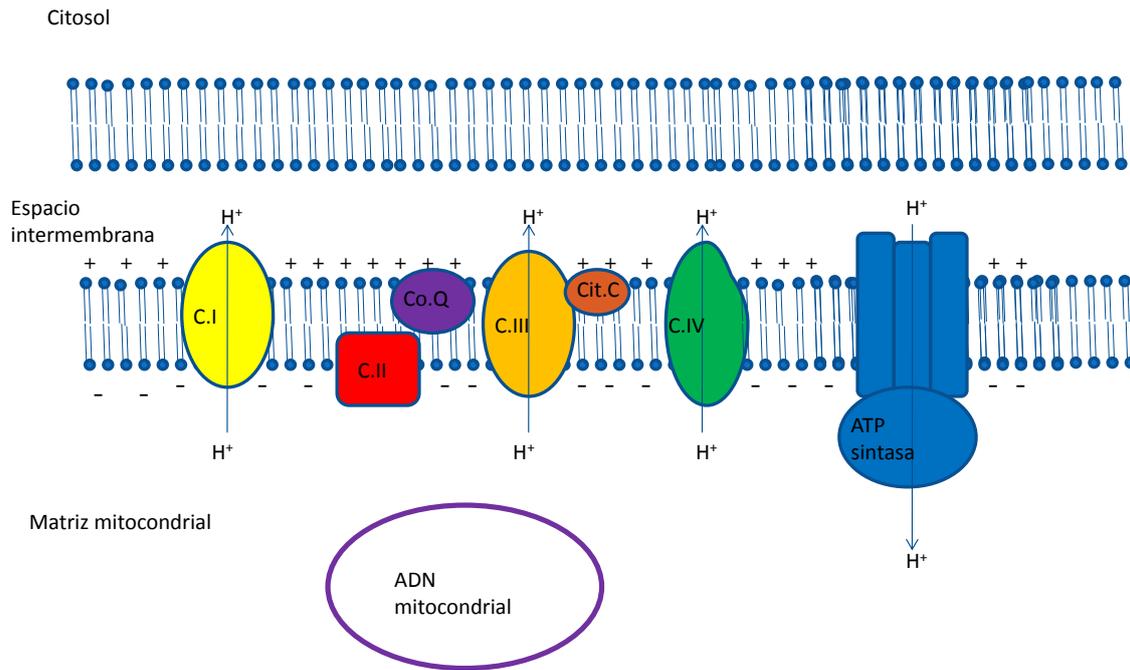


Figura 15. Esquema de los diferentes componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y de la fosforilación oxidativa. A medida que se transfieren electrones desde el complejo I y complejo II hasta el complejo III y complejo IV, se va produciendo un bombeo de H^+ desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana. El gradiente de pH y electroquímico creado en el espacio intermembrana sirve para que la ATP sintasa use la energía que se produce del paso de los H^+ al volver a la matriz mitocondrial para producir ATP a partir de ADP.

2.2.9. PAPEL DE LA DOXORUBICINA EN LA MITOCONDRIA

Como ya se ha mencionado antes, en la membrana interna de la mitocondria es donde se encuentran los componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (complejos I, II, III, IV y ATP sintasa). La membrana interna es rica en cardiolipina, un fosfolípido muy importante en la formación de los distintos complejos mitocondriales y de la membrana interna de la mitocondria. Tiene gran afinidad por la doxorubicina, con la que forma complejos¹⁷⁷⁻¹⁷⁹, acumulándose de esta manera la doxorubicina en la mitocondria¹⁸⁰ y además provocando un posible colapso de la actividad de la cadena de transporte electrónico mitocondrial¹⁸¹.

Por lo tanto, la proximidad de la doxorubicina acumulada en la membrana interna al complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial hace que sea muy probable que se produzca el ciclo de oxidoreducción de la doxorubicina. De este modo se producen ERO que dañan proteínas, lípidos, carbohidratos, membrana mitocondrial, la propia cadena de transporte electrónico y el ADNm. De hecho, se sabe que la cantidad de daño en el ADNm es el doble que el daño del ADN nuclear (medido como residuos de 8-hidroxideoxiguanosina) en

Introducción

pacientes tratados con doxorubicina¹²⁸. Al parecer el tipo de daño depende de la concentración, así, a concentraciones bajas de doxorubicina, el daño que se produce es de tipo oxidativo, mientras que a elevadas concentraciones, el daño es mediante unión a cardiolipina, evitando así la síntesis y/o correcta función de los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial¹⁸².

Otro de los efectos que puede causar la doxorubicina sobre la mitocondria son cambios en la estructura y permeabilidad de la membrana. En la membrana mitocondrial se encuentran complejos proteicos que actúan como poros para el paso de sustancias, de entre los cuales destaca el poro de transición permeable mitocondrial (TPM)¹⁸³. Este poro está formado por varias partes: translocador de adenina en la membrana interna, canal iónico voltaje dependiente en la membrana externa y ciclofilina en la matriz. El poro participa en la regulación de Calcio¹⁸⁴, pH, potencial transmembrana y volumen mitocondrial. Son muchos los estímulos que provocan la apertura del canal, como por ejemplo la concentración de calcio celular, activación de p53, caspasas recombinantes, el producto del gen Bax (proteína pro apoptótica) y también ERO, como las provocadas por la presencia de doxorubicina en la mitocondria.

Durante la apoptosis, el potencial transmembrana de la membrana interna mitocondrial se altera, y posteriormente se activan caspasas y endonucleasas en el citoplasma, que son las responsables finales de la apoptosis¹⁸⁵. Esta alteración del potencial transmembrana se puede evitar mediante el empleo de agentes inhibidores de este canal o poro¹⁸⁶. Este poro es un elemento clave en la apoptosis producida por la sobrecarga de calcio en la mitocondria, ya que su apertura por los estímulos que genera la doxorubicina como ya hemos visto antes, provoca que entre una cantidad de calcio desmesurada a la mitocondria y que empiece el proceso de apoptosis.

Bajo condiciones de estrés oxidativo como la que aparece con la administración de doxorubicina, aumenta la cantidad de este complejo proteico, por lo tanto, aumentando la permeabilidad de la mitocondria, lo que alterará la homeostasis interna, provocando un incorrecto funcionamiento de la mitocondria. Al aumentar la cantidad de poros abiertos, se producirá un aumento del volumen de la matriz mitocondrial y una alteración del tamaño de la membrana externa. Es más, este poro se encarga del paso de citocromo c y otros factores apoptóticos al citoplasma, produciendo la liberación de citocromo c¹⁰⁴ y AIF¹⁸⁷ al citosol. La liberación de citocromo c alterará el funcionamiento de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, produciéndose una elevada cantidad de ERO y disminuyendo la generación de

Introducción

ATP, provocando la muerte de la célula sin necesidad de que actúen caspasas, aunque normalmente su funcionamiento es mediante la activación de caspasas.

Desde la mitocondria, al producirse la apertura del poro de transición mitocondrial, se liberan 2 grupos de enzimas. El citocromo c y la proteína smac/DIABLO pertenecen al primer grupo en la clasificación de proteínas liberadas por la mitocondria debido a la apertura del poro de transición mitocondrial. El modo de actuación es: mediante liberación de citocromo c, se induce la oligomerización de la proteína Apaf-1, que activa a la caspasa 9. Se forma el apoptosoma (formado por citocromo c, Apaf-1 y caspasa 9) que finalmente activa las caspasas 3,¹⁰⁴ 6 y 7, las encargadas de producir la fragmentación del ADN que darán lugar a la apoptosis. Smac/DIABLO se une a unas proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) y las desactiva, con lo cual ya no se inhibe la apoptosis y la célula muere¹⁸⁸.

El segundo grupo de proteínas que se liberan de la mitocondria son AIF y endonucleasa G. Estas 2 proteínas se liberan cuando ya está instaurado el proceso de apoptosis. AIF se transloca al núcleo y promueve la fragmentación del ADN. Tanto AIF como endonucleasa G actúan de manera independiente a caspasas. La decisión de apoptosis se produce cuando todo este proceso es ya irreversible¹⁸⁹. Las consecuencias de la producción de ERO sobre la mitocondria se resumen en la figura 16.

Consecuencias de la producción de ERO sobre la mitocondria



- La producción de ERO aumentará la permeabilidad del TPM.
- Esto provocará la liberación de citocromo c, smac/DIABLO y AIF al citosol.
- Disminuirá la producción de ATP, comprometiendo la viabilidad celular.
- Citocromo c activará caspasas 3 y 7 que fragmentarán el ADN.
- Smac/DIABLO desactiva proteínas inhibidoras de apoptosis, produciendo apoptosis.
- AIF promueve la fragmentación del ADN independientemente de caspasas.

Figura 16. Consecuencias de la producción de ROS sobre la mitocondria.

Sería lógico pensar que al retirar el tratamiento con doxorubicina, cesasen los efectos adversos, pero no ocurre esto, y los efectos secundarios perduran incluso sin la presencia del fármaco. Esto no se puede deber ya a la producción de ERO por la doxorubicina ni a la síntesis defectuosa de los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial debido a la unión de doxorubicina a cardiolipina. La hipótesis que se plantea es la presencia de un daño oxidativo en el ADNm debido a la acción anterior de las ERO durante el tratamiento, sumado al daño ya producido sobre el global del tejido cardíaco durante el tratamiento. La producción de ERO y el daño que ha producido la doxorubicina en el ADNm durante el tratamiento ha producido mutaciones que ahora producen todo tipo de disfunciones en el funcionamiento de la mitocondria.

Por lo tanto, el fallo mitocondrial supone un déficit en la producción energética de la mitocondria¹⁹⁰, que compromete las funciones celulares, produciendo un fallo que da lugar a la apoptosis del cardiomiocito, ya que ante la falta de ATP para realizar las funciones celulares, la célula entra en apoptosis.

Cuando el problema comienza a darse en un número elevado de cardiomiocitos, se empezaran a producir fallos de funcionamiento en el corazón y se puede llegar a padecer una cardiomiopatía.

2.3. ACEITE DE OLIVA E HIDROXITIRO SOL

El aceite de oliva se extrae del fruto del olivo (*Olea europea*) mediante extracción mecánica. Se compone de dos partes: fracción saponificable, que representa un 90-99% del extracto, y fracción insaponificable, que lo forma el 0,4-5% del extracto. El 70-80% de la fracción saponificable es ácido oleico (18: 1n-9), alrededor de un 11,5 % es ácido palmítico (16:0), un 7,5 % es linoléico u omega-6 (18:2) y otros ácidos en concentración de trazas. Los efectos beneficiosos del aceite de oliva no sólo se deben a su alta relación entre ácidos grasos insaturados y saturados, sino que una parte fundamental son los compuestos fenólicos que se encuentran en la fracción insaponificable.

Hay 4 tipos de aceite de oliva para uso comercial, atendiendo a su grado de refinamiento posterior a la extracción:

- **Aceite de oliva virgen extra.** Se extrae mediante prensado de la aceituna en frío, sin tratamientos químicos y con una acidez no superior al 0,8 %.
- **Aceite de oliva virgen.** Con un grado de acidez menor del 2 %.
- **Aceite de oliva.** Se trata de una mezcla de aceite de oliva virgen y aceite de oliva refinado, con una acidez no superior al 1,5 %.
- **Aceite de orujo de oliva.** Se extrae del orujo (masa restante después de la molturación de la aceituna) usando disolventes químicos y se mezcla con cierta cantidad de aceite de oliva¹⁹¹.

Este estudio se basa en el empleo del hidroxitirosol, un compuesto de la fracción fenólica presente en el aceite de oliva virgen extra. Este aceite posee la mayor concentración de compuestos fenólicos (figura 17) de entre las 4 categorías de aceites de oliva.

El ácido oléico, principal ácido graso del aceite de oliva pero también se encuentra en grasas animales (30 - 55 %) y en otros aceites de semillas (25 – 75 %). Ha sido objeto de estudio durante años, ya que es uno de los compuestos más ingeridos en la dieta de los países Mediterráneos, donde la incidencia de cáncer y enfermedades cardiovasculares es menor. Durante mucho tiempo se le han atribuido las propiedades beneficiosas que posee el aceite de oliva sobre la salud principalmente sobre estas 2 enfermedades: cáncer y enfermedad cardiovascular¹⁹². Los efectos del ácido oléico sobre los niveles de colesterol, LDL y lipoproteínas de alta densidad (HDL) se han estudiado, existiendo controversia sobre si es capaz de disminuir el colesterol¹⁹³, disminuir las LDL¹⁹⁴ y de aumentar la concentración de HDL en comparación con otros tipos de grasas poliinsaturadas¹⁹⁵.

Introducción

Actualmente, se sabe que en realidad los responsables de estas propiedades son los compuestos minoritarios del aceite de oliva. Alrededor del 30 % de la fracción insaponificable la componen tirosol, hidroxitirosol y sus secoiridoides¹⁹⁶.

Estos compuestos poseen varias propiedades interesantes y a la vez importantes sobre el desarrollo de ciertas patologías. Sus propiedades más importantes son: antioxidantes, antitumorales, antiinflamatorias, hipolipemiantes, antiagregantes y antimicrobianas¹⁹⁷.

Entre los compuestos presentes en la fracción insaponificable del aceite de oliva tenemos^{198, 199}:

- **Fenoles ácidos** como ácido gálico, vanílico, cinámico o caféico.
- **Fenoles simples** como hidroxitirosol o tirosol.
- **Secoiridoides** como oleuropeína o su forma aglicona, ligtrosidos y su forma aglicona.

En este grupo tenemos como compuesto más representativo a la oleuropeína, un éster del 2-(3,4-dihidroxifenil etanol) o hidroxitirosol. Es uno de los compuestos del aceite de oliva más estudiados por sus numerosas propiedades beneficiosas como antioxidante, antiinflamatorio, antiaterogénico, anticancerígeno, antiviral, antimicrobiano, antienvjecimiento y protector dérmico. Estas propiedades son compartidas por el hidroxitirosol, ya que este último deriva de la hidrólisis de la oleuropeína.

Su acción antioxidante se pone de manifiesto ya que inhibe fuertemente y de manera dosis dependiente la oxidación de las LDL. Además, es capaz de secuestrar moléculas de NO y de incrementar la expresión de óxido nítrico sintasa inducible²⁰⁰.

La capacidad antitumoral la consigue induciendo apoptosis en células tumorales. Las líneas tumorales SKBR3 que sobreexpresaban HER2 fueron más sensibles a esta acción antitumoral²⁰¹, aunque la inhibición del ciclo celular en la fase G₁-S y apoptosis también se produjo en líneas celulares MCF-7 que no sobreexpresaban este receptor²⁰².

También es antiinflamatorio, como demuestran algunos estudios en los que la oleuropeína era capaz de disminuir la producción de interleucina 1 β (IL-1 β) *in vitro*²⁰³ u otros estudios en los que se inhibía la 5-lipooxigenasa en leucocitos, encargada de producir moléculas proinflamatorias como leucotrienos B₄²⁰⁴.

- **Lignan**os como (+)-1-pinoresinol o (+)-1-acetoxipinoresinol.

Introducción

Los lignanos son fitoestrógenos, junto con los isoflavonoides y los cumestanos. Se encuentran en la mayoría de los vegetales.

Su actividad antioxidante, 5 veces mayor que la de la vitamina E, se ha demostrado por su capacidad para secuestrar radicales libres y por la inhibición que produce de la peroxidación del ácido linoléico^{205, 206}.

Su estructura molecular es muy parecida a la de los estrógenos y los estudios realizados sobre ellos revelan que pueden ejercer un papel preventivo frente al cáncer mediante una serie de propiedades como antiestrogénicas, antiangiogénicas, antioxidantes y proapoptóticas. Su acción sobre los estrógenos puede ocurrir de varias maneras como así apuntan diversos estudios. Una de estas maneras es la de antagonizar a los estrógenos en el organismo debido a su parecido estructural, así como inhibir enzimas involucradas en la síntesis de esteroides como la aromatasas, 5- α -reductasa o la 17- β -hidroxisteroide deshidrogenasa²⁰⁷. Además, podrían producir una disminución de los niveles de estrógenos²⁰⁸ o de la expresión de receptores estrogénicos ER- α y ER- β ²⁰⁹.

También tienen actividad proapoptótica ya que son capaces de inhibir a Bcl-2 y activar caspasas 3, 8 y a c-myc²¹⁰ en líneas celulares de cáncer. En estudios *in vivo*, los lignanos fueron capaces de disminuir el tamaño²¹¹, la multiplicidad del tumor y su tasa de crecimiento^{212, 213}.

- **Flavonoides** como apigenina o luteolina.

En general, estos compuestos poseen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antialérgicas, hepatoprotector, antitrombótico, antiviral y anticarcinogénico

La capacidad antioxidante está demostrada por su capacidad para inhibir la liberación de ERO desde los neutrófilos, inhibir la peroxidación lipídica tanto enzimática como no enzimática, secuestrar radicales libres^{214, 215}.

Sus propiedades antiinflamatorias vienen dadas por la capacidad de actuar sobre enzimas encargadas de la generación de la respuesta inmune, como la tirosin o serin treonin quinasas^{216, 217}, inhibición de las vías de señalización de NF- κ β y la disminución de la expresión de marcadores proinflamatorios como eicosanoides, NO, moléculas de adhesión o citoquinas²¹⁸.

Introducción

Sus propiedades antitumorales vienen determinadas por un mecanismo parecido al que ya hemos comentado antes en los lignanos, la unión a receptores ER tipo II tanto citosólicos como nucleares²¹⁹ y la inhibición de los receptores del factor de crecimiento epidérmico^{220, 221}.

Principales compuestos fenólicos del aceite de oliva

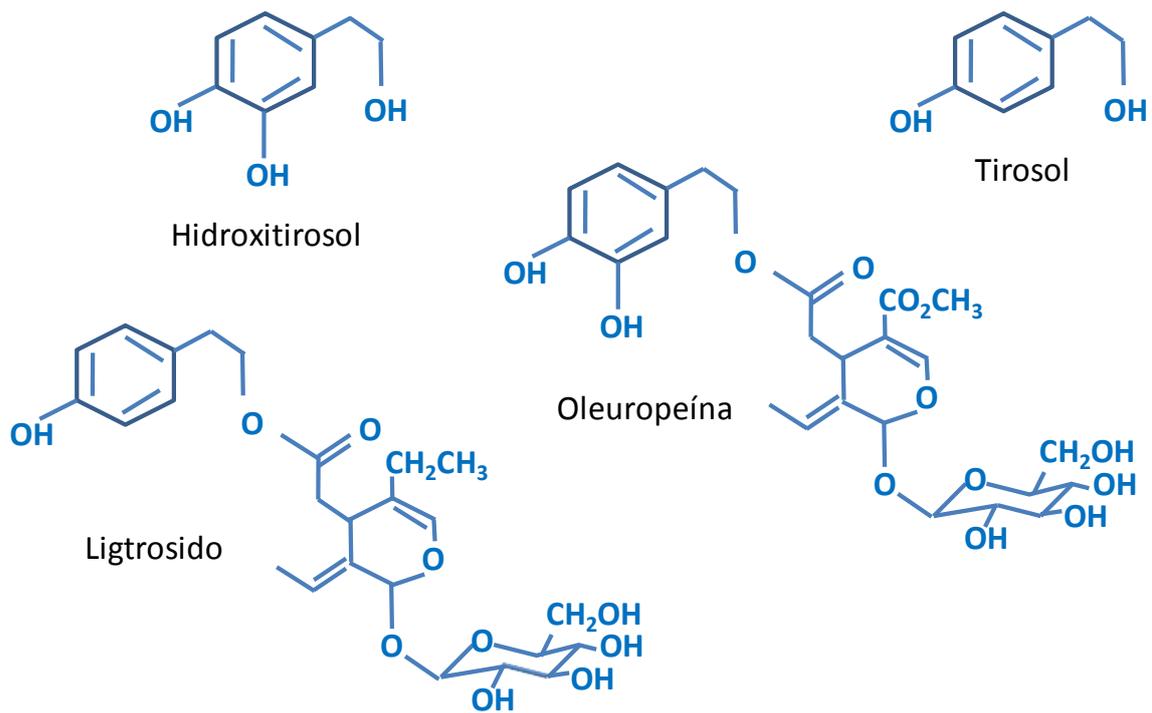


Figura 17. Principales compuestos fenólicos del aceite de oliva.

La concentración de los compuestos fenólicos del aceite de oliva es mayor en la hoja que en el aceite²²²⁻²²⁴.

Tabla 4. Concentración de los principales compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen extra²²²⁻²²⁴.

<i>Componente fenólico en aceite</i>	<i>Concentración (mg/kg)</i>
<i>Hidroxitirosol</i>	14,42 ± 3,01
<i>Oleuropeína</i>	2,04 ± 0,78
<i>Oleuropeínaaglicona</i>	14,42 ± 3,01
<i>Tirosol</i>	27,45 ± 4,05
<i>Apigenina</i>	15,80 ± 4,51

Tabla 5. Concentración de los principales compuestos fenólicos de la hoja del olivo²²²⁻²²⁴.

<i>Componente fenólico en hoja</i>	<i>Concentración (mg/kg)</i>
<i>Hidroxitirosol</i>	219 ± 3
<i>Oleuropeína</i>	2231 ± 52
<i>Dimetil oleuropeína</i>	984 ± 47
<i>Verbascosido</i>	27,45 ± 4,05
<i>Rutina</i>	15,80 ± 4,51
<i>Luteolina 7-o-glucosido</i>	15,80 ± 4,51

Evidentemente, la concentración de cada compuesto tanto en la hoja como en el aceite varía dependiendo del tipo de aceituna, maduración, condiciones de crecimiento y cultivo...etc.

Otro importante compuesto del aceite de oliva es el escualeno. Aproximadamente el 0,7 % de la composición del aceite de oliva es escualeno²²⁵, un hidrocarburo del grupo de los triterpenos que contiene seis unidades de isopreno. Esta elevada concentración de escualeno es única en el aceite de oliva, ya que la media en otros alimentos suele ser del rango de 0,002 % a 0,03 %²²⁶. Esta molécula es capaz e inhibir a la β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa), una enzima clave en la síntesis del colesterol²²⁷. Además de reducir los niveles de colesterol, se le atribuyen otros efectos antitumorales, ya que produciría una

translocación del oncogen *ras*, disminuyendo la probabilidad de padecer cáncer de mama, de colon y de páncreas²²⁸.

2.3.1. ACEITE DE OLIVA, ATEROSCLEROSIS Y ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

La enfermedad cardiovascular se considera como un grupo de condiciones multifactoriales asociadas con aterosclerosis, hipertensión y trombosis. Estas patologías dependen de factores tanto genéticos como ambientales (dieta rica en grasa, tabaquismo y falta de ejercicio).

La aterosclerosis es una enfermedad que se manifiesta clínicamente en las fases finales de su desarrollo, y se produce por la repetición de lesiones mediante agentes químicos, físicos o microbianos. Los más importantes son el colesterol asociado a LDL, que se oxidan en la superficie endotelial, produciendo LDL oxidadas²²⁹⁻²³¹.

El proceso de aterosclerosis comienza con la acumulación de LDL en el tejido sub endotelial arterial²³². Esta acumulación de LDL y el propio endotelio por reacción frente a las LDL van a activar una respuesta inflamatoria que conlleva la liberación de citoquinas como la proteína quimiotáctica monocítica 1 (MCP-1) y otras que provocarán la llegada de monocitos y linfocitos T al lugar de la lesión²³³. Para permitir la adhesión de los monocitos al endotelio, se expresará VCAM-1 y moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) y para ayudar a la motilidad se segregaran interleucinas, factor de necrosis tumoral α (TNF α), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y moléculas de adhesión plaquetaria entre otras²³⁴⁻²³⁶.

Una vez en el endotelio, los monocitos se transforman en macrófagos y fagocitan las LDL, convirtiéndose en células espumosas, cuya acumulación produce estrías de grasa hasta que se siguen acumulando para formar la placa de ateroma. Las células espumosas se forman por un trastorno en el mecanismo que regula la ingesta, metabolismo y excreción del colesterol en los macrófagos^{234, 235}. Las LDL oxidadas son mucho más susceptibles de ser fagocitadas por los macrófagos, ya que los receptores que poseen estas células en su superficie, como el receptor SR-A, CD36 o el receptor *scavenger* para fosfatidil serina y LDL oxidadas (SR-PSOX), reconocen con mayor afinidad a las LDL oxidadas. Lo que hace que los macrófagos fagociten las LDL y se conviertan en células espumosas es la presencia de determinadas citoquinas en el medio, liberadas por células T. El interferón γ (IFN- γ) es una de

Introducción

estas citoquinas que aumenta la captación de LDL oxidadas, la expresión de los receptores SR-A y SR-PSOX^{237, 238}, reducen la excreción de colesterol^{239, 240} y promueve la acumulación de productos derivados del metabolismo del colesterol por parte de los macrófagos²⁴¹. Otras citoquinas que también promueven la formación de células espumosas son la IL-1 β , TNF- α , MIF, LIGHT, TWEAK y TL1A. El depósito de estas células en la pared arterial, producirá una disminución de la función endotelial, disminuyendo la producción de óxido nítrico y provocando una pérdida de la capacidad vasorrelajante, seguido de la producción de sustancias protrombóticas, proinflamatorias, proliferativas y oxidantes^{242, 243}.

Las estrías formadas se irán recubriendo de células endoteliales, colágeno y elastina²⁴⁴. Una vez que la placa está formada, existe el riesgo de que se rompa y se produzca una trombosis que bloquee el flujo sanguíneo a través de la arteria, lo que provocará una isquemia en los tejidos afectados, pudiendo producirse un infarto si se afecta al flujo sanguíneo del miocardio^{232, 245}.

El aceite de oliva es uno de los principales componentes de la dieta de los países mediterráneos²⁴⁶, y la principal fuente de grasa²⁴⁷. Históricamente, los estudios, tanto de casos control, como de cohortes, epidemiológicos, con animales de experimentación e *in vitro*, han demostrado que la incidencia de cáncer, aterosclerosis, enfermedad cardiovascular y enfermedades neurodegenerativas es menor que en el resto de Europa y Estados Unidos. Esta menor tasa de aparición de estas enfermedades puede deberse al elevado consumo de aceite de oliva que se produce en estos países, debido a la especial composición del aceite de oliva, rico en ácidos grasos monoinsaturados²⁴⁸, y a la actividad antioxidante de sus compuestos fenólicos, los principales, oleuropeína e hidroxitirosol¹⁹⁷. Ochoa y col.²⁴⁹ describen la importancia de las fracciones saponificables e insaponificables del aceite de oliva virgen sobre la peroxidación lipídica en mitocondrias de conejos.

Como excepción a los países del área mediterránea, Japón es el país con menor tasa de mortalidad por enfermedades cardiovasculares²⁵⁰. Esto puede deberse a la elevada cantidad de aceite de pescado que se consume en Japón, que es rico en ácidos grasos omega-3, con actividad protectora frente a enfermedades cardiovasculares.

Por lo visto anteriormente, una de las piezas clave en el desarrollo de la aterosclerosis es la oxidación de las LDL. Está comprobado que la inclusión de una dieta rica en aceite de oliva, como en la dieta mediterránea, reduce la susceptibilidad de las LDL a oxidarse, con lo cual serán menos propensas a depositarse sobre el endotelio vascular y se evitará la formación de la placa de ateroma²⁵¹⁻²⁵³ (figura 18). Los ensayos realizados con aceite de oliva frente a

Introducción

aceite de girasol mostraron una mayor resistencia a la oxidación de las LDL por parte de los animales alimentados con aceite de oliva²⁵⁴. Entre los diferentes tipos de ácidos grasos poliinsaturados (omega 3 o linolénico y omega 6 o linoléico) frente al ácido oléico, se demostró que la mayor susceptibilidad de las LDL a oxidarse se encontraba en el grupo omega 3²⁵⁵. También se produce una disminución de la cantidad de LDL, colesterol, triglicéridos y aumenta la cantidad de lipoproteínas de alta densidad o HDL, que son las que se van a ir depositando sobre el endotelio vascular para formar la placa de ateroma.

Incluso la actividad de enzimas antioxidantes también mejora con la ingesta de aceite de oliva, como demostraron Fitó y col²⁵⁶. tras la administración de una dosis diaria de 25 ml de aceite de oliva durante una semana, la actividad de la enzima glutathion reductasa (GR) aumentaba²⁵⁷.

La mejora del estado del endotelio vascular también es importante a la hora de evitar el desarrollo de la aterosclerosis, ya que en una situación de daño al endotelio como se ha explicado anteriormente, se liberan factores pro-coagulantes y fibrinolíticos. La ingesta de aceite de oliva también mejora el perfil hemostático volviéndolo mucho menos trombogénico²⁵⁸.

Se ha visto como en estos estudios realizados con diferentes tipos de aceites, el aceite de oliva reducía la susceptibilidad de las LDL a oxidarse. Históricamente, se ha atribuido el efecto cardioprotector del aceite de oliva a la cantidad de ácido oleico que contiene. Si esto fuese totalmente cierto, en países como Estados Unidos en los que los niveles de consumo de ácido oleico son similares a los de España, ya que el ácido oleico también se encuentra en otros alimentos como carnes de cerdo o pollo, no habría un índice de enfermedades cardiovasculares tan alto. Es por eso que estos efectos beneficiosos se atribuyen actualmente más a los compuestos fenólicos que al ácido oleico presente en el aceite de oliva^{196, 259-261}.

Aceite de oliva y aterosclerosis 

- *La oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) es clave para la formación de la placa de ateroma.*
- *El aceite de oliva posee una alta capacidad antioxidante, capaz de disminuir la oxidación de las LDL, reduciendo así el riesgo de desarrollar aterosclerosis.*

Figura 18. Aceite de oliva como antioxidante.

2.3.2. ACEITE DE OLIVA Y ANTIOXIDANTES

La capacidad antioxidante del aceite de oliva es quizá la propiedad más importante a la hora de ejercer un papel cardioprotector, acción antiinflamatoria o acción antiagregante. Numerosos estudios verifican hoy en día la capacidad antioxidante de los compuestos minoritarios del aceite de oliva que componen la fracción insaponificable^{196, 260, 262, 263}. En materia de acción antitumoral, los beneficios que se atribuyen al aceite de oliva vienen dados por efectos sobre activación o represión génica e interacción con las rutas de señalización proliferativas de la célula que poseen los distintos componentes minoritarios del aceite de oliva^{264, 265}. Esto no excluye a la capacidad antioxidante de producir beneficios en cuanto a la acción antitumoral ni a la represión o activación génica en cuanto a la acción cardioprotectora, antiinflamatoria o antiagregante²⁶⁶.

Como ya se comentó anteriormente, las ERO que se producen como intermediarios en los procesos de oxidación-reducción del O₂ para formar H₂O. Juegan un papel muy importante en multitud de procesos biológicos, actuando tanto como segundos mensajeros como moléculas capaces de dañar a las propias estructuras del organismo. La generación de altas tasas de ERO debido a un desequilibrio en el estado redox, es perjudicial, ya que se producirán fallos en los procesos biológicos, alteraciones del funcionamiento de orgánulos como la mitocondria, daños en el material genético, aumento de la permeabilidad de membranas, oxidación de sustancias necesarias para determinados procesos y un largo etcétera que entra

Introducción

dentro del campo de estudio del estrés oxidativo (figura 19). Es por tanto primordial mantener el equilibrio entre ERO y capacidad antioxidante para que no se produzcan fallos en todos estos procesos. Entre las enzimas antioxidantes más destacadas están la SOD, GPx o catalasa. Como moléculas antioxidantes no enzimáticas tenemos: el ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), GSH, carotenoides, flavonoides y otros antioxidantes²²¹.

Aun así, el factor nutricional es importante por el aporte de numerosos compuestos antioxidantes a nuestro organismo, que de otra manera, no podríamos sintetizar endógenamente o producir en cantidad suficiente. Como ejemplos de alimentos que nos ayudan a conseguir un correcto aporte de antioxidantes tenemos los polifenoles del té, café, soja, chocolate, vino tinto; vitamina C y carotenoides de frutas y vegetales o la vitamina E de aceites vegetales.

Es muy importante evitar la aparición de estados de estrés oxidativo producidos por un mayor aumento de ERO o una disminución de sustancias o enzimas antioxidantes. Los compuestos fenólicos del aceite de oliva son capaces de restaurar el equilibrio redox mediante la inactivación de radicales libres, preservando el contenido intracelular de GSH y también disminuyendo la producción de anión superóxido²⁶⁷⁻²⁷⁰. Es importante que, al neutralizar directamente a los radicales libres formados, se preserve la cantidad de enzimas antioxidantes del organismo como el caso del GSH. Algunos estudios sugieren que prevenir la reducción de los niveles de GSH favorece la actividad de enzimas relacionadas como GPx y GR, ya que la GPx es necesaria para la eliminación de hidroperóxidos, pero se requiere la participación de GSH que necesita a la GR para regenerarse²⁷¹.

Se ha comprobado que el aceite de oliva disminuye los niveles de daño oxidativo en el organismo. Ciertos parámetros perjudiciales como la oxidación de LDL, MDA²⁷², oxidación del ADN, ERO o glutatión oxidado (GSSG) disminuyen mientras que otros parámetros beneficiosos como HDL, GSH-Px y la capacidad antioxidante plasmática aumentan con la ingestión periódica de aceite de oliva²⁷³. Esta capacidad antioxidante del aceite de oliva se debe a que los compuestos fenólicos que posee son capaces de actuar como agentes quelantes, evitando la oxidación producida por especies metálicas o por ERO^{272, 274}.

Numerosos estudios han determinado que los compuestos fenólicos del aceite de oliva, como el hidroxitirosol, son capaces de disminuir la producción de ERO en células HepG2, prevenir la reducción de los niveles de GSH y el aumento de MDAL tras la inducción de una situación de estrés oxidativo en estas líneas celulares²⁷⁵. También se ha visto que el tirosol, escualeno y β -xítosterol modulan la producción de ERO, ácido araquidónico y eicosanoides en

Introducción

macrófagos en murinos. El escualeno y el tirosol son capaces de inhibir la producción de O_2^{*-} y de H_2O_2 , actuando preferentemente el tirosol sobre la producción de O_2^{*-} del sistema xantina/xantina oxidasa. El β -xitosterol y el tirosol también fueron capaces de evitar la liberación de ácido araquidónico conjuntamente con la reducción de la producción de ERO. Este dato nos señala que la liberación de ácido araquidónico tiene relación con la producción de ERO²⁷⁶. En procesos inflamatorios, los neutrófilos segregan potentes sustancias oxidantes como el ácido hipocloroso (HOCl) además de ERO. El HOCl puede activar colagenasas, reducir los niveles de vitaminas antioxidantes como el ácido ascórbico, inactivar enzimas antioxidantes u oxidar a las LDL. Tanto el hidroxitirosol como la oleuropeína fueron capaces de reducir su producción y de proteger a la catalasa frente a la inhibición producida por el HOCl²⁷⁷.

Además, se ha estudiado el aumento que se produce en la capacidad antioxidante del plasma y el descenso de la producción de tromboxano B_2 (Tx B_2) y leucotrieno B_4 (LTB $_4$) después de consumir aceite de oliva, esto último reduce la activación de agregación plaquetaria, previniendo así la formación de trombos²⁷⁸. El daño en el ADN también se reduce gracias a la acción antioxidante de los compuestos fenólicos^{273, 279}.

Los eritrocitos también se ven beneficiados por la acción antioxidante de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. En un estudio llevado a cabo por Manna y col²⁸⁰., la incubación de eritrocitos con H_2O_2 produjo una notable hemólisis de estas células. Al realizar un pre-tratamiento con hidroxitirosol y posteriormente añadir H_2O_2 , se redujo la hemólisis de una manera dosis dependiente. Lo mismo ocurría con la lipoperoxidación de las membranas eritrocitarias y con los transportadores de membrana para glucosa y aminoácidos.

La acción antioxidante también repercute en la longevidad de los seres vivos. Estudios epidemiológicos así lo demuestran, con la esperanza de vida de los países mediterráneos mayor que la de los demás países²⁸¹.

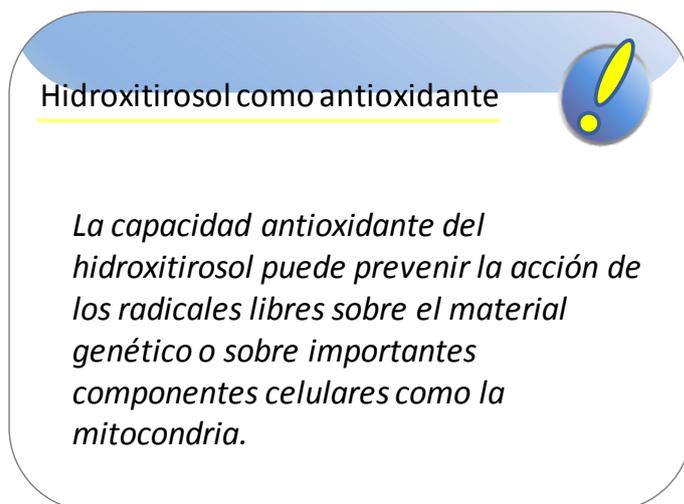


Figura 19. Hidroxitirosol como antioxidante.

2.3.3. ACEITE DE OLIVA Y CÁNCER

Un factor estrechamente ligado a la aparición de cáncer es la presencia o no de estrés oxidativo. El daño en proteínas, lípidos o ADN por la acción de radicales libres es un proceso clave que contribuye a la aparición de esta enfermedad.

Como anteriormente se describió, el aceite de oliva posee compuestos, entre los que destacan los de la fracción fenólica, con una potente acción antioxidante, capaces de prevenir la acción o formación de radicales libres que puedan dañar tanto a la célula como a su material genético²⁸². Hay pocos estudios sobre los efectos del hidroxitirosol sobre el cáncer, y menos aún *in vivo*, pero se sabe de su capacidad protectora frente al daño producido por peróxido de hidrogeno a células o ADN. Sobre hidroxitirosol y cáncer de mama hay solamente 12 artículos publicados, aunque nuestro estudio es el primero que relaciona los efectos del hidroxitirosol con el cáncer de mama en animales vivos tratados con doxorubicina²⁸³.

Estudios *in vitro* sobre células MCF-7 (línea celular de células mamarias tumorigénicas) demuestran que el hidroxitirosol a unas dosis determinadas es capaz de inhibir el crecimiento de estas células, deteniendo el ciclo de proliferación celular en la fase G₂/M mediante la reducción de la expresión de Pin1 y ciclina D1, enzimas encargadas de la promoción del ciclo celular, provocando la apoptosis de las células²⁸⁴. Además, sobre este mismo tipo de línea celular, se observó una inhibición del estradiol y de la activación de ERK1/2 que regulan el crecimiento, proliferación celular y la transición G₀/G₁ a S del ciclo celular^{283, 285}.

Introducción

La modulación de la expresión de diferentes genes es un factor importante en la relación aceite de oliva- cáncer, como ya se ha comentado anteriormente. Estudios sobre la capacidad de los compuestos minoritarios del aceite de oliva para activar o reprimir genes o rutas de transcripción dan como resultado estudios como el de Della Ragione y col²⁸⁶, usando líneas celulares HL-60 (líneas celulares de leucemia) e incubándolas con hidroxitirosol, comprobaron que aumentaba la expresión de determinados genes implicados en la regulación del proceso de proliferación celular (*egr1*, *c-jun*, *GADD45*, *RAB2*, *TGFβ* y *Fast kinase*).

En estudios realizados por nuestro grupo de investigación, además, comprobamos que en animales con cáncer de mama, el hidroxitirosol era capaz de afectar al desarrollo de los tumores. Se usaron 4 grupos de ratas distintos en el experimento. A todos se les indujo cáncer de mama mediante una dosis intragástrica de DMBA. Los grupos se dividieron en: un grupo control sin tratamiento, un grupo al que se le administró hidroxitirosol, un grupo al que se le administró doxorubicina y otro al que se le administró conjuntamente hidroxitirosol y doxorubicina. Los resultados mostraron que tanto la multiplicidad tumoral como la capacidad proliferativa disminuyeron y el volumen de los tumores fue menor en el grupo de hidroxitirosol con una eficacia similar a la de la doxorubicina²⁸⁷. Algunos de los genes sobreexpresados en este estudio fueron *CDKN2A*, *CRYAB*, *CABC1* y sobretodo *SFRP4*. Este último es muy importante a la hora de evitar la activación de la ruta de proliferación celular Wnt²⁸³.

También la oleuropeína tiene estas propiedades antitumorales, algo esperado ya que comparte estructura molecular con el hidroxitirosol. Su efecto sobre líneas celulares de cáncer de próstata dio como resultado una reducción en la viabilidad celular y necrosis de estas líneas de manera dosis dependiente²⁸⁸. Sobre líneas MCF-7, la oleuropeína fue capaz de inhibir al igual que hizo el hidroxitirosol al estradiol y la activación de ERK1/2²⁸⁵.

Otro estudio desarrollado por Hamdi y Castellon, revelaron una eliminación de los tumores de ratas tratadas únicamente con oleuropeína, así como posibles mecanismos de acción sobre las células tumorales como inhibición de la migración, invasividad y alteración de los filamentos de actina celulares²⁸⁹.

Parece que en el aceite de oliva hay varias sustancias que podrían tener efecto antitumoral además del hidroxitirosol o la oleuropeína. Anteriormente comentábamos la presencia del escualeno en una alta concentración en el aceite de oliva. Hay estudios que han determinado un posible efecto antitumoral del escualeno. Van Duuren y Goldschmidt al aplicar

Introducción

escualeno tópicamente a ratones de experimentación, demostraron que era capaz de inhibir el efecto tumoral en la piel del benzo(α)pireno²⁹⁰.

En otro estudio llevado a cabo por Murakoshi y col., el escualeno aplicado tópicamente fue capaz de inhibir el efecto promotor de cáncer de piel del 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato en ratones tratados con DMBA²⁹¹.

También en cáncer de colon y recto parece ser que es capaz de inhibir la aparición de tumores. En el estudio llevado a cabo por Newmark HL²⁹², a ratas alimentadas en su dieta con un 1 % de escualeno durante 5 días, el escualeno en plasma aumentó 20 veces. Esto provocó una inhibición del 80 % de la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa en los microsomas hepáticos. Al ser la HMG-CoA reductasa una enzima clave en la producción del colesterol, y al haberse reducido su actividad, también se reduce la cantidad de metabolitos intermediarios que hay en el proceso de producción de colesterol, como el mevalonato, geranil pirofosfato o farnesil pirofosfato (FPP). Este último compuesto es importante, ya que es capaz de donar un grupo farnesol a oncoproteínas como *ras* para que se activen^{293, 294}. A este proceso se le conoce como prenilación, y si no se produce, la oncoproteína *ras* no es capaz de translocarse a la membrana y actuar, con lo cual se está interviniendo en el proceso de replicación celular, evitando la división.

Los lignanos también poseen propiedades antitumorales. Son capaces de inhibir la proliferación en líneas celulares MCF-7 de manera dosis-dependiente. Los lignanos actúan como sustratos de enzimas altamente expresadas en células tumorales (CYP 1A1 y CYP 1B1), cuyos metabolitos inhiben la proliferación celular^{295, 296}. Esto lo hacen sin interferir en las rutas estrogénicas²⁹⁷, pero actuando también sobre la ruta Wnt/ β -catenina, disminuyendo los niveles de β -catenina mediante un incremento en su fosforilación y también de ciclina D1 al ser el gen que codifica esta quinasa uno de los objetivos transcripcionales de la β -catenina²⁹⁸.

2.3.4. HIDROXITIRO SOL

El 3,4-dihidroxifeniletanol o hidroxitirosol (figura 20) es uno de los compuestos fenólicos más importantes presentes en el aceite de oliva. A él se le atribuyen numerosas de las propiedades que posee el aceite de oliva. Se han realizado estudios tanto en cultivos celulares como en animales de experimentación, aunque el número de estos es aun, relativamente bajo.

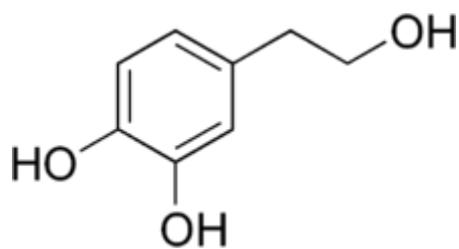


Figura 20. Estructura molecular del 3,4-dihidroxifeniletanol o hidroxitirosol.

El hidroxitirosol proviene de la hidrólisis de la oleuropeína, que se origina durante la maduración de las aceitunas en el árbol, almacenamiento del aceite o preparación de las aceitunas de mesa. Estos procesos producen oleuropeína aglicona, hidroxitirosol y ácido elenoico, siendo estos los responsables en parte de los distintos y variados aromas y sabores del aceite y de la aceituna¹⁹⁸. El aceite de oliva virgen extra es el que mayor cantidad de estos compuestos fenólicos posee, ya que no se somete a procesos de refinado como los demás tipos de aceite.

Al ser un compuesto fenólico hidrofílico, se absorbe de manera dosis dependiente en el intestino delgado y colon rápidamente mediante difusión pasiva bidireccional. Sufre un fuerte fenómeno de primer paso en el intestino e hígado, ya que aproximadamente el 98 % del hidroxitirosol presente en plasma se encuentra en su forma conjugada, principalmente como glucuroconjugado. Esto hace pensar que posiblemente el efecto antioxidante del hidroxitirosol sea gracias a sus metabolitos conjugados²⁹⁹.

Su tiempo de semivida plasmático es de 1-2 minutos y a los 5 minutos de su administración intravenosa, la mayor parte se encuentra en riñones. A las 5 horas, sólo permanece un 0.1 % de la dosis de hidroxitirosol tras una administración intravenosa. Es un compuesto que se metaboliza rápidamente, ya que 5 minutos después de su administración ya podemos encontrar derivados suyos en plasma. El metabolismo se lleva a cabo primero por los enterocitos del intestino y luego en el hígado. Autores como D'Angelo y col.³⁰⁰ proponen 3 rutas metabólicas por las cuales se metaboliza el hidroxitirosol:

- 1) Oxidación: mediante la alcohol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa, produciendo ácido dihidroxifenil acético.
- 2) Metilación: mediante la enzima catecol-O-metiltransferasa, produciendo alcohol homovanílico.

3) Metilación-oxidación: formándose como consecuencia ácido homovanílico³⁰⁰.

Además, numerosos conjugados con ácido glucurónico y sulfato se pueden detectar en plasma y orina.

Hay que tener en cuenta que el organismo también es capaz de sintetizar endógenamente el hidroxitirosol a partir del ácido dihidroxifenil acético o de la dopamina aunque no de llegar a los niveles plasmáticos que se alcanzan ingiriendo aceite de oliva. Esto puede ser la razón de por qué el hidroxitirosol tiende a acumularse en la orina.

La excreción del hidroxitirosol depende del vehículo usado al administrar el hidroxitirosol. Así, la excreción de hidroxitirosol es mayor en orina cuando se administra el hidroxitirosol en aceite de oliva que cuando se administra en un yogur bajo en grasas o que cuando el aceite se enriquece con compuestos fenólicos¹⁹⁸.

Los estudios de toxicidad que se han llevado a cabo muestran que el hidroxitirosol es prácticamente inocuo cuando se administra en grandes cantidades, ya que hay estudios en los que se les administro a ratas durante un mes una dosis diaria de extracto de pulpa de aceituna (contiene un 50 % - 70 % de hidroxitirosol) de 5 g/Kg de peso y no aparecieron efectos adversos^{301, 302}.

Propiedades del hidroxitirosol

Este compuesto posee numerosas propiedades beneficiosas. El estudio que se presenta en esta tesis doctoral va a determinar la capacidad antioxidante del hidroxitirosol, por ser posiblemente la propiedad más relevante relativa a la cardioprotección:

1) Antioxidante

Esta propiedad la ponen de manifiesto diversos estudios. El hidroxitirosol es capaz de prevenir la acción perjudicial de las ERO gracias a su capacidad para aceptar electrones desapareados, evitando así la formación de ERO. Actúa secuestrando especies moleculares como O_2^* , H_2O_2 o $HOCl$ e impidiendo su producción por parte de iones metálicos como el hierro. También es capaz de inhibir la acción de $NF-\kappa\beta$, uno de los principales productores de ERO en el organismo¹⁹⁸, y de mejorar la capacidad antioxidante enzimática del organismo³⁰³. Esto podría jugar un papel importante también en la enfermedad de Alzheimer, porque la

Introducción

producción de amiloide β en las células neuronales es una característica de esta enfermedad. El amiloide β induce una disminución de GSH y la activación de $\text{NF-}\kappa\beta$ ³⁰⁴.

En cultivos de células mononucleares de sangre periférica, el hidroxitirosol ejerció un papel importante protegiendo a estas células frente al daño oxidativo que se les indujo químicamente mediante la normalización de los niveles de enzimas antioxidantes y la disminución de los niveles de productos derivados de la lipoperoxidación o de la oxidación proteica³⁰⁵.

2) Antitumoral

Posee efecto antiproliferativo sobre las células tumorales gracias a la capacidad para detener el ciclo celular en la fase G_0/G_1 ³⁰⁶, G_2/M y provocando apoptosis en células en fase S ³⁰⁷. Efecto proapoptótico porque activa vías de apoptosis como JNK ²⁸⁶ o a $\text{p21}^{\text{WAF/Cip1}}$ y p27^{Kip1} (inhibidores del ciclo celular), citocromo c o caspasa 3.

Efecto preventivo frente a la aparición de cáncer porque inhibe la expresión de los receptores HER2 en células tumorales. Estos receptores son responsables de activar rutas de proliferación celular activadas por factores de crecimiento epidérmicos³⁰⁸. Además, la propia actividad antioxidante previene la aparición de cáncer porque evita que se produzcan daños en el material genético provocado por ERO¹⁹⁸.

3) Antimicrobial

Se han realizado ensayos en los que se ha determinado que el hidroxitirosol posee capacidad bactericida frente a *Helicobacter pylori*, aunque los resultados se han obtenido de experimentos “in vitro” y la conclusión fue que el hidroxitirosol más que eliminar al *H.pylori*, inhibía su crecimiento, por lo que es más plausible usar esta sustancia como preventivo para la aparición de *H.pylori* que como antibiótico³⁰⁹.

También posee efecto contra: *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Kluyveromycesmarxianus*, *Clostridiumperfringens*, *Streptococcusmutans*, *Shigellasonnei*, *Salmonella entérica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Haemophilusinfluenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxellacatarrhalis* y *Mycoplasmapneumoniae*^{310, 311, 312}.

4) Artritis reumatoide

La disminución de la cantidad de ERO por la acción del hidroxitirosol parece ser la causa de la mejora en los síntomas de los pacientes que padecen esta enfermedad. Se mejoran el dolor, la rigidez de las articulaciones por la mañana y la valoración general del estado de la enfermedad por parte del paciente.

Al ser una enfermedad autoinmune, constantemente se liberan moléculas pro inflamatorias en el organismo. Estas moléculas como IL-1 β o TNF α están involucradas directamente en la producción de ERO y ERN por parte de fagocitos, condrocitos, sinoviocitos...etc. Son capaces de aumentar la actividad de la óxido nítrico sintasa y la producción de ERO a través de la activación de NF- κ β y xantina oxidasa. El NO* producido, se une al O₂*⁻ y produce ONOO⁻, especie radicalaria muy reactiva. El OH⁻ es capaz de causar daños sobre moléculas de ácido hialurónico^{313, 314}, proteoglicanos³¹⁵, colágeno³¹⁶ e inhibidores de proteinasas³¹⁷. El O₂*⁻ puede alterar la estructura e integridad del colágeno^{314, 316, 318}.

El hidroxitirosol tiene la capacidad antioxidante necesaria para neutralizar estas ERO y ERN, así como para inhibir la activación de NF- κ β y xantina oxidasa, disminuyendo así el daño causado por estos radicales libres en esta enfermedad¹⁹⁸. Varios estudios así lo demuestran, donde el aceite de olive fue capaz de disminuir el riesgo de aparición de artritis reumatoide³¹⁹ y de mejorar los síntomas asociados a esta enfermedad en combinación con aceite de pescado³²⁰.

5) Antiinflamatorio

La elevada capacidad antioxidante del hidroxitirosol es la responsable de la actividad antiinflamatoria. Disminuye la cantidad de IL-1 β y de TNF α . También previene la activación de NF- κ β , factor regulador de interferón 1 (IRF1) y del transductor y activador del transcrito 1 α (STAT-1 α). La inhibición de estas moléculas y de enzimas productoras de radicales libres como la óxido nítrico sintasa (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) producirá un descenso en la generación de ERO y ERN, disminuyendo la intensidad del proceso inflamatorio³²¹. La capacidad antioxidante también protege frente al daño oxidativo causado en el ADN³²² a glóbulos blancos y rojos por ERO como H₂O₂, permitiendo un correcto funcionamiento del sistema inmune^{198, 323}.

6) Antitrombótico

Disminuye la síntesis de TxB_2 en modelos *in vitro* con plasma rico en plaquetas, probablemente por la disminución de la producción de eicosanoides derivados del ácido araquidónico³²⁴. Otros autores como Gonzalez-Correa y col. Encontraron una disminución de la síntesis de tromboxano A_2 , medido por la reducción de su metabolito el TxB_2 . Este autor sugiere que la disminución se debe a una inhibición de la actividad de la ciclooxigenasa³²⁵. La síntesis de LTB_4 en leucocitos también disminuyó debido a la inhibición de la síntesis de eicosanoides por inhibición de sus enzimas productoras, la 5 y 12-lipooxigenasa^{273,326}. La expresión de VCAM1 y de ICAM1 también se redujo con la administración de hidroxitirosol en diferentes estudios. Estas moléculas son responsables de la adhesión de diferentes tipos de células del sistema inmune al endotelio vascular^{198, 327, 328}.

7) Antiaterogénico

Anteriormente hemos visto como la oxidación de las LDL era un factor fundamental a la hora de la producción de la placa de ateroma. Al reducir la oxidación de las LDL debido a su elevada capacidad antioxidante, se reduce la posibilidad de que estas LDL oxidadas se depositen en la placa de ateroma^{267, 329, 330}. Además, un factor importante en la aparición de esta enfermedad es el perfil lipídico en sangre. La administración de hidroxitirosol mejora este perfil, produciendo tras un periodo de ingesta, una reducción de los niveles de triglicéridos y colesterol y un aumento de las HDL, todos ellos factores de riesgo involucrados en la aparición de enfermedades cardiovasculares, entre ellos, la aterogénesis^{269, 331}.

Lo anteriormente comentado acerca de la propiedad antitrombótica del hidroxitirosol también es importante a la hora de evitar el desarrollo de la placa de ateroma. El descenso de la producción de VCAM1 e ICAM1, relacionado con la inactivación de $\text{NF-}\kappa\beta$, proteína activadora-1, GATA (factor de transcripción que regula la diferenciación y maduración de linfocitos) y NAD(P)H oxidasa, previene la acumulación de macrófagos en el lugar de formación de la placa^{198, 327, 332, 333}.

8) Antiviral

Introducción

Pocos estudios hay sobre la capacidad antiviral del hidroxitirosol. Se sabe que es capaz de unirse a la proteína gp41 de la capsula viral del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), inhibiendo la fusión de la capsula viral con las células del huésped³³⁴.

También es capaz de desestabilizar las membranas de algunas cepas del virus influenza A, como las H1N1, H3N2, H5N1 y H9N2, y de disminuir su concentración de manera dosis-dependiente. Se comprobó el efecto del hidroxitirosol en otros virus no encapsulados y se observó que el hidroxitirosol no tuvo ningún efecto sobre ellos. Esto refleja que el mecanismo de acción es sobre la envoltura del virus, modificándola y perturbándola de manera que el virus no sea capaz de unirse e introducirse correctamente en la célula³³⁵.

9) Hipolipidémico

El hidroxitirosol reduce los niveles de triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL y aumenta las HDL. La reducción de las LDL puede estar provocada por una disminución de la absorción intestinal de colesterol, de su síntesis hepática o un aumento de su excreción. El aumento de HDL también es importante pues transportan colesterol hasta el hígado para ser degradado y excretado. Mantener un adecuado perfil lipídico es crucial para evitar la aparición de aterogénesis, ya que elevados niveles de lípidos en sangre están relacionados con altos niveles de peroxidación lipídica, producción de ERO y disminución de enzimas antioxidantes como SOD y catalasa, que contribuyen a un desequilibrio en el estado redox del organismo, contribuyendo a la aparición de la placa de ateroma por oxidación de las LDL^{258, 278, 331}.

10) Hipoglucémico

Este efecto hipoglucémico³³⁶ puede deberse a varias acciones ejercidas por el hidroxitirosol:

a) Protección de las células β pancreáticas frente al daño producido por estrés oxidativo y/o aumento de su regeneración³³⁷.

b) Estimulación de la liberación de insulina gracias al cierre de canales K^+ -ATP dependientes e incremento de la actividad de los canales de Ca^{2+} ³³⁷.

c) Incremento de la captación de glucosa por parte tejidos periféricos³³⁸.

d) Actuando como antioxidante ya que la generación de ERO en la diabetes puede provocar daños en hígado y riñón, agravando el estado de la enfermedad.^{337, 339}.

11) Quelante de hierro

El hidroxitirosol es capaz de formar complejos con el hierro y evitar así que se produzca la reacción de Fenton y Haber-Weiss, que daría lugar a la generación de radicales libres por parte del hierro³⁴⁰.

2.3.5. HIDROXITIRO SOL Y CARDIOPROTECCIÓN

Ramirez-Tortosa y col.³⁴¹ encontraron que el ácido oleico no es el único componente del aceite de oliva con acción antioxidante que protege frente a la formación de la placa de ateroma, uno de los principales factores de riesgo en la aparición de la enfermedad cardiovascular. Más estudios revelan la importancia de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen como los principales responsables del efecto cardioprotector. En ellos, se demuestra la capacidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva para disminuir la cantidad de LDL y aumentar la cantidad de HDL^{262, 342, 343}.

El hidroxitirosol es capaz de disminuir los niveles de estrés oxidativo en plasma y por ello, evita que se oxiden las LDL, claves en la formación de la placa de ateroma. Su capacidad para inhibir la agregación plaquetaria es muy beneficiosa a la hora de evitar la formación de trombos, tanto en el torrente sanguíneo como en las placas de ateroma. Esto se produce por una inhibición de la liberación de TxB_2 y LTB_4 ^{204, 324, 344}. Pero además, el hidroxitirosol produce una disminución de la expresión de VCAM1 y ICAM1, mediante la inhibición de la activación de $NF-\kappa\beta$, de la proteína activadora-1, factor de transcripción GATA y de la NADPH oxidasa. Todas estas moléculas son responsables de la producción de radicales libres. Al ser inhibidas, habrá menor cantidad de ERO que puedan reaccionar con las LDL y oxidarlas. La disminución de ERO también prevendrá que se produzca un daño directo sobre los cardiomiocitos²²¹ (figura 21).

El hidroxitirosol es una sustancia que se sabe que además de captar radicales libres, ya que es antioxidante, también es capaz de interactuar con el hierro evitando que el hierro reaccione con otras moléculas y forme radicales libres. Esta elevada capacidad antioxidante no solo es importante a la hora de prevenir la aparición de enfermedades cardiovasculares. El

equilibrio redox del organismo es un factor determinante a la hora de evitar que aparezcan multitud de enfermedades, ya que una situación prolongada de estrés oxidativo puede provocar o favorecer la aparición de muchas otras enfermedades como obesidad, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, artrosis...etc. Por ello, una ingesta regular y normal de aceite de oliva es muy beneficiosa para mantener un buen estado de salud^{198, 221}.

El conocimiento que se tiene sobre la cardioprotección del hidroxitirosol frente al daño producido por la doxorubicina actualmente se basa en datos extraídos de estudios en los que se emplea o bien hidroxitirosol o bien doxorubicina, pero no hay ninguno donde coincidan ambas sustancias, así que este es el primero que se realiza empleando hidroxitirosol y doxorubicina para comprobar la capacidad cardioprotectora del hidroxitirosol de manera directa.

Mecanismos de protección del HT frente a enfermedad cardiovascular

- El hidroxitirosol es antioxidante, por lo que disminuirá la cantidad de ERO por si mismo.
- Es capaz de interactuar con el hierro y otros metales, evitando la formación de mas ERO.
- Inhibe moléculas productoras de ERO como:
 1. moléculas de adhesión vascular-1 (VCAM-1)
 2. moléculas de adhesión intercelular-1 (IAM-1)
 3. factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$)
 4. proteína activadora-1
 5. factor de transcripción GATA
 6. NADPH oxidasa



Figura 21. Mecanismos mediante los cuales el hidroxitirosol puede evitar la formación de ERO.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. APARATOS DE USO GENERAL

- Agitador de microplacas Shaker PSU2T Plus. Boeco (Alemania).
- Agitador magnético con calefactor AGIMATIC-E. JP-SELECTA, S.A (Barcelona, España).
- Balanza digital GRAM PRECISION (Gram Precisión, SL. Barcelona, España).
- Balanza electrónica de precisión SARTORIUS BP110S (Sartorius AG, Göttingen, Alemania).
- Baño seco digital (LABNET INTERNATIONAL, Inc. Woodbridge, NJ, EEUU).
- Cámara HITACHI (Standard Video with Meteor II).
- Centrifuga refrigerada de mesa BECKMAN mod GS-6R (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA, EEUU).
- Congelador de -20°C LIEBHER (LIEBHER, Biberach, Alemania).
- Congelador de -80°C REVCO (REVCO, Asheville, NC, EEUU).
- Estufa MEMMERT (Mettler GmbH + Co. KG, Schwabach, Alemania).
- Fuente de alimentación CONSORT E802 (300V-2000mA) (Bélgica).
- Homogeneizador de vidrio borosilicatado Wheaton.
- Lector de microplacas SYNERGY HT, Multidetector Microplate Reader, BIO-TEK (BioTek Instruments, Inc. Highland Park, Vermont, EEUU).
- Maquina productora de hielo SCOTSMAN AF-10 (Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, EEUU).
- Microcentrifuga para eppendorfs HETTICH EBA12 ZENTRIFUGEN (Hettich Lab GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Alemania).
- Micropipetas electrónicas EPPENDORF RESEARCH[®] PRO. EPPENDORF AG (Hamburgo, Alemania).
- pH-metro GLP21, CRISON (Barcelona, España).
- Pipetas automáticas NICHIPET EX (Nichiryo, Tokio, Japon).
- Vortex VWR (VWR International EuroLab S.L. Barcelona, España).
- Unidad capturadora de imágenes LAS-4000 Mini (Fujifilm. Tokio, Japon).

- Lector de dipsticks Immunochromato reader MS1000 (Mitosciences Inc. Oregon, EEUU).

3.1.2. MATERIAL PARA EL ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

- Agua destilada estéril (FreseniusKabi AG, Sevres, Francia).
- Baño histológico para inclusión en parafina Termofin (JP Selecta, Barcelona, España).
- Cuchillas para micrótopo de 250 µm de grosor (Feather Safety Razor Co, Ltd, Osaka, Japón).
- Equipo de inmunotinción automática Autostainer Plus Link (DakoDenmark A/S, Dinamarca).
- Equipo de recuperación antigénica PT Link (DakoDenmark A/S, Dinamarca).
- Equipo de tinción automática LeicaAutostainer XL (Leica, Wetzlar, Alemania).
- Estufa Incubat (JP Selecta, Barcelona, España).
- Etanol 100 % (Etanol absoluto parcialmente desnaturalizado QP, PanreacQuimica SA, Barcelona, España).
- Hematoxilina para tinción inmunohistoquímicaDakoAutomationHematoxilinHistologicalStainingReagent (DakoDenmark A/S, Dinamarca).
- Isoparafina H (Isoparafina H –Sustituto de Xileno- DC, PanreacQuimica SA, Barcelona, España).
- Medio de montaje (Medio de Montaje para sustitutos de xileno DC, PanreacQuimica SA, Barcelona, España).
- Microscopio óptico ECLIPSE E600 (Nikon Co., Tokio, Japón).
- MicrotopoLeica RM2235 (Leica, Wetzlar, Alemania).
- Montador automáticoLeica CV5030 (Leica, Wetzlar, Alemania).
- Placa fría Leica EG1150C (Leica, Wetzlar, Alemania).
- Portaobjetos para inmunohistoquímicaDako REALTM Capillary Gap MicroscopeSlides (DakoDenmark A/S, Dinamarca).
- Sistema de detección inmunohistoquímicaDakoRealTMEnVisionSystem, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (DakoDenmark A/S, Dinamarca).
- Software para el equipo de inmunotinción automática DakoLink, versión 1.5.2.1 (System Dynamics, New Jersey, USA).

Material y métodos

- Solución bloqueante de peroxidasa Dako Cytomation Peroxidase Blocking Reagent (Dako Denmark A/S, Dinamarca).
- Solución de lavado Dako Wash Buffer 10X (Dako Denmark A/S, Dinamarca).
- Tampón de desenmascaramiento antigénico Dako Target Retrieval Solution, pH 9 (Dako Denmark A/S, Dinamarca).

3.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se adquirieron 36 hembras de rata Sprague-Dawley (170 ± 20 g) de la empresa Harlan Interfauna Ibérica S.L. (Barcelona, España). Se alojaron 4 animales por jaula con un medio controlado a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ con un ciclo día/noche de 12:12 horas. Se les dio acceso libre a comida de roedor y agua desionizada. Todos los experimentos fueron llevados a cabo según los principios de la declaración de Helsinki y la normativa española de bienestar animal y el comité ético de la Universidad de Granada.

Las ratas tipo Sprague-Dawley son una de las especies más susceptibles de sufrir alteraciones en las glándulas mamarias por la acción de un agente carcinógeno químico. El agente inductor de carcinogénesis usado en este estudio ha sido el DMBA.

3.3. MODELO DE INDUCCIÓN DE CÁNCER DE MAMA

Aunque existen varios métodos por los cuales provocar la aparición de cáncer, como por ejemplo el empleo de hormonas sexuales o virus oncogénicos, presentan una clara desventaja, y es su elevado tiempo desde la aplicación del tratamiento hasta que aparecen los tumores. Por eso, se escogió un modelo de inducción de cáncer de mama mediante un agente carcinógeno químico, el DMBA.

Los modelos de administración de DMBA presentan una elevada eficacia en cuanto al número de ratas que presentaron tumores después de la dosis inicial de DMBA y en cuanto al tiempo al cual aparecieron los tumores. Las lesiones fueron multifocales, adenocarcinomas, que no presentaron metástasis. En el estudio realizado por Barros y col.³⁴⁵, tras la administración de 20 mg de DMBA disuelto en 1 ml de aceite de soja intragástrica a 20 ratas Sprague-Dawley, a las 8 semanas de la administración, 16 de las 20 ratas presentaban tumores de mama, con una media de 3 tumores por animal. A las 13 semanas después de la

Material y métodos

administración, todas las ratas presentaban tumores de mama con una media de 4.9 tumores por animal (figura 22).

Modelo de inducción química de cáncer de mama con 7,12- Dimetil benz (α) antraceno

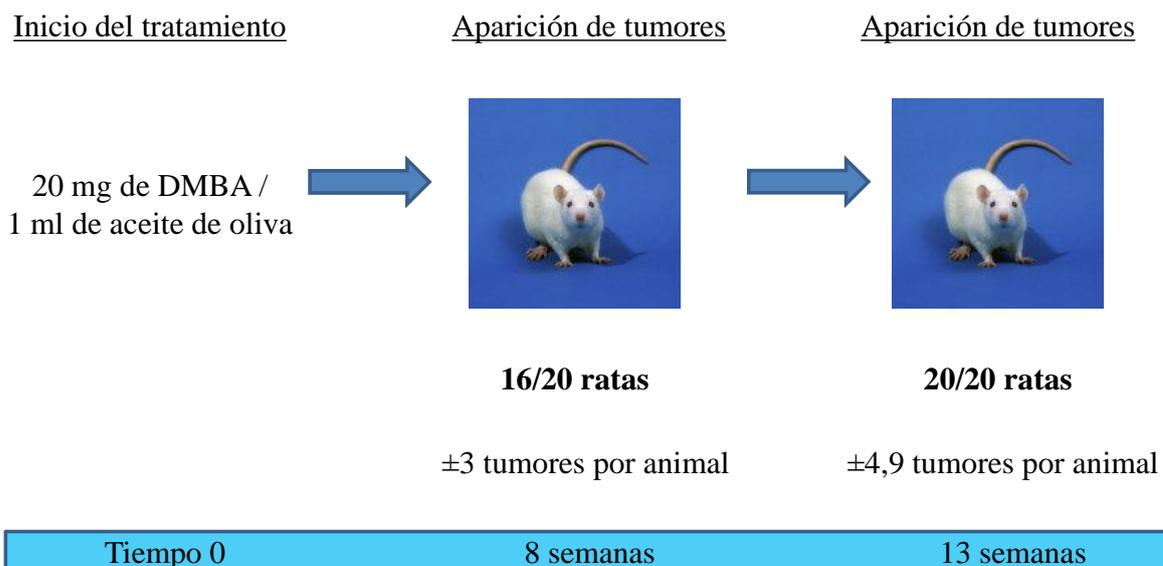


Figura 22. Modelo de inducción química de cáncer de mama con DMBA. El tratamiento se inicia con la administración de 20 mg de DMBA disuelto en 1 ml de aceite de oliva a todas las ratas del experimento. A las 8 semanas, 16 de las 20 ratas desarrollan una media de 3 tumores por animal. A las 13 semanas, todas las ratas han desarrollado tumores, a una media de 4,9 tumores por animal.

Numerosos estudios con DMBA demuestran la validez de este modelo, fácilmente reproducible. Las ratas administradas con dosis intragástricas de 2,5 mg a 20 mg de DMBA desarrollan tumores entre las 8 y 21 semanas en un 100 % de los casos³⁴⁶. Es un modelo bien conocido, estudiado y ampliamente usado en investigación para la generación de tumores a varios niveles (por ejemplo cáncer de mama o pulmonar)³⁴⁷⁻³⁵¹.

Administración de DMBA

Tras recibir los animales de experimentación, se dejaron una semana para que se adaptasen a sus nuevas condiciones de vida en el nuevo ambiente. Tras esta semana, y con 8 semanas de edad los animales y un peso de 170 ± 20 gr, se procedió a la administración del DMBA. El tratamiento se realizó administrando una única dosis de 100 mg/kg de peso

Material y métodos

intragastrica mediante gavage³⁵²⁻³⁵⁸, disuelto el DMBA en 1 ml de aceite de oliva virgen extra³⁵⁹⁻³⁶².

La administración del carcinógeno se llevó a cabo por vía oral (gavage) empleando para ello unas agujas especiales estériles, de acero y con punta de silicona, con un tamaño de 15Gx3 (Animal Feeding Needles. Popper and Sons, Inc. NY, EEUU). Existen varios tipos de agujas para gavage: rígidas de acero y desechables con punta de silicona, rígidas de acero autoclavables con punta terminada en bolita de acero, y flexibles de plástico; las agujas de acero pueden ser a su vez rectas, curvas, o maleables (Figura 23). Éstas, penetran fácilmente a través del esófago y hasta el estómago del roedor, asegurando que la sustancia llega a su destino gástrico, como nos muestra la imagen del cuerpo radiografiado de una rata con una aguja de gavage introducida, y en la que vemos que dicha aguja llega completamente al estómago (Figura 24).



Figura 23. Diferentes modelos de agujas de gavage



Figura 24. Radiografía de una rata con una aguja de gavage introducida hasta el estómago.

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se indujo cáncer de mama en 36 ratas hembra Sprague-Dawley de 8 semanas de edad, con una dosis intragástrica de 100 mg/kg de peso de DMBA disuelto en 1 ml de aceite de oliva.

Se dividieron aleatoriamente los animales en 4 grupos:

- 1) DMBA (n=10): grupo control de cáncer de mama sin tratamiento.
- 2) Hidroxitirosol (HT) (n=10): la dosis administrada fue de 0.5 mg/kg de peso, 5 días a la semana durante 6 semanas.
- 3) Doxorubicina (DOX) (n=8): se administró una dosis de 1 mg/Kg de peso, 1 vez a la semana durante 6 semanas.
- 4) Doxorubicina + hidroxitirosol (DOX + HT) (n=8): las ratas recibieron una terapia combinada de doxorubicina e hidroxitirosol en la misma dosis y periodos anteriores.

Desarrollo tumoral

En los modelos de inducción de cáncer mediante el empleo de DMBA, los tumores aparecen sobre las 8 semanas después de la administración, pero nosotros palpamos a los animales en busca de tumores a partir de las 4 semanas para asegurarnos que detectáramos todos los tumores que se formaban. El objetivo de detectar los tumores era el de comenzar los tratamientos con la existencia de tumores en el animal. La exploración de los animales se hacía 2 veces por semana a cada animal, empezando por la zona del cuello hasta la zona inguinal, y registrando la posición, momento de la aparición y volumen de cada tumor.

Cuando los tumores alcanzaron un tamaño suficiente, se midieron con un calibre electrónico digital de pie de rey (Afora, S.A. Barcelona, España). El tamaño que debieron tener los tumores para incluir al animal en el estudio fue de 2 cm³. Para la determinación de los volúmenes tumorales se siguieron dos fórmulas matemáticas diferentes en función de que la morfología del tumor permitiese la toma de dos o tres medidas. Dichas fórmulas son las que siguen:

$$V = 4/3\pi (d_1/2) \times (d_2/2)^2$$

Material y métodos

Donde d_1 y d_2 son los dos diámetros del tumor ($d_1 > d_2$) (para aquellos tumores en los que resulta imposible tomar una tercera medida); cuando exista la posibilidad de tomar una tercera medida, la fórmula a usar será la siguiente:

$$V = (d_1/2) \times (d_2/2) \times (d_3/2)$$

Donde d_1 y d_2 son los dos diámetros del tumor y d_3 se corresponde con el grosor ($d_1 > d_2 > d_3$)³⁶³.

La inserción de un microchip permitió el establecimiento de un modelo secuencial de ingreso de los animales en sus grupos experimentales justo en el momento adecuado desde el punto de vista del tumor, pero sin los problemas derivados de una mala identificación.

Previa anestesia del animal con KetaminaHCl + Clorbutol o Clorobutanol (Imalgene® 1000) a una dosis de 150mg/kgi.p., se procedió a la implantación subcutánea de un microchip (MUSICC Chip™ IdentificationSystem. AVID® IdentificationSystems, Inc. CA, EEUU). La inserción se realizó en la zona media dorsal y entre las escápulas del animal usando unas agujas y jeringas especiales (AVID® SUDS Monoject. AVID® IdentificationSystems, Inc. CA, EEUU), con el fin de tenerlo identificado en todo momento mediante un lector (MINITRACKER II. AVID® IdentificationSystems, Inc. CA, EEUU).

Tanto las agujas, como los microchips se desinfectaron previa aplicación y después de la misma con una solución bactericida, fungicida y virucida de uso clínico (LIMOSEPTIC® Concentrado. José Collado, SA. Barcelona, España) (Figura 25).

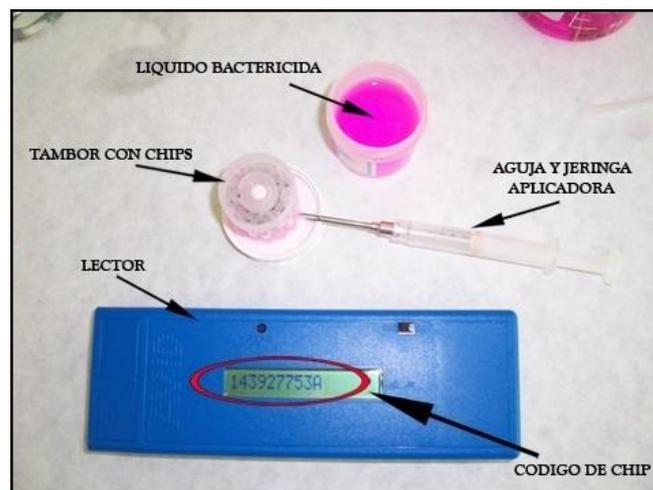


Figura 25. Sistema de implantación y lectura de microchips.

Material y métodos

Una vez terminada la implantación, la herida se desinfectó con povidona yodada y fue cerrada la herida usando apósito líquido (Compeed® Liquid Bandage™. Johnson&Johnson, Inc. NJ, EEUU). El uso de este apósito facilitaba el proceso debido a una serie de características:

- 1) Hace las veces de sutura química.
- 2) Facilita la cicatrización rápida, disminuyendo la probabilidad de infecciones.
- 3) Tiene acción calmante.
- 4) Mantiene la herida seca.
- 5) Se desprende por sí mismo a los pocos días de la aplicación

3.5. TRATAMIENTO CON DOXORUBICINA Y/O HIDROXITIRO SOL

Doxorubicina

Con el fin de asemejar lo máximo posible nuestro estudio a la administración real de quimioterapia que se da a las mujeres afectadas de carcinogénesis mamaria, se siguió el protocolo clínico de dosis para este citostático. En concreto, se utilizó una dosis de 1mg/kg de doxorubicina (Farmiblastina® Pharmacia. Solución inyectable, 50mg/25ml) por vía intravenosa, que a pesar de la dificultad, y tras discutir las diferentes posibilidades (vena ilíaca, de la cola, yugular, etc.), se haría a través de la vena lateral de la cola³⁶⁴⁻³⁶⁶.

A la luz de los hallazgos bibliográficos, se diseñó un protocolo basado en la administración de una dosis de 1 mg/kg de doxorubicina durante 7 semanas (Dosis Acumulada (DA): 7mg/kg)^{367, 368}. En un experimento previo al comienzo del estudio que se expone en la presente memoria de tesis, se concluyó que dicho protocolo no sólo es efectivo sino que en la sexta semana el volumen de los tumores disminuía de forma sustancial. Razón por la cual se modificó el calendario de tratamiento antitumoral, quedando resumido de la siguiente manera: administración de 1 mg/kg/semana durante 6 semanas de doxorubicina a través de la vena lateral de la cola (DA: 6 mg/kg).

Hidroxitirosol

Las ratas pertenecientes a este grupo de tratamiento recibieron por vía intragástrica mediante *gavage* cinco dosis semanales de HT de 0.5 mg/kg/día (3,4-Dihidroxifenil Etanol

Material y métodos

50mg suministrado en 1ml de etanol. Cayman Chemical Company), durante 6 semanas en solución acuosa.

Al no existir en la literatura trabajos con HT y ratas se administró una dosis de HT cinco veces superior a la ingesta estimada de un consumidor medio de 70 kg de peso corporal a través del aceite de oliva virgen (figura 26).

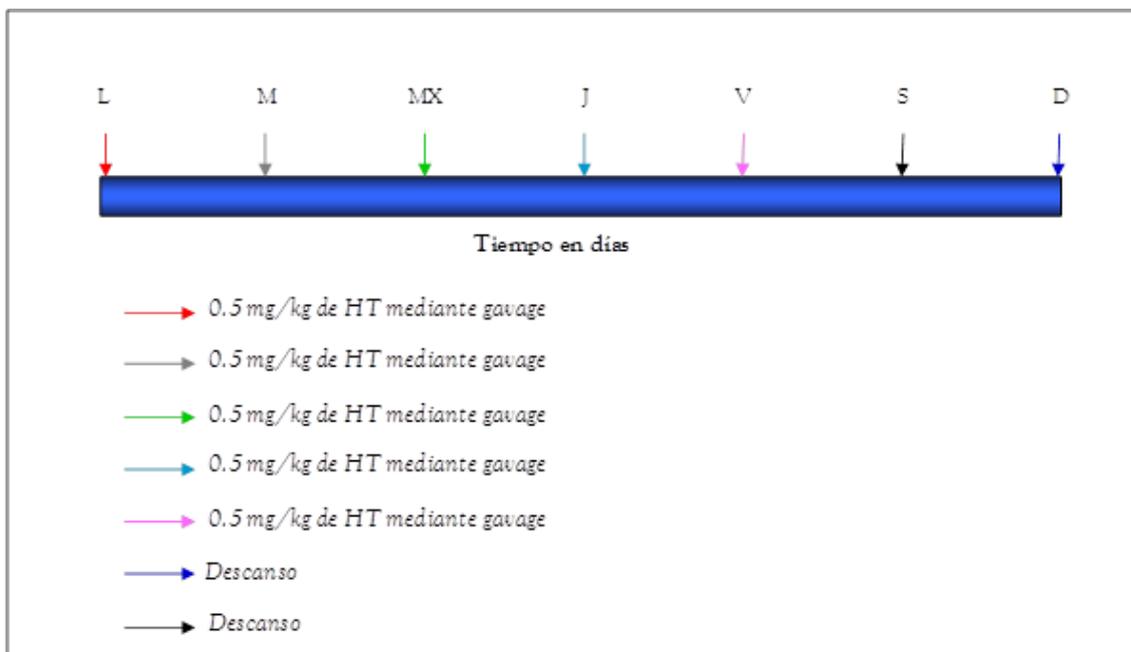


Figura 26. Esquema simplificado del tratamiento semanal con hidroxitirosol. Cada día de la semana se administró una dosis de 0,5 mg/Kg de hidroxitirosol a cada rata excepto el sábado y el domingo. Este patrón se repitió durante 6 semanas.

7,12-Dimetil benz(α)antraceno

Los animales correspondientes al grupo DMBA siguieron el mismo protocolo llevado a cabo para los grupos DOX y HT, la única diferencia es que no fueron sometidos a ningún tipo de tratamiento, solamente se les administró suero salino intravenoso. Los animales se sacrificaron al mismo tiempo que en el resto de los grupos, y se tomaron las pertinentes muestras para el estudio.

Doxorubicina e hidroxitirosol

En este grupo se les administro conjuntamente doxorubicina e hidroxitirosol a las mismas concentraciones de ambas sustancias, durante 6 semanas.

Al igual que en los anteriores grupos, una semana después de finalizar el tratamiento, o cuando el tumor alcanzó un volumen de 10 cm³(por motivos éticos), se procedió al sacrificio de los animales mediante sangrado aórtico, siguiendo el protocolo del comité ético de la Universidad de Granada para ensayos en animales de experimentación, previa anestesia con KetaminaHCl + Clorbutol o Clorobutanol a una dosis de 150mg/kg i.p., y se tomaron las muestras necesarias para el estudio. Toda la sangre se recogió en tubos con EDTA y el plasma fue aislado. Los corazones se extrajeron inmediatamente y se pesaron. La mitad se congeló en nitrógeno líquido y la otra mitad se fijó en formalina tamponada al 4%. Una pequeña porción se utilizó también para microscopía electrónica.

3.6. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

3.6.1. SANGRE Y PLASMA

a) SANGRE.

La recolección de la sangre del animal se obtuvo mediante la canulación de la arteria aorta abdominal y siguiendo el protocolo del comité ético de la Universidad de Granada para ensayos en animales de experimentación. Previa anestesia, se coloca el animal en posición decúbito supino y tras laparotomía media (Figura 27. 1) se localiza la aorta abdominal, hasta la bifurcación en las arterias ilíacas (Figura 27. 2). Con extremo cuidado se procede a la separación de la aorta y la vena cava usando un utensilio curvo y romo que no desgarre a ninguno de estos vasos y se pasa un hilo por el extremo inferior del vaso anudándose próximo a las arterias ilíacas (Figura 27. 3). Se introduce un segundo hilo a cierta distancia del primero (sin anudar por el momento), con objeto de dejar suficiente espacio para introducir la cánula posteriormente (Figura 27. 4). Se interrumpe la circulación a través de la aorta con la ayuda de una pinza atraumática bulldog DeBakey, colocándolo por encima del segundo hilo, aún sin anudar (Figura 27. 5) y a continuación se efectúa una pequeña incisión en el vaso, por debajo de la pinza, evitando la sección completa de la arteria (Figura 27. 6). Se introduce la cánula (previamente tratada con anticoagulante) en la aorta a través de la incisión realizada con

Material y métodos

anterioridad (Figura 27. 7), intentando introducirla al máximo, para evitar su expulsión tras el restablecimiento de la circulación y se anuda el extremo de la cánula introducido en el vaso, usando el hilo que quedaba sin anudar próximo a la pinza (Figura 27. 8). Por último, se retira la pinza cuidadosamente (Figura 27. 9) con el fin de restablecer la circulación y se procede a la recolección de la sangre en tubos previamente tratados con EDTA Na₂ (BD Vacutainer™. K3E 15%, 0.12ml. BD Vacutainer Systems, Preanalytical Solutions. Plymouth, Reino Unido).

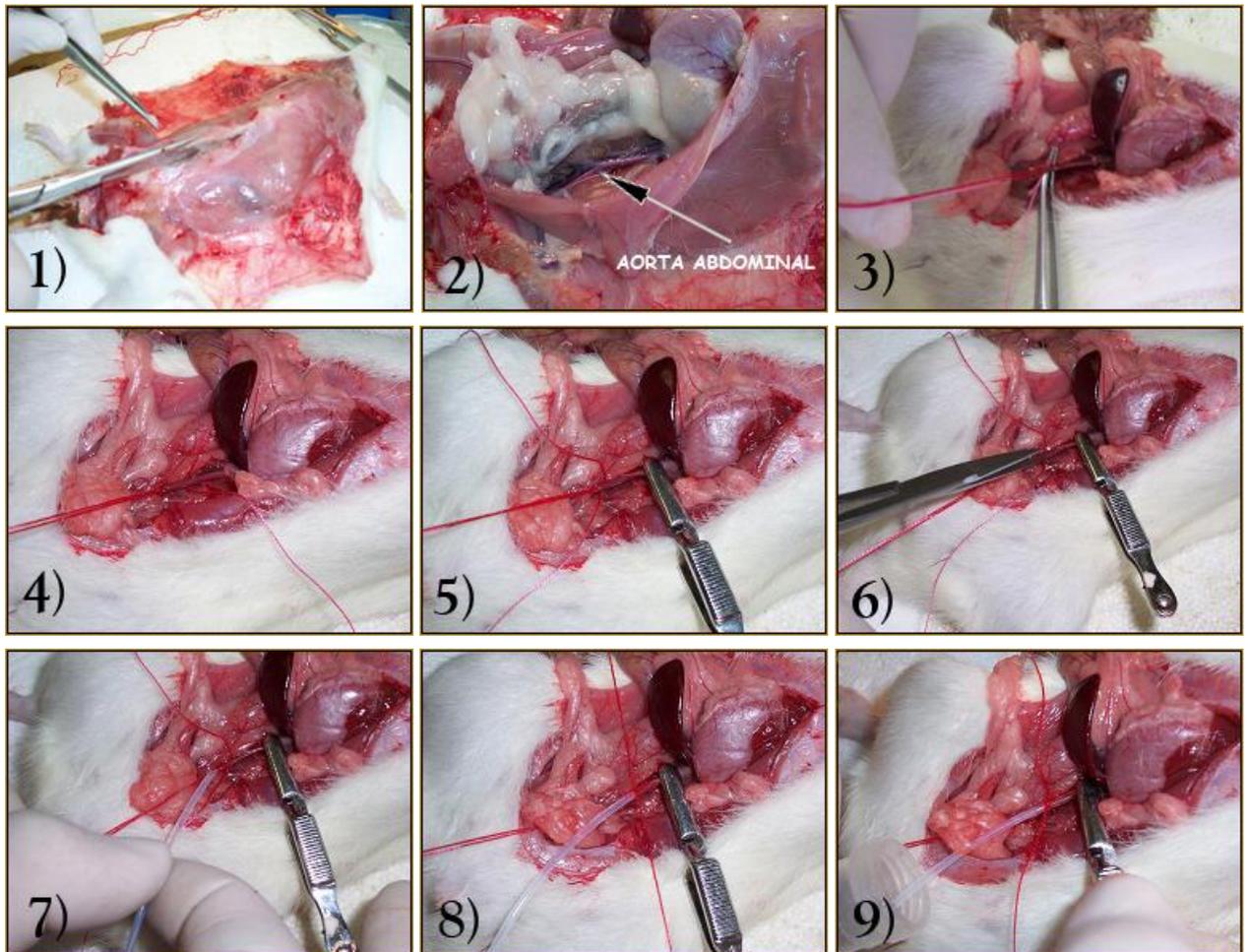


Figura 27. Secuencia de imágenes de la canulación de la arteria aorta abdominal.

b) PLASMA.

La sangre se centrifugó a 700xg durante 15 minutos y a una temperatura de 4°C, usando una centrifuga refrigerada de mesa (BECKMAN GS-6R). Acabada la centrifugación se recogió el plasma y se alicuotó en tubos de congelación de 2 ml estériles con tapón de rosca (Microtube 2ml, PP. SARSTEDT. Aktlengesellschaft & Co. Alemania).

3.7. BIOQUÍMICA PLASMÁTICA

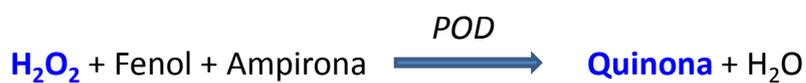
Todas las determinaciones bioquímicas realizadas en las muestras de plasma, se llevaron a cabo mediante kits comerciales SPINREACT (SPINREACT, S.A., Girona, España); adaptados para la aplicación de un lector de microplacas SYNERGY HT, *Multi-Detection Microplate Reader*, (BIO-TEK® Instruments Inc. Vermont, EEUU), utilizando microplacas estándares de 96 pocillos de fondo plano (Figura 28). Tanto las muestras, como los patrones y blancos, se prepararon por duplicado.



Figura 28. Microplaca estándar de 96 pocillos.

Glucosa

La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD). La intensidad de color formado es proporcional a la concentración de glucosa de la muestra.



Protocolo experimental

Se añadieron 5 μ l de plasma en cada pocillo de una microplaca, y se mezclaron con 100 μ l de reactivo (Tris 92 mM, Fenol 0.3 mM, GOD 15000 U/L, POD 1000 U/L y 4-Aminofenazona 2.6 mM); el mismo proceso se siguió con el patrón primario acuoso (Glucosa

Material y métodos

100mg/dl). A continuación, se agitó y se incubó durante 10 minutos a 37°C, tras el cual se leyó la absorbancia o densidad óptica (DO) del patrón y de la muestra frente al blanco a 505 nm.

Proteínas totales

En medio alcalino, las proteínas dan un intenso color violeta azulado en presencia de sales de cobre. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de proteína total presente en la muestra.

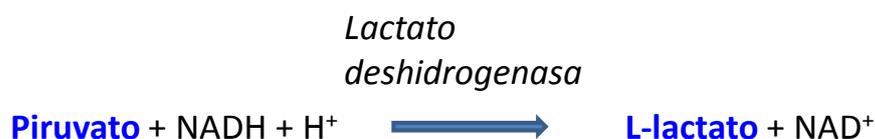


Protocolo experimental

Para esta determinación, se pipeteó 5µl de muestra en cada uno de los pocillos de la placa, acto seguido se adicionaron 200µl de reactivo Biuret (Potasio sodio tartrato 15 mM, Yoduro sódico 100 mM, Yoduro de potasio 5 mM y Sulfato de cobre (II) 5 mM); del mismo modo se procedió con el patrón primario de albúmina bovina (7 g/dl). La mezcla obtenida fue agitada vigorosamente y se incubó durante 5 minutos a una temperatura de 37°C, transcurrido éste, se procedió a la lectura de DO del patrón y la muestra frente al blanco (Biuret) a una longitud de onda de 540 nm.

Lactato deshidrogenasa

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la reducción del piruvato por el NADH, según la siguiente reacción:



Material y métodos

La velocidad de disminución de la concentración de NADH es proporcional a la concentración catalítica de LDH en la muestra ensayada.

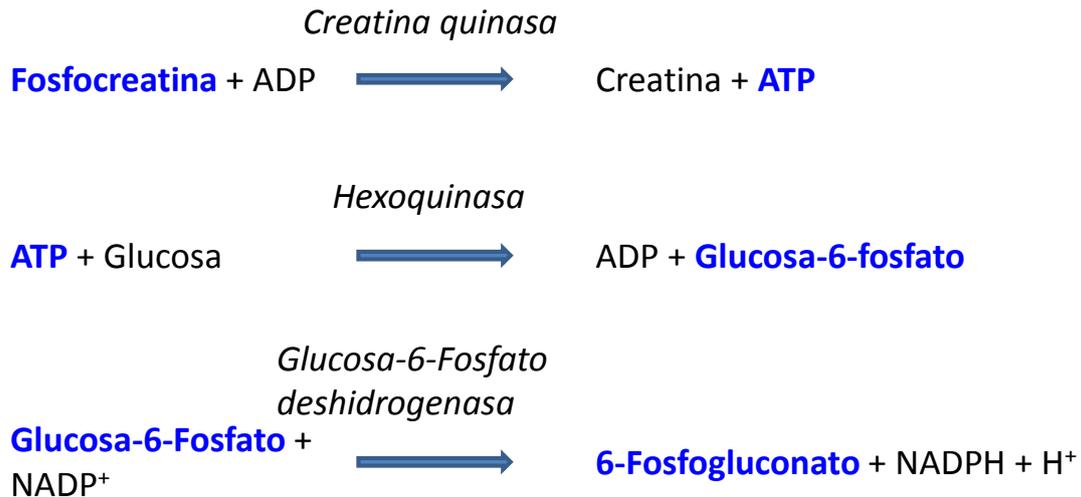
Protocolo experimental

Se pipetearon en una microplaca 2.5µl de plasma y 150µl de reactivo (Fosfato 50 mM pH 7.8, Piruvato 0.6 mM y NADH 0.18 mM). Todo se agitó e incubó durante un minuto a 37°C, transcurrido el cual se procedió a la lectura de la DO (340nm) de la muestra al inicio y cada minuto durante 3 minutos y a una temperatura constante de 37°C.

La LDH posee varias isoformas: LDH-1 (predominante en miocardio y eritrocitos, LDH-2 (predominante en el sistema mononuclear fagocítico), LDH-3 (predominante en las células pulmonares), LDH-4 (predominante en riñones, placenta y páncreas) y LDH-5 (predominante en hígado y músculo estriado). Cuando hay una destrucción de algún tipo de tejido, se libera LDH al torrente sanguíneo. Si detectamos un aumento de la concentración de alguna de estas isoformas, podremos conocer en que tejido se está produciendo el daño, siempre teniendo en cuenta los demás parámetros indicadores de daño tisular que se deberán medir antes de llegar a una conclusión.

Creatina quinasa

La creatina quinasa (CQ) cataliza la transferencia reversible de un grupo fosfato de la fosfocreatina al ADP. Esta reacción se acopla con otras catalizadas por la hexoquinasa (HQ) y por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH). La velocidad de formación de NADPH es proporcional a la concentración catalítica de CQ en la muestra problema.



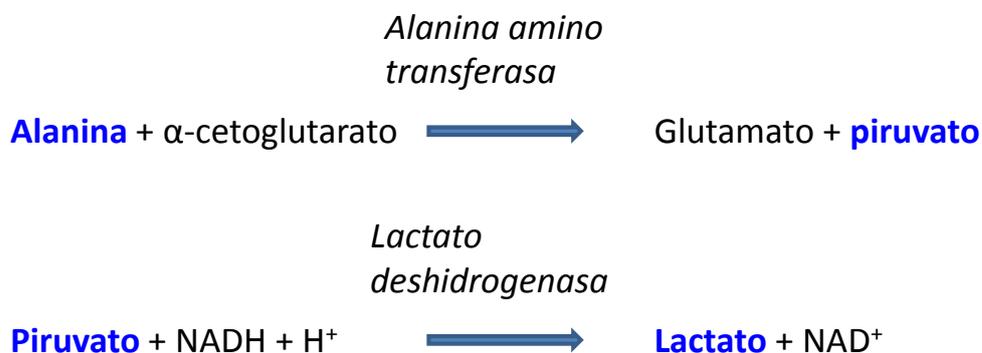
Protocolo experimental

Se añadieron a la placa 5µl de plasma junto con 100µl de reactivo (Imidazol 100 mM pH 7, Glucosa 20 mM, Acetato de magnesio 10 mM, EDTA 2 mM, ADP 2 mM, AMP 5 mM, di-Adenosina-5.pentafosfato 10 mM, NADPH+ 2 mM, Hexoquinasa 2500 U/L, Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 1500 U/L, N-acetilcisteína 20 mM y Fosfato de creatina 30 mM). Tras la correspondiente agitación, se incubó a 37°C durante 2 minutos, y se leyó la absorbancia de la muestra al inicio y cada minuto durante 3 minutos (temperatura de la lectura de 37°C) a una longitud de onda de 340nm.

Se midió la cantidad de esta enzima porque es un indicador de daño muscular. Cuando hay un daño en las miofibrillas, se libera creatina quinasa al torrente sanguíneo. Unos niveles especialmente elevados nos indican que puede haber una destrucción de tejido muscular o cerebral por causas anómalas. Esta enzima posee varias isoformas: CK-1 (predomina en cerebro), CK-2 (es un 40 % del total de creatina quinasa del miocardio), CK-3 (predomina en musculo), Mi_b-CK (creatin quinasa mitocondrial específica del musculo estriado) y Mi_a-CK (creatin quinasa ubicua)³⁶⁹. La determinación clínica de estas isoenzimas junto con la ayuda de otros métodos diagnósticos como el electrocardiograma y la determinación de otras moléculas implicadas en la destrucción de musculo cardiaco es una herramienta ampliamente utilizada para la detección de problemas cardiacos.

Alanina amino transferasa

La alaninaaminotransferasa (ALT), inicialmente llamada transaminasa glutámico pirúvica (GPT), cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) y NADPH. La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio es proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra.



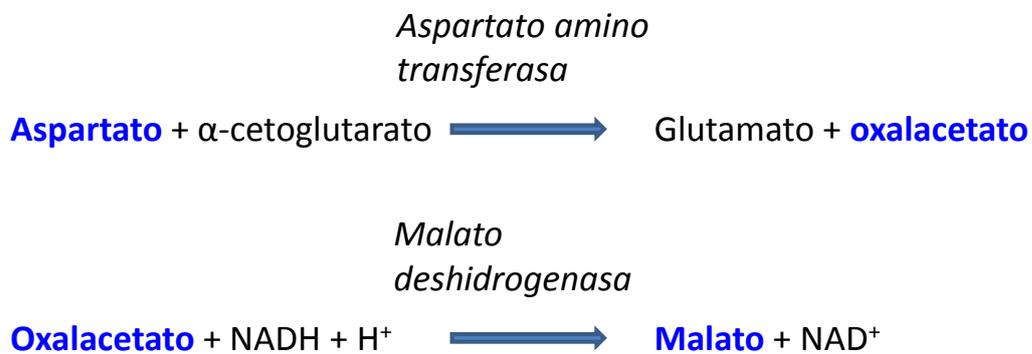
Protocolo experimental

Se pipetearon 10 μ l de muestra junto con 100 μ l de reactivo (TRIS 100 mM pH 7.8, L-Alanina 500 mM, NADH 0.18 mM, Lactato deshidrogenasa 1200 U/L y α -Cetoglutarato 15 mM); la mezcla se agitó e incubó (37°C) durante 1 minuto, transcurrido el cual se leyó la DO (340nm) de la muestra al inicio y cada minuto durante 3 minutos (37°C).

La ALT es una enzima que se encuentra en mayor cantidad en el hígado, y niveles elevados en sangre pueden ser indicativos de un problema hepático. Pero además, se encuentra en otros tejidos como miocárdico, aumentando sus niveles también cuando hay algún tipo de problema cardiaco. Es por eso que la ALT constituye uno de los parámetros a medir, en una batería de determinaciones junto con los demás parámetros que estamos viendo, si queremos conocer con certeza que se está produciendo un fallo en el miocardio.

Aspartato amino transferasa

La aspartatoaminotransferasa (AST), inicialmente llamada transaminasa glutamato oxaloacética (GOT), cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) y NADH. La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, es proporcional a la concentración catalítica de AST en la muestra problema.



Protocolo experimental

Se añadieron a la placa 10 μ l de muestra y 100 μ l de reactivo (TRIS 80 mM pH7.8, L-Aspartato 200 mM, NADH 0.18 mM, Lactato deshidrogenasa 800 U/L, Malato deshidrogenasa 600 U/L y α -Cetoglutarato 12 mM). Acto seguido se agitó e incubó durante 1 minuto (37°C), y luego se procedió a la lectura de la absorbancia (340nm) inicial de la muestra y cada minuto durante 3 minutos.

Esta enzima también posee varias isoformas: cAST (predominante en el citosol de eritrocitos y cardiomiocitos) y mAST (predominante en mitocondria de hepatocitos). La determinación de la relación entre ALT y AST es un parámetro diagnóstico de fallo cardiaco o hepático muy importante. Esto es así porque una concentración elevada de ALT podría indicar fallo hepático, mientras que si encontramos a la vez que hay una alta concentración de AST, nos inclinaríamos más por el fallo cardiaco (ya que la AST es más específica del musculo cardiaco). Aun así, esta es sólo una de las determinaciones necesarias para determinar que se está produciendo un fallo en el miocardio, ya que una elevación de AST también puede

indicarnos otras patologías como pancreatitis aguda, anemia hemolítica aguda, enfermedad renal...etc.

3.8. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE HIDROXITIRO SOL Y SU METABOLITO ALCOHOL HOMOVANÍLICO

La cuantificación de los niveles de HT y su metabolito alcohol homovanílico se realizó siguiendo el método descrito por Miro-Casas y colaboradores en muestras plasmáticas, usando para ello el tándem cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (CG/EM)²⁹⁹. Estas determinaciones fueron llevadas a cabo en la unidad de lípidos y epidemiología cardiovascular del Instituto Municipal de Investigación Médica (IMIM) (Barcelona, España) por la Doctora María Isabel Covas.

Reactivos

- 3-(4-hidroxifenil)-propanol (SIGMA®. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- 4-hidroxi-3-metoxifeniletanol (alcohol homovanílico) (SIGMA®. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- 4-metilcatecol (SIGMA®. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- Acetato de etilo (SCHARLAU. Scharlau Chemie, SA. Barcelona, España).
- Acetonitrilo, grado HPLC (SCHARLAU. Scharlau Chemie, SA. Barcelona, España).
- Ácido clorhídrico 0.5 M (MERCK. Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)
- Ácido perclórico 700g/L (SCHARLAU. Scharlau Chemie, SA. Barcelona, España).
- Hidróxido sódico 1 M (MERCK. Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).
- Hidroxitirosol (3,4-hidroxifeniletanol).
- Metabisulfito sódico 1 M (SIGMA®. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- Metanol (SCHARLAU. Scharlau Chemie, SA. Barcelona, España).

Material y métodos

- N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) (MACHEREY-NAGEL. Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Alemania).
- Yoduro de amonio (NH₄I) (MERCK. Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Curvas de calibración y muestras control

Se prepararon las soluciones de trabajo de hidroxitirosol (HT) (1.4µg/ml) y alcohol homovanílico (AH) (1µg/ml) en metanol.

Para la elaboración de las curvas de calibración se añadió a 1ml de plasma (libres de las sustancias de referencia) la cantidad adecuada de cada una de las soluciones de trabajo de HT y AH, así como 15ng de estándar interno (solución metanólica de 10µg/ml de 3-(4-hidroxifenil)-propanol), quedando la curva de calibrado para el HT en el rango de concentraciones 2.1-42ng/ml y 1.5-30ng/ml para el AH. Las muestras control se prepararon en concentraciones 10.5, 21 y 35ng/ml para el HT, y 7, 15 y 25ng/ml para AH.

Hidrólisis ácida, extracción y derivatización del plasma

Para llevar a cabo la hidrólisis ácida se adicionaron 15ng de estándar interno y 100µl de una solución 1M de metabisulfito sódico a 1ml de plasma, 60µg de 4-metilcatecol para prevenir la unión de los compuestos fenólicos a las proteínas y ácido clorhídrico 0.5 M y se incubó la mezcla durante 20 minutos en una baño seco a 100°C. Una vez a temperatura ambiente, se añadieron 75µl de ácido perclórico a una concentración de 700 g/L con el fin de precipitar las proteínas, momento tras el cual se ajustó el pH de la mezcla entre 3 y 3.5 con hidróxido sódico 1 M. Se centrifugó a 300xg durante 5 minutos, siendo transferido el sobrenadante a tubos de cristal para su posterior extracción líquido-líquido con 4ml de una mezcla de acetonitrilo/acetato de etilo (proporción volumétrica 1:4). Una vez agitado durante 30 minutos y centrifugado a 300xg (5 minutos), la fase orgánica se evaporó y los residuos fueron derivatizados con 75µl de una mezcla de MSTFA/ NH₄I/2-mercaptoetanol (2g de NH₄I y 6ml de 2-mercaptoetanol por litro de MSTFA) durante 60 minutos a 60°C.

Análisis cromatográfico

La cuantificación de HT y AH se realizó en 2µl de la muestra derivatizada mediante un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, EEUU) acoplado a un espectrómetro de masas (CG/EM), equipado con un cromatógrafo de gases HP5980, un detector masa-selectivo HP5973 y un inyector HP7683 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU). La separación de los compuestos fue realizada con una columna capilar de fenilmetil silicona entrecruzada al 5% HP Ultra 2 (12.5m de longitud x 0.2mm de diámetro interno y 0.33µm de grosor de capa) (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EEUU).

Las condiciones del sistema fueron las que siguen:

- Gas portador (Fase móvil): 1ml/min de helio a 180°C.
- Horno del CG: programado de 80 a 200°C (15°C/min) y de 200 a 280°C (25°C/min), siendo en este último el que se mantuvo durante 3 minutos.
- Tiempo total de paso 15 minutos.
- Las muestras plasmáticas se inyectaron casi al completo (modo splitless) de modo que los analitos se acumularán en la cabeza de la columna, debido a la baja concentración de los analitos.
- Detector: accionado en modo detección ión-simple, los compuestos fueron ionizados por impacto de electrones.

Para las determinaciones cuantitativas se identificaron los iones del estándar interno, HT y AH en las m/z (razón masa/carga) 206, 370 y 312 respectivamente, tanto de las muestras como de la curva de calibración, expresándose los resultados como ng/ml.

3.9. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Se realizó el análisis histopatológico y se tiñeron las muestras con hematoxilina-eosina para poder posteriormente evaluar el estado del tejido. El nivel de daño en el tejido cardíaco se evaluó mediante el grado de Billingham³⁷⁰, según el siguiente criterio: 0.0: sin lesión, 0.5: tejido anormal pero sin lesión debido a la doxorubicina, 1.0: ≤5%, 1.5: 6-15 %, 2.0: 16-25 %, 2.5: 26-35 %, 3.0: > 35 % de las células con daño producido por doxorubicina.

Tinción con hematoxilina-eosina

Tanto las muestras biopsiadas como los tumores extirpados tras el sacrificio fueron procesadas para su inclusión en bloques de parafina. Para ello, se incluyeron en el procesador de tejidos Leica ASP 300 (Leica, Wetzlar, Alemania) mediante el siguiente protocolo:

- 1.- Formaldehído 3,9-4% (2 horas).
- 2.- Etanol al 70% (2 horas).
- 3.- Etanol al 96% (2 horas).
- 4.- Etanol absoluto (3 pases de 1 hora: total 3 horas) (Panreac, Barcelona, España).
- 5.- Sustituto del Xileno (3 pases de 1 hora: total 3 horas) (Neoclear:Isoparafina H, Panreac, Barcelona, España).
- 6.- Parafina líquida (3 pases, los dos primeros de 1 hora y el último de 2 horas) (Histosec Pastillas, Merck. Damstadt, Alemania).

Seguidamente los bloques fueron montados utilizando el montador (Tissue-Tek, Sakura, Torrance, USA), depositados sobre la placa fría e incubados 20 minutos a 4°C con el objetivo de enfriar la superficie del bloque para facilitar el corte. A continuación, se ensambló cada bloque en el microtomo y se cortó su superficie hasta que ésta quedó igualada para obtener un corte representativo de la muestra. Tras programar el espesor del corte a 3 µm, se llevaron a cabo varios cortes seriados del bloque que, con ayuda de una aguja histológica, se depositaron en una baño de agua suplementado con etanol absoluto para extender los cortes y evitar pliegues. Una vez extendidos, se recogieron los cortes con un portaobjetos limpio y se dejaron secar portaobjetos de 76x26mm (Menzel-Glaser®, Braunschweig, Alemania) en una estufa a 37°C durante 1 hora. Acto seguido se tiñeron mediante el uso de la técnica de hematoxilina y eosina mediante teñidor automático (Autostainer XL, LEICA. Wetzlar, Alemania) aplicando el siguiente protocolo:

- 1.- Desparafinar mediante microondas durante 5 minutos, dos pases de 5 minutos con Neoclear e hidratar con alcoholes decrecientes hasta agua.
- 2.- Teñir con hematoxilina de Harris (Hx 747515, Merck, Damstadt, Alemania) durante 5 minutos.
- 3.- Lavado con agua corriente.
- 4.- Diferenciar en agua amoniacal (5%) durante varios segundos.

Material y métodos

- 5.- Azular con agua corriente durante 3 minutos.
- 6.- Colorear con eosina (Eosina de Etilo, Carlo ErbaReagentiSpA. Rodano, Italia).
- 7.- Deshidratar mediante alcoholes crecientes de 70% (2 minutos), 96% (2 minutos) y absoluto (2 minutos) y aclarar en neoclear durante dos segundos.
- 9.- Montaje con cubre de 24x60mm (HirschmannLaborgeräte. Eberstadt, Alemania) mediante montador automático CV 5030 (Leica, Wetzlar, Alemania).

Tras esta tinción se procedió al estudio histopatológico de las muestras llevado a cabo por un patólogo experto siguiendo los criterios histopatológicos de malignidad que se detallan a continuación:

- a) Gradación de Bloom-Richardson en tres grados: I (3-5); II (6-7); III (8-9) según la siguiente baremación:
 - Atipia nuclear (1 a 3) en base al tamaño y forma de los núcleos, su cromatina y la presencia de nucleolos.
 - Patrón arquitectural. Porcentaje de área sólida. 1= <25%; 2= 25-75%; 3 = >75%.
 - Número de mitosis. 1= 0-9/10CGA; 2= 10-19/10CGA; 3= >19/10CGA.
- b) Patrón arquitectural:
 - Cribiforme (>70% de este patrón).
 - Mixto (30-70% del patrón cribiforme y el resto del papilar).
 - Papilar (< 30% de patrón cribiforme).
 - Otros: Sólido, tubular.

3.10. ANÁLISIS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LAS MITOCONDRIAS DEL MÚSCULO CARDÍACO

Las muestras de músculo cardíaco se prefijaron en formaldehído al 1.5 % en tampón cacodilato al 1 %, pH 7.4 durante 2 horas a 4°C. Después de 3 lavados en tampón cacodilato, se fijaron las muestras en tetróxido de osmio al 1 % durante 60 minutos a 0-4°C. Las muestras se deshidrataron en etanol absoluto y fueron embebidas en resina Epon. Después de incubación toda la noche a 65°C, se cortaron secciones ultrafinas (70 nm) con un cuchillo de diamante usando un ultrakut S ultramicrotomo, y se pusieron en una red de malla de cobre. Todas las secciones se tiñeron con uranilacetato, y se vieron en un microscopio electrónico Carl Zeiss EM10C (Oberkochen, Alemania) a 40.000 X en el Centro de Instrumentación Científica de la

Universidad de Granada. Se hizo un análisis de la morfología mitocondrial, el área y porcentaje de mitocondrias alteradas. Para esto se usó el programa NIH ImageJ³⁷¹.

3.11. MARCADORES DE DAÑO PROTEICO POR OXIDACIÓN MEDIDO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA/ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS)

Las proteínas carbonilo glutámicas (GSA), semialdehidosaminoalifáticos (AASA), carboximetil lisina (CML), carboxietil lisina (CEL) y MDAL se determinaron como derivados metilester del ácido trifluoroacético en muestras de proteínas mitocondriales reducidas, hidrolizadas en medio ácido y deslipidadas por GC/MS usando un método de dilución isotópica previamente descrito³⁷² y mediante un cromatógrafo de gases Serie II 6890 I (Agilent, Barcelona, España) con un detector selectivo de masas 5973A y un inyector automático Serie 7683, una columna de 30m x 0.25 mm x 0.25 µm HP-5MS y a la temperatura descrita por el programa³⁷².

La cuantificación se hizo por estandarización externa usando curvas patrón elaboradas a partir de mezclas de patrones deuterados y no deuterados. Los análisis se realizaron por monitorización de iones GC/MS (SIM-GC/MS). Los iones usados fueron: lisina y [²H₈]lisina, *m/z* 180 y 187 respectivamente, ácido 5-hidroxi-2-aminovalérico y [²H₅] ácido 5-hidroxi-2-aminovalérico (derivados estables del GSA), *m/z* 280 y 285 respectivamente, ácido 6-hidroxi-2-aminocaproico y [²H₄] ácido 6-hidroxi-2-aminocaproico (derivados estables del AASA), *m/z* 294 y 298 respectivamente, CML y [²H₄]CML, *m/z* 392 y 396 respectivamente; CEL y [²H₄]CEL, *m/z* 379 y 383 respectivamente, y MDAL y [²H₈]MDAL, *m/z* 474 y 482 respectivamente. Las cantidades de producto se expresaron como la relación µmol de GSA, AASA, CML, CEL o MDAL / mol de lisina.

3.12. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS PARA EL ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES I Y IV

Previa a la determinación de la actividad de los complejos, es necesario conocer la cantidad de proteínas de cada muestra para poder cargar en cada pocillo. Hemos usado el kit de determinación de proteínas Pierce[®] BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, 3747 N. Meridian Road, Rockford, IL 61105 USA).

Para ello, primero prepararemos una curva patrón, usando el estándar de albumina 2 mg/ml del que dispone el kit. En nuestro caso la determinación la llevamos a cabo en microplacas usando el protocolo estándar recomendado por el proveedor.

Material y métodos

Después de preparar la curva patrón (0-2000 $\mu\text{g/ml}$), ya podemos seguir con el protocolo:

1. Pipetear 25 μl de cada vial de la curva y de cada muestra en cada pocillo. Si es necesario, diluir la muestra.
2. Añadir 200 μl de reactivo de trabajo a cada pocillo y agitar la placa durante 30 segundos. Preparar el reactivo de trabajo mezclando 50 partes del reactivo BCA A (carbonato sódico, bicarbonato sódico, ácido bicinchonínico, tartrato sódico en hidróxido sódico 0.1 M) con 1 parte del reactivo BCA B (sulfato de cobre al 4%).
3. Cubrir la placa e incubar a 37°C durante 30 minutos.
4. Dejar enfriar la placa hasta que alcance temperatura ambiente.
5. Leer la absorbancia a 562 nm en un lector de microplacas.

3.13. ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES I Y IV

Se realizó el ensayo usando un kit de actividad enzimática dipstickMitoSciences (MitoSciences Inc. Oregon, EEUU) y un lector de dipsticksImmunoChromatoreader MS1000 (MitoSciences Inc. Oregon, EEUU). Los resultados fueron analizados con el programa de determinación MS1000 (ver.1.0.1.2).

Fundamento del ensayo en el complejo I

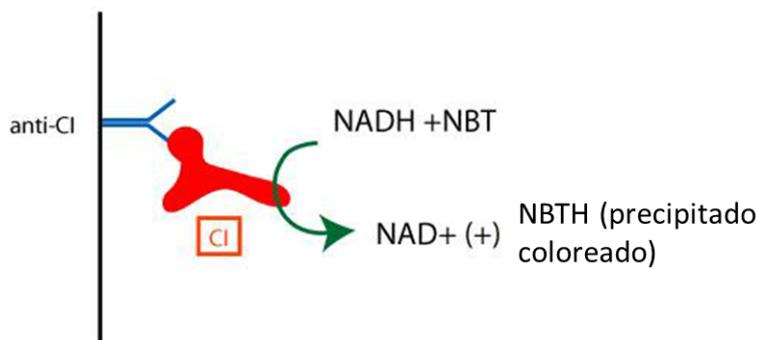


Figura 29. Esquema de la reacción producida en la lámina. El anticuerpo presente en la lámina captura al complejo I. Al añadir al medio NADH y NBT, la oxidación del NADH, sustrato natural del complejo I, produce una reducción del NBT, que es un compuesto coloreado que precipita y da color a la banda en la lámina. La intensidad del color de la banda será proporcional a la actividad del complejo I.

La técnica consiste en una lámina de nitrocelulosa con un anticuerpo monoclonal anti complejo I en la superficie de la lámina. Este anticuerpo “captura” al complejo I de la muestra. A continuación se sumerge la lámina en una solución que contiene nicotinamidadinucleotido (NADH) y nitrotetrazolio azul (NBT) como aceptor de electrones. El complejo I capturado oxida

Material y métodos

el NADH y el protón (H^+) resultante reduce el NBT, produciendo un precipitado azul-morado en la línea de la lámina donde se encuentra el anticuerpo. La intensidad de la señal corresponderá a la actividad del complejo I (figuras 29, 30 y 31).

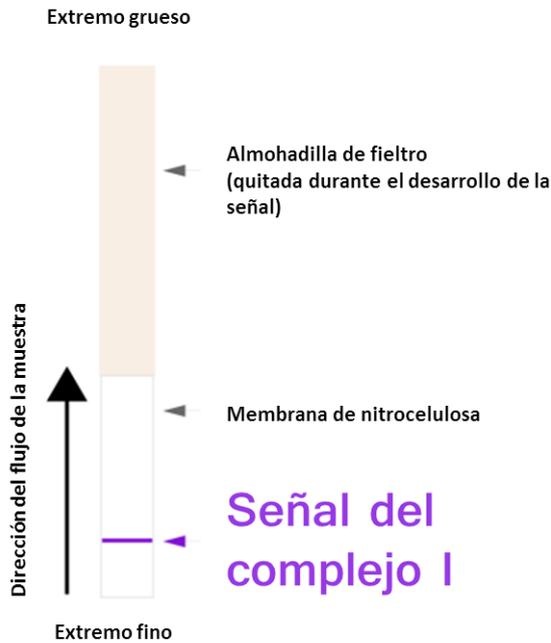


Figura 30. Dibujo esquemático de la lámina donde se produce la reacción entre el complejo I y el NADH, que proporcionará la medida de la actividad del complejo I.

Protocolo experimental para el complejo I

Se pueden obtener extractos proteicos para la determinación a partir de tejidos o a partir de cultivos celulares. Las muestras deben almacenarse en frío.

El proceso consta de 2 partes: extracción de la muestra y determinación de la actividad del extracto:

a) Extracción de la muestra:

1. Pesar aproximadamente 50 mg de tejido.
2. Añadir entre 5 y 10 volúmenes de tampón A en frío a la muestra.
3. Homogeneizar la muestra utilizando un potter de vidrio.
4. Mantener la muestra en hielo durante 20 minutos agitando cada 5 minutos la muestra.
5. Centrifugar el extracto celular en una microcentrifuga a 13.000 – 16.000 r.p.m durante 20 minutos a 4°C.

Material y métodos

6. Recoger el sobrenadante y determinar la concentración de proteínas del extracto proteico de la muestra. La concentración de proteínas debería ser mayor de 1 mg/ml.
7. Proceder a la determinación de la actividad del complejo I usando para ello un lector de dipsticksImmunoChromatoreader MS1000 (Mitosciences Inc. Oregon, EEUU).

b) Determinación de la actividad:

El siguiente paso es determinar la actividad del complejo I mitocondrial. Para ello primero deberemos crear una curva patrón con concentraciones de muestra conocidas y determinar qué cantidad de proteína es la adecuada para cargar en los pocillos de la microplaca cuando determinemos las muestras. Cuando obtengamos una concentración de la curva patrón en la que la señal se satura, la cantidad de proteínas a cargar será la inmediatamente anterior a la concentración de saturación de la señal. Los siguientes pasos se deberán realizar tanto para la realización de la curva como para la determinación de las muestras:

1. Añadir la cantidad de proteína elegida en un pocillo de la microplaca.
2. Diluir la muestra añadida hasta 25 μ l con tampón A.
3. Mezclar los 25 μ l de muestra en tampón A y 25 μ l de tampón B en el pocillo de la placa y agitar.
4. Colocar la lámina de nitrocelulosa en el pocillo colocando el borde inferior en el fondo del pocillo.
5. Dejar correr todo el volumen de muestra a través de la membrana. El proceso tarda entre 15 y 45 minutos dependiendo de la viscosidad de la muestra.
6. Añadir 30 μ l de tampón C al pocillo con la membrana.
7. Dejar subir el tampón a través de la membrana durante 10 minutos.
8. Preparar el tampón de actividad mezclando los contenidos de los tubos 1, 2 y 3 siguiendo la tabla:

Tabla 6. Proporciones de reactivos necesarias para elaborar el reactivo de trabajo para el complejo I.

Volumen del tampón de actividad	Tubo1(μ L)	Tubo2(μ L)	Tubo3 (mL)
5mL	100	50	4.85
10mL	200	100	9.7

9. Añadir 300 μ l del tampón de actividad en un pocillo nuevo.
10. Quitar la almohadilla de fieltro de la lámina.
11. Colocar la lámina en el pocillo con el tampón de actividad. El anticuerpo frente al complejo I está localizado a unos 7 mm del borde inferior de la lámina.
12. Dejar actuar durante 30 a 45 minutos.
13. Añadir 300 μ l de agua bidestilada a un nuevo pocillo.
14. Una vez pasados los 30 – 45 minutos, colocar las membranas en el pocillo con agua durante 10 minutos.
15. Secar la lámina y determinar la intensidad de la señal con un lector de dipsticksImmunoChromato reader MS1000 (Mitosciences Inc. Oregon, EEUU) o con otro dispositivo de imagen adecuado.

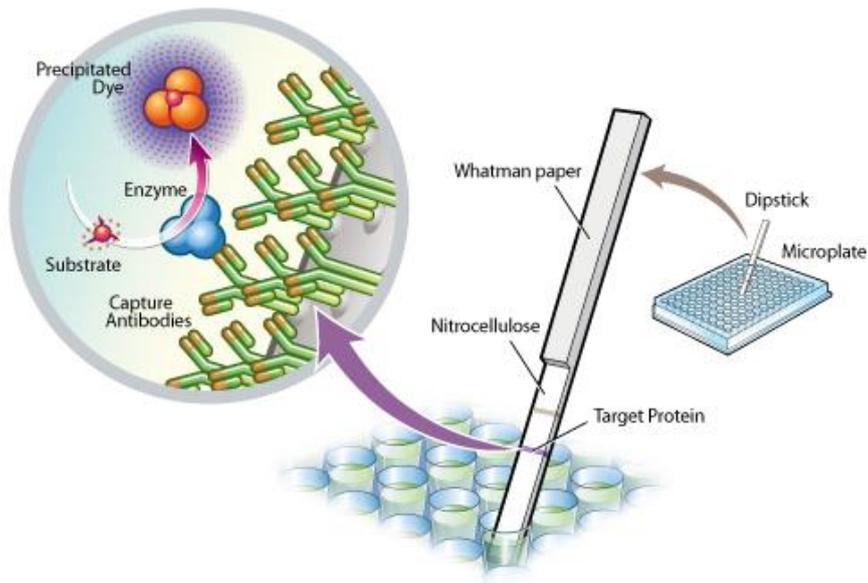


Figura 31. Esquema general de la reacción producida en la lámina. El anticuerpo captura al complejo, con actividad enzimática. Al añadir sustrato, se produce un compuesto coloreado que precipita en la lámina y da el color cuya intensidad determinará la actividad del complejo.

Fundamento del ensayo en el complejo IV

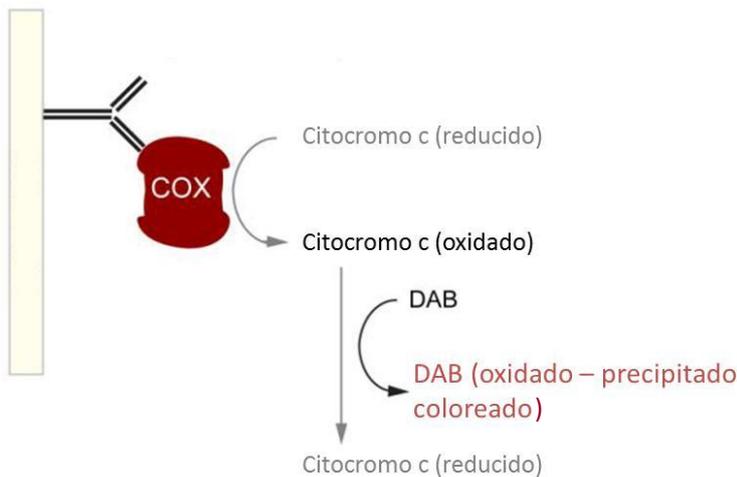


Figura 32. Esquema de la reacción de determinación de la actividad para el complejo IV de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. El anticuerpo presente en la lámina captura al complejo IV. Al añadir citocromo c, sustrato del complejo IV, el complejo IV oxida al citocromo c. El citocromo c oxidado se reduce ahora, oxidando a un compuesto, el DAB, que en su forma oxidada forma un precipitado de color, que dará la banda cuya intensidad mediremos para obtener el dato de la actividad del complejo IV.

Material y métodos

Para el complejo IV, el proceso es similar al complejo I. En este caso, el complejo IV se une al anticuerpo de la lámina. En el pocillo donde se va a producir la reacción hay citocromo c reducido y di amino bencidina tetracloruro (DAB). El complejo IV oxida al citocromo c reducido, que al estar oxidado, oxida al DAB y produce un precipitado de un color rojizo en la lámina (figuras 32 y 33).

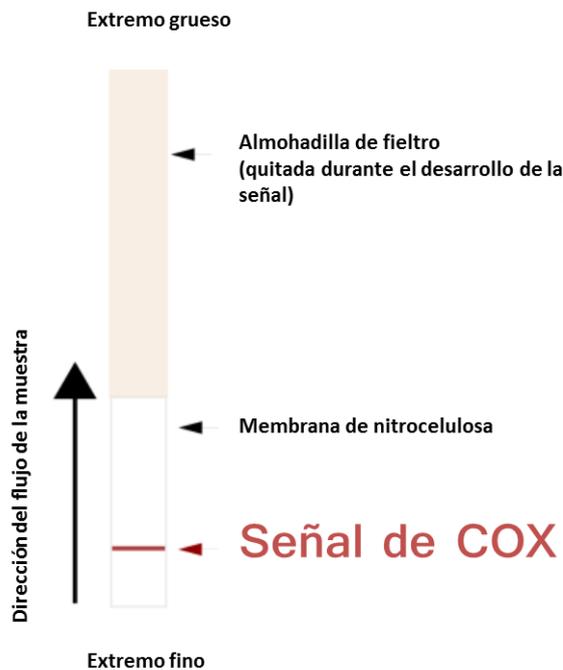


Figura 33. Dibujo esquemático de la lámina donde se produce la reacción entre el complejo IV y el citocromo c, que proporcionará la medida de la actividad del complejo IV.

Protocolo experimental para el complejo IV

El procedimiento es exactamente igual que para el complejo I, exceptuando los reactivos de los tubos 1 y 2.

Al igual que para el complejo I, deberemos crear una curva patrón para determinar qué cantidad de proteína hay que cargar en los pocillos al determinar las muestras. El protocolo también se deberá seguir tanto para elaborar la curva patrón como para las muestras:

1. Añadir la cantidad de proteína elegida en un pocillo de la microplaca.
2. Diluir la muestra añadida hasta 25 μl con tampón A.

Material y métodos

3. Mezclar los 25 μL de muestra en tampón A y 25 μL de tampón B en el pocillo de la placa y agitar.
4. Colocar la lámina de nitrocelulosa en el pocillo colocando el borde inferior en el fondo del pocillo.
5. Dejar correr la todo el volumen de muestra a través de la membrana. El proceso tarda entre 15 y 45 minutos dependiendo de la viscosidad de la muestra.
6. Añadir 30 μL de tampón C al pocillo con la membrana.
7. Dejar subir el tampón a través de la membrana durante 10 minutos.
8. Preparar el tampón de actividad mezclando los contenidos de los tubos 1, 2 y 3 siguiendo la tabla:

Tabla 7. Proporciones de reactivos necesarias para elaborar el reactivo de trabajo para el complejo IV.

Volumen del tampón de actividad	Tubo1(μL)	Tubo2(μL)	Tubo3 (mL)
5mL	50	250	4.7
10mL	100	500	9.4

9. Añadir 300 μL del tampón de actividad en un pocillo nuevo.
10. Quitar la almohadilla de fieltro de la lámina.
11. Colocar la lámina en el pocillo con el tampón de actividad. El anticuerpo frente al complejo IV está localizado a unos 7 mm del borde inferior de la lámina.
12. Dejar actuar durante 30 a 45 minutos.
13. Añadir 300 μL de agua bidestilada a un nuevo pocillo.
14. Una vez pasados los 30 – 45 minutos, colocar las membranas en el pocillo con agua durante 10 minutos.
15. Secar la lámina y determinar la intensidad de la señal con un lector de dipsticksImmunoChromatoreader MS1000 (Mitosciences Inc. Oregon, EEUU) o con otro dispositivo de imagen adecuado.

3.14. ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS MEDIANTE GC/MS

Los grupos acilo de los lípidos mitocondriales del corazón fueron analizados como derivados de metilester por GC/MS como se describió previamente³⁷¹. La separación se realizó en una columna capilar SP2330 (30 m x 0.25 mm 9 0.20 lm) en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard GC Serie II (Agilent, Barcelona, España). Se usó un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5973A como detector en el modo impacto electrónico.

La identificación de los metil esteres se hizo comparándolos con patrones y según el principio de la espectrometría de masas. Los perfiles de ácidos grasos mitocondriales fueron expresados como mol %. Los siguientes índices de acilos grasos fueron también calculados: ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos no saturados (UFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), ácidos grasos poliinsaturados desde n-3 y n-6 (PUFAn-3 y PUFAn-6); longitud media de la cadena (ACL)= $[(\Sigma\%Total14 \times 14) + (\Sigma\%Total16 \times 16) + (\Sigma\%Total18 \times 18) + (\Sigma\%Total20 \times 20) + (\Sigma\%Total22 \times 22)]/100$; índice de doble enlace (DBI)=[$(1 \times \Sigma mol\% \text{ monoenoico}) + (2 \times \Sigma mol\% \text{ dienoico}) + (3 \times \Sigma mol\% \text{ trienoico}) + (4 \times \Sigma mol\% \text{ tetraenoico}) + (5 \times \Sigma mol\% \text{ pentaenoico}) + (6 \times \Sigma mol\% \text{ hexaenoico})$], e índice de peroxidabilidad (PI)= [$(0.025 \times \Sigma mol\% \text{ monoenoico}) + (1 \times \Sigma mol\% \text{ dienoico}) + (2 \times \Sigma mol\% \text{ trienoico}) + (4 \times \Sigma mol\% \text{ tetraenoico}) + (6 \times \Sigma mol\% \text{ pentaenoico}) + (8 \times \Sigma mol\% \text{ hexaenoico})$].

3.15. DETECCIÓN DE APOPTOSIS IN-SITU

Secciones de tejido cardíaco se tiñeron usando el ensayo TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT) dUTP-nick-endlabeling), mediante un kit comercial de detección de apoptosis (Genscript, New Jersey, USA).

Protocolo experimental

1. Eliminar la cera y rehidratar las secciones de tejido aplicando calor durante 30 minutos a 60°C.
2. Rehidratar lavando 2 veces en xileno durante 5 minutos y luego en etanol variando la concentración gradualmente (primero etanol 100%, luego al 95%, 90%, 80% y 70%) durante 5 minutos cada lavado.
3. Incubar los tejidos con 200 ml de tampón citrato 0,1 M (pH 6) en un recipiente de plástico. Irradiar a 750w durante un minuto.

Material y métodos

4. Añadir 80 ml de agua bidestilada al recipiente de plástico y dejar atemperar hasta temperatura ambiente, una vez la temperatura del agua se haya estabilizado, transferir las secciones de tejido a otro recipiente de plástico con PBS.
5. Incubar con tampón de bloqueo II durante 30 minutos a 15-25°C.
6. Enjuagar las secciones de tejido 2 veces durante 5 minutos con PBS. Mantener los alrededores de las muestras secos.
7. Añadir 50 µl de mezcla de reacción TUNEL a las muestras. Colocar un cubreobjetos sobre las muestras e incubar durante 60 minutos a 37°C en humedad y oscuridad.
8. Lavar las muestras 3 veces durante 5 minutos con PBS. Volver a mantener la zona circundante de las muestras seca.
9. Añadir 50 µl de solución Estreptavidina-HRP a las muestras. Incubar durante 30 minutos a 37°C en humedad y oscuridad.
10. Lavar las muestras 3 veces durante 5 minutos con PBS.
11. Añadir 50 µl de solución DAB e incubar durante un mínimo de 30 segundos y un máximo de 5 minutos a 15-25°C.
12. Lavar las muestras 3 veces durante 5 minutos con PBS.
13. Colocar un cubreobjetos sobre el portaobjetos de las muestras y analizarlas empleando un microscopio óptico.

Reactivos

- **Tampón de bloqueo II (pH 7,5)**
 - Tris-HCl 0,1 M.
 - BSA 3 %.
 - Suero bovino fetal 20 %.
- **Mezcla de reacción TUNEL**
 - 45 µl de tampón equilibrador.
 - 1 µl de biotin-11-dUTP.
 - 4 µl de TdT pH 7,2 (150 mM KCl, 1mM 2-mercaptoetanol y 50 % glicerol en 60 mM de KPBS).
- **Solución de estreptavidina**
 - 0,5 µl estreptavidina-HRP.
 - 99,5 µl PBS.
- **Solución de trabajo DAB**

Material y métodos

2,5 µl de DAB-A en 50 µl de agua bidestilada.

2,5 µl de DAB-B.

2,5 µl de DAB-C.

Los tejidos los evaluó un patólogo. En los casos en los que fue posible, se contaron al menos 1000 células cardíacas y el índice apoptótico se obtuvo calculando el porcentaje de células apoptóticas positivas.

3.16. WESTERN BLOTTING

Fundamento

La técnica de western blotting consiste en la realización de una electroforesis a las muestras que se van a analizar sobre un gel de acrilamida que sirve de soporte para el avance de las proteínas durante el proceso. Con esto, pretendemos separar las diferentes proteínas que se encuentran en la muestra para poder detectar la proteína de interés. Posteriormente, y para facilitar el manejo de las muestras, se realiza una transferencia aplicando una corriente eléctrica de las proteínas desde el gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Una vez hecho esto, se incuba la membrana con un anticuerpo primario frente a la proteína que se desee detectar, un anticuerpo secundario que se une al primario y que se encuentra unido a peroxidasa de rábano, que va a reaccionar con el reactivo de quimioluminiscencia para dar la imagen deseada.

Se les realizó la técnica de western blotting a las muestras de tejido cardíaco para determinar la expresión de determinadas proteínas relacionadas con el estrés oxidativo y la biogénesis mitocondrial.

Protocolo experimental

1. Preparación de las muestras junto con tampón reductor (XT reducing agent. Bio-Rad Laboratories. Madrid, España) y tampón de carga (XT Sample Buffer, 4x. Bio-Rad Laboratories. Madrid, España) para permitir la movilidad de las proteínas en el gel.
2. Carga de las muestras en el gel de acrilamida (Bio-Rad CriterionPrecastGel. Bio-Rad Laboratories. Madrid, España.) junto con tampón de electroforesis.
3. Realizar la electroforesis en una cubeta de electroforesis (Bio Rad Criterion™ Cell. Bio-Rad Laboratories. Madrid, España.) a 200 V.

Material y métodos

4. Realizar la transferencia en una cubeta para transferencia (Bio Rad Criterion™ Blotter. Bio-Rad Laboratories. Madrid, España.) de las proteínas del gel a la membrana de PVDF (Bio-Rad Criterion Gel BlottingPVDF. Bio-Rad Laboratories. Madrid, España.) con tampón de transferencia, manteniendo constante un amperaje de 0,45 A.
5. Una vez terminada la transferencia, bloquear la membrana en tampón de bloqueo a 4°C para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo a la membrana.
6. Tras el bloqueo, lavar la membrana con tampón tris salino (TBS) para eliminar los restos del tampón de bloqueo.
7. Preparar el anticuerpo primario. Cada anticuerpo deberá prepararse a una dilución determinada, según el tipo de anticuerpo y las especificaciones de la casa comercial.
8. Insertar la membrana en una bolsa de plástico termosellable, añadir el anticuerpo y sellar la bolsita para que el anticuerpo quede dentro.
9. Mantener en agitación a 4°C el tiempo necesario según las especificaciones del anticuerpo, normalmente durante 24 horas.
10. Una vez terminada la unión al primer anticuerpo, abrir la bolsa y sacar la membrana. Realizar 3 lavados de 5 minutos cada uno en tampón Tris salino Tween (TBS-T).
11. Preparar el anticuerpo secundario (BioRadImmuno-StarGoat Anti-Mouse-HRP conjugate. Bio-Rad Laboratories. Madrid, España.) a una dilución 1:40000 en TBS-T y verterlo sobre la membrana en un recipiente, para permitir que el anticuerpo secundario se una al primario. Mantener 60 minutos en agitación a temperatura ambiente.
12. Transcurridos los 60 minutos, lavar la membrana 2 veces durante 5 minutos con TBS-T y 1 vez con TBS durante 5 minutos para eliminar los restos de anticuerpo secundario que no se hayan unido al anticuerpo primario.
13. Añadir el reactivo de quimioluminiscencia (Immuno-Star™ HRP Chemiluminescence Kits. Bio-Rad Laboratories. Madrid, España.) sobre la membrana durante 5 minutos, transcurridos los cuales se procederá al revelado de la membrana en una unidad capturadora de imágenes LAS-4000 Mini (Fujifilm. Tokio, Japón).

Reactivos

- **Tampón de electroforesis**
Tris base (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU.).
Glicina (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU.).
SDS (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU.).
- **Tampón de transferencia pH 8,3**
Metanol 20% (HPLC-gradiente PAI-ACS. Panreac®. Panreac Química S.L.U. Barcelona, España.).
Tris/glicina (Tris/glycine buffer, 25 mM Tris, 192 mM glycine. Bio-Rad Laboratories. Madrid, España.).
- **Tampón de bloqueo pH 7,6**
Leche descremada (Blotting-Grade Blocker, Bio-Rad Laboratories. Madrid, España.).
Tris base 0,02 M (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU.).
NaCl 0,137 M (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU.).
Tween 20 0,01 % (Bio Rad Laboratories. Madrid, España.).
- **Tampón Tris Salino (TBS) pH 7,6**
Tris base 0,02 M (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU.).
NaCl 0,137 M (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU.).
- **Tampón Tris salino Tween (TBST) pH 7,6**
Tris base 0,02 M (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU.).
NaCl 0,137 M (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU.).
Tween 20 0,01 % (Bio Rad Laboratories. Madrid, España.).

Anticuerpos primarios

- Factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), ratón monoclonal, dilución 1:200 (Santa Cruz Biotechnology®, inc. California, EEUU.).
- Factor nuclear 2 (derivado de eritrocito 2) (Nrf2), ratón monoclonal, dilución 1:1000 (Abcamplc. Cambridge, Reino Unido.).
- β -actina, ratón monoclonal, dilución 1:500 (Abcamplc. Cambridge, Reino Unido.).

3.16.1. ANÁLISIS DE LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES Y EL FACTOR INDUCTOR DE APOPTOSIS (AIF)

La concentración de los complejos mitocondriales I a IV y AIF se estimó mediante la técnica de Western Blot descrita por Caro y col.³⁷³ Los anticuerpos primarios usados fueron:

Anticuerpos primarios

- Anticuerpo monoclonal específico para la subunidad (NDUFA9) de 39 KDa y la subunidad (NDUFS3) de 30 KDa del complejo I, dilución 1:1000 en ambos casos. (Molecular Probes, Invitrogen Ltd, UK).
- Subunidad de 70 KDa del complejo II (Flavoproteína), dilución 1:500. (Molecular Probes, Invitrogen Ltd, UK).
- Subunidad (Core II) de 48 KDa y la subunidad 29 KDa (proteína Rieske hierro-azufre) del complejo III, dilución 1:1000 en ambos casos. (Molecular Probes, Invitrogen Ltd, UK).
- Subunidad (COXI) del complejo IV, dilución 1:1000. (Molecular Probes, Invitrogen Ltd, UK).
- Anticuerpo monoclonal específico para C-terminus (aminoácidos 593-613) de AIF, dilución 1:1000 (Sigma, Madrid, España).
- Anticuerpo para la porina, dilución 1:5000 (Molecular Probes, Invitrogen Ltd, UK) como control para la cantidad total de mitocondria se usó también para determinar las proporciones de complejo I, II, III, IV y AIF referidas a la masa mitocondrial total.

También se usaron anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa y sustrato (Millipore, MA, USA) para la detección de los anticuerpos primarios.

La cuantificación de la señal y la grabación se hicieron con equipo ChemiDocBiorad (Laboratorios Biorad, Inc. Barcelona, España). La concentración de proteínas se determinó por el método Bradford (Pierce Biotechnology, 3747 N. Meridian Road, Rockford, IL 61105 USA).

3.17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados representan la media y el error estándar de la media. Antes de realizar el análisis estadístico, se comprobó la normalidad y homogeneidad de las variables usando los test de Kolmogorov–Smirnov y Levene. Cuando una variable no seguía una distribución normal, se transformó y se volvió a analizar. Se buscaron diferencias significativas ($P < 0.05$) mediante un análisis de varianzas (ANOVA). Para evaluar las diferencias entre medias entre grupos, se realizó un test de Bonferroni. Todas aquellas variables histopatológicas, actividades de los complejos I y IV y las que no siguieron una normalidad se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y el test U-Mann-Whitney. Para realizar todo esto se usó el programa informático SPSS (SPSS para Windows, 15.0, 2006; SPSS, Inc., Chicago, IL).

4. RESULTADOS

4.1. APARICIÓN DE TUMORES

El modelo de carcinogénesis mamaria inducida con DMBA muestra que todos los animales con cáncer en el momento basal presentaron valores de multiplicidad tumoral similares entre los grupos de experimentación. El volumen de partida del tumor fue prácticamente el mismo (2 cm^3), de hecho, no hubo diferencias significativas entre grupos con respecto a este parámetro.

4.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE HIDROXITIRO SOL Y SU METABOLITO ALCOHOL HOMOVANÍLICO

Como queda reflejado en la Figura 34, el hidroxitirosol fue el compuesto hallado de forma mayoritaria, seguido de alcohol homovanílico. El grupo HT es el que más cantidad de hidroxitirosol conservó, siendo significativa con respecto a DOX+HT. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre los de tratamiento en relación al alcohol homovanílico.

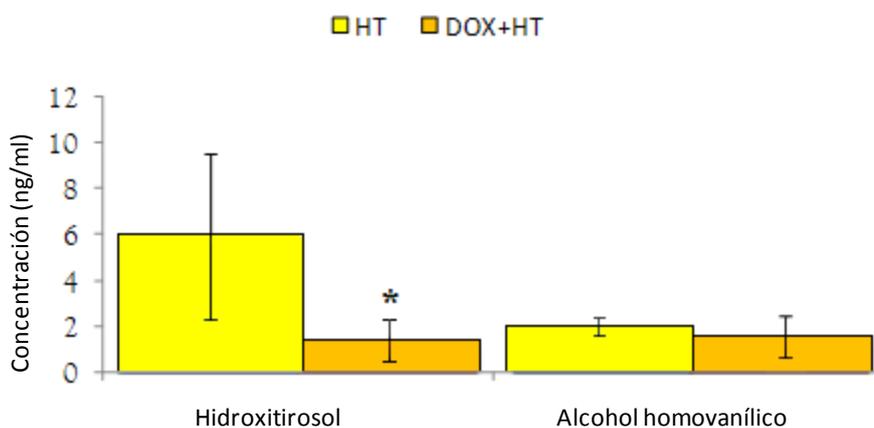


Figura 34. Niveles de hidroxitirosol y su metabolito alcohol homovanílico en plasma en los grupos tratados con hidroxitirosol e hidroxitirosol con doxorubicina.

4.3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PLASMÁTICOS. PESO CORPORAL Y DEL CORAZÓN Y RELACIÓN ENTRE PESO DEL CORAZÓN/PESO CORPORAL

Respecto a los pesos corporales y de corazón, no hubo diferencias significativas en ninguno de los grupos tratados con hidroxitirosol o doxorubicina. Para los indicadores de daño cardíaco (CK, LDH, ALT y AST), la CK se presentó elevada en los grupos DOX y DOX+HT, y disminuida en el grupo HT, comparándolos con el grupo control, aunque sin diferencias significativas. Los demás parámetros tampoco presentaron diferencias relevantes (Tabla 8).

Tabla 8. Efectos de la doxorubicina, hidroxitirosol y su combinación en los parámetros plasmáticos, peso corporal y del corazón.

Grupo	Control	HT	DOX	DOX+HT
Glucosa (mg/dl)	184± 20	204± 15	251±31	302±52
Proteína total (g/dl)	4.4± 0.4	4.3± 0.3	8.7± 2.6	18.0± 6.7
CK (U/L)	103.0±17	64.0±19	164.0±45	151.0±77
LDH (U/L)	376.0±66	323.0±68	304.0±33	327.0±91
ALT (U/L)	21.9±8.5	10.7±3.5	11.3±3.9	15.0±3.8
AST (U/L)	33.6±8.9	18.9±2.8	14.9±2.7	17.7±2.9
Peso corporal (g)	271.4±8.9	266.6±7.4	256.0±3.3	253.8±6.0
Peso del corazón (g)	1.04±0.039	1.03±0.042	0.93±0.037	0.97±0.046
Relación peso corazón/corporal (mg/g)	3.88±0.2	3.88±0.1	3.63±0.13	3.82±0.17

Los valores están expresados como la media ± EEM. Las letras, cuando son diferentes, representan diferencias significativas (P<0.05). Control: grupo control; HT: grupo de ratas tratadas con hidroxitirosol; DOX: grupo de ratas tratadas con doxorubicina; DOX+HT: grupo de ratas tratadas con doxorubicina e hidroxitirosol. CK: creatin quinasa; LDH: lactato deshidrogenasa; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa.

4.4. PERFIL LIPÍDICO EN CORAZÓN

Los valores de ácidos grasos de la membrana mitocondrial de las células cardíacas no presentaron diferencias, ni tampoco con respecto al índice de peroxidabilidad o al de doble enlace (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto de la doxorubicina, hidroxitirosol y su combinación sobre la composición (%) de ácidos grasos del total de lípidos en corazón.

	<i>Control</i>	<i>HT</i>	<i>DOX</i>	<i>DOX+HT</i>
14:0	1.18±0.12	1.10±0.07	1.22±0.13	1.12±0.19
16:0	21.38±1.18	22.08±0.70	23.11±1.22	23.20±1.55
16:1n-7	0.86±0.0.07	0.74±0.04	0.96±0.10	0.97±0.0.16
18:0	27.61±1.08	29.97±0.36	27.25±0.80	28.96±0.10
18:1n-9	14.34±0.45	14.39±0.60	14.76±0.75	12.79±0.84
18:2n-6	8.74±1.27	5.89±0.47	7.21±1.46	6.04±0.69
18:3n-3	0.36±0.06	0.44±0.07	0.45±0.08	0.34±0.05
18:4n-6	2.68±0.11	2.88±0.22	2.28±0.17	2.71±0.26
20:0	1.15±0.07	1.14±0.07	0.97±0.08	1.02±0.20
20:3n-6	0.26±0.03	0.22±0.01	0.20±0.02	0.23±0.01
20:4n-6	8.18±1.21	6.68±1.09	7.64±1.12	7.75±0.19
20:5n-3	0.82±0.10	0.97±0.06	0.73±0.04	0.62±0.10
22:0	1.75±0.13	2.23±0.18	1.64±0.13	1.71±0.26

Resultados

22:4n-6	0.71±0.12	0.67±0.08	0.76±0.11	0.67±0.06
22:5n-6	0.99±0.02	1.29±0.07	1.35±0.15	1.99±0.28
22:5n-3	0.99±0.08	1.09±0.10	0.98±0.11	0.98±0.07
24:0	0.31±0.02	0.34±0.05	0.39±0.06	0.47±0.08
22:6n-3	3.94±0.50	3.24±0.51	4.46±0.66	4.14±0.75
24:5n-3	1.25±0.15	1.59±0.28	1.23±0.13	1.54±0.30
24:6n-3	2.43±0.22	3.01±0.31	2.39±0.26	2.71±0.54
ACL	18.29±0.07	18.32±0.04	18.27±0.09	18.33±0.15
SFA	53.39±2.45	56.86±1.09	54.58±2.03	56.48±2.59
UFA	46.60±2.45	43.14±1.09	45.42±2.03	43.51±2.60
MUFA	15.20±0.48	15.14±0.61	15.72±0.76	13.76±0.99
PUFA	31.40±2.76	28.00±1.36	29.69±2.55	29.75±3.517
PUFAn-3	9.80±0.57	10.36±0.43	10.25±0.91	10.35±1.50
PUFAn-6	21.59±2.31	17.64±1.45	19.45±2.03	19.41±2.11
DBI	135.40±9.21	127.98±5.62	133.72±9.75	135.85±15.65
PI	132.14±9.44	128.31±5.46	132.20±11.71	137.78±18.85

Valores expresados como \pm EEM. ACL: longitud de la cadena acilica; SFA: ácidos grasos saturados, UFA ácidos grasos insaturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; DBI: índice de doble enlace; PI: índice de peroxidabilidad. Control: grupo control; HT: grupo de ratas tratadas con hidroxitirosol DOX: grupo tratado con doxorubicina; DOX+HT: grupo de ratas tratadas con doxorubicina e hidroxitirosol.

4.5. DAÑO CARDÍACO MEDIANTE ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Los resultados muestran que el tratamiento crónico con bajas dosis de doxorubicina no provocó daños importantes en el corazón de las ratas. Además, no hay mejora de la histopatología del corazón de las ratas después de haber usado hidroxitirosol en combinación con doxorubicina. Las lesiones en los miocitos fueron leve vacuolización e infiltrado

Resultados

inflamatorio como se observa en la figura 35. Así mismo, no hubo diferencias significativas en cuanto al grado de Billingham entre los grupos DOX ($0,75 \pm 0,163$) y DOX+HT ($0,938 \pm 0,147$). Los datos muestran en ambos grupos una histopatología cardíaca algo anormal pero sin daño debido a DOX, y una afectación de menos del 5% de los miocitos por daño debido a DOX. Tampoco se vio ningún daño a nivel macroscópico en las ratas control o en las ratas tratadas solamente con hidroxitirosol (valor 0 en la escala Billingham para ambos grupo) (figura 36).

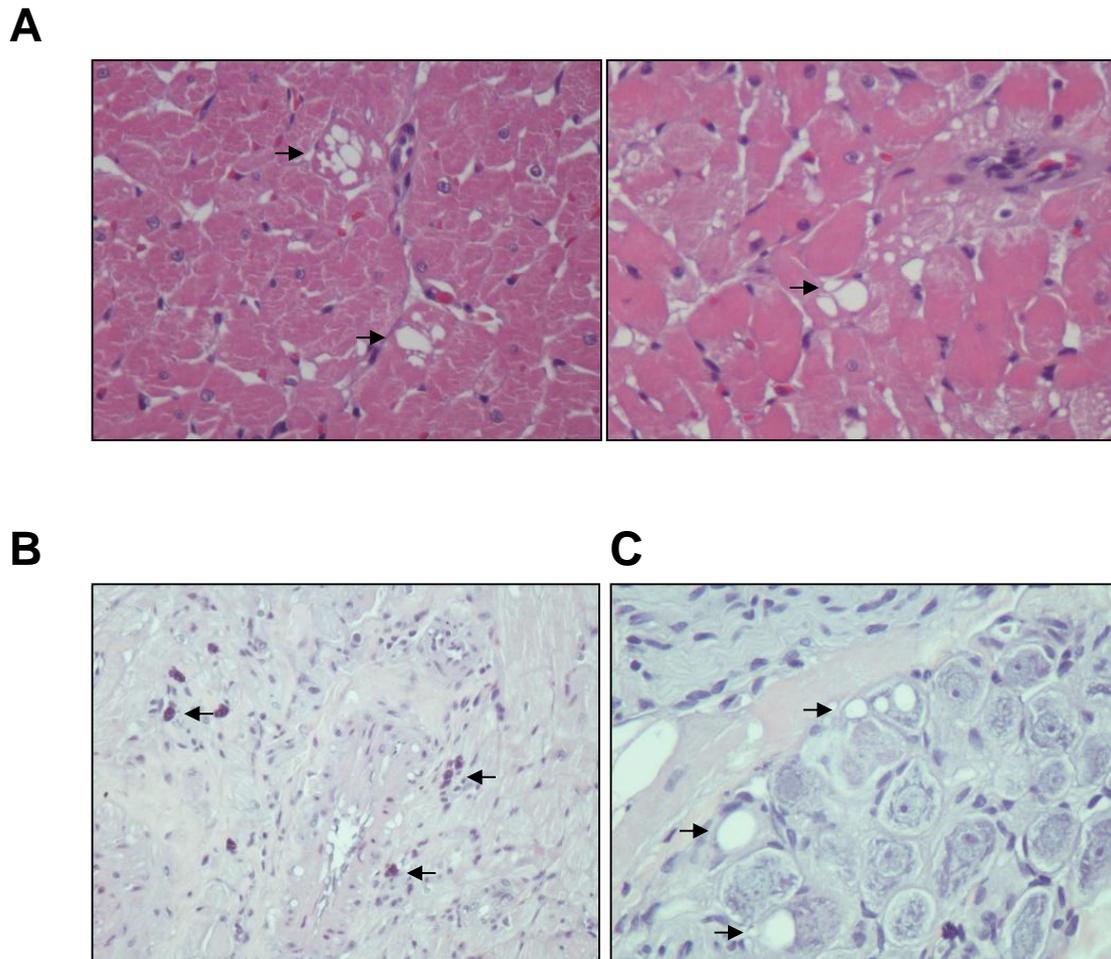


Figura 35. Tinción hematoxilina-eosina de tejido cardíaco de rata tras un tratamiento crónico con doxorubicina. Las flechas indican vacuolización citoplasmática en el cardiomiocito (A), infiltrado inflamatorio (B), vacuolización de neuronas del atrio, (C) aumento: 40x.

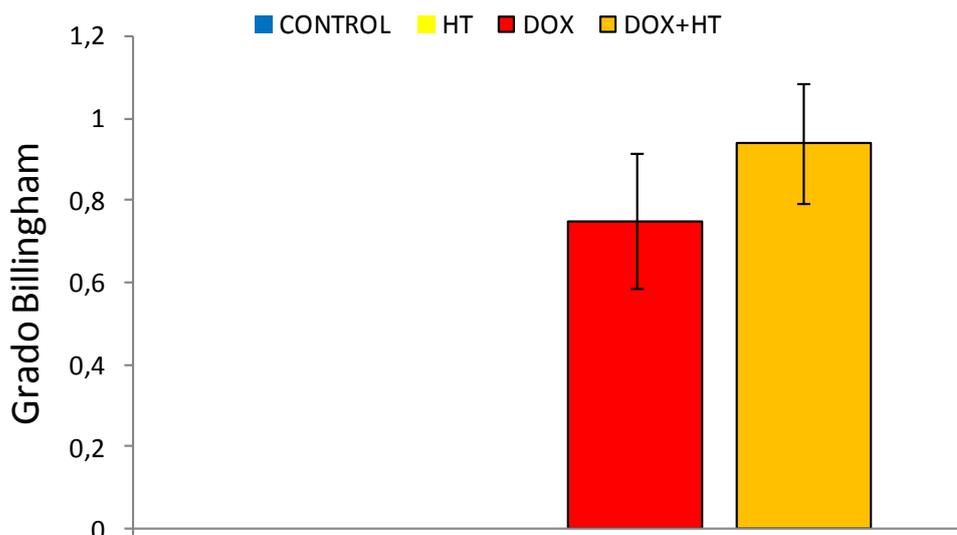


Figura 36. Grado Billingham, indicador del grado de daño producido por la doxorubicina sobre los cardiomiocitos. Los valores están expresados como media \pm EEM de un n=5 muestras por grupo. Control: grupo control; HT: grupo de ratas tratadas con hidroxitirosol; DOX: grupo de ratas tratadas con doxorubicina; DOX+HT: grupo de ratas tratadas con doxorubicina e hidroxitirosol.

4.6. ULTRAESTRUCTURA MITOCONDRIAL

A nivel ultraestructural, podemos ver el efecto pernicioso que ejerce la doxorubicina, alterando la estructura mitocondrial³⁷⁴. Mientras que en los grupos control e HT no se observan alteraciones en la estructura mitocondrial, en los grupos DOX y DOX + HT sí se pueden apreciar (el cuadrado rojo indica alteraciones del volumen con vacuolización mitocondrial producidos por la administración de doxorubicina y la flecha blanca indica una disminución en el grado de alteración de las mitocondrias cardíacas, con una menor vacuolización, gracias al efecto de la combinación de hidroxitirosol con doxorubicina) (Figura 37A). En lo que se refiere al área mitocondrial (Figura 37B), los valores más altos se encontraron para el grupo DOX, pero no eran estadísticamente significativos frente al grupo control ni HT. La administración conjunta de doxorubicina e hidroxitirosol produjo un descenso significativo del área mitocondrial frente al grupo de DOX. En relación al porcentaje de mitocondria alterada (Figura 37C), la doxorubicina indujo un aumento significativo en la alteración del número de mitocondrias en comparación con el grupo control e HT. Cuando se administraron conjuntamente hidroxitirosol y doxorubicina, se encontró una tendencia a la reducción en la cantidad de mitocondrias alteradas, que no era significativa estadísticamente.

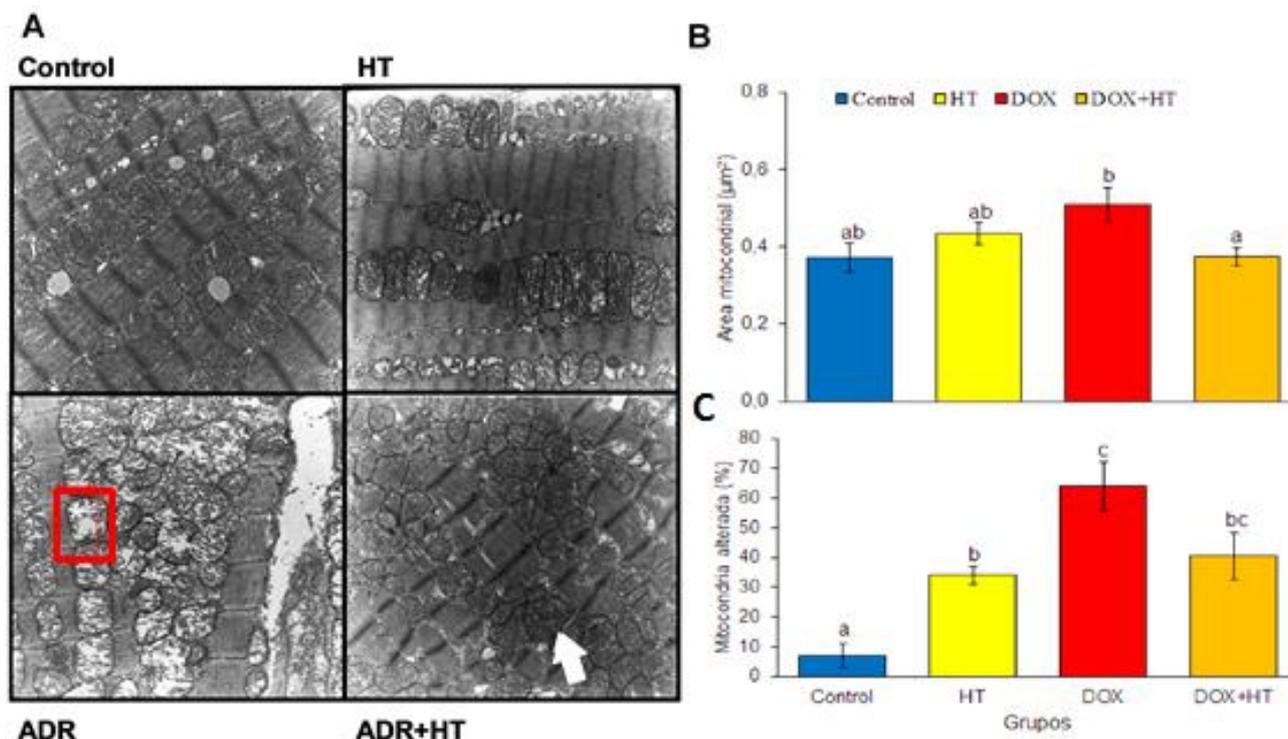


Figura 37. Efecto de la doxorubicina, hidroxitirosol y su combinación en la ultraestructura mitocondrial en corazón (A), área mitocondrial (B), porcentaje de mitocondria alterada (C). Aumento: 40.000X. Los valores se expresan como media \pm EEM. Las letras, cuando son diferentes, representan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Control: grupo control; HT: grupo de ratas tratadas con hidroxitirosol; DOX: grupo de ratas tratadas con doxorubicina; DOX+HT: grupo de ratas tratadas con doxorubicina e hidroxitirosol.

4.7. DAÑO DE MARCADORES PROTEICOS POR OXIDACIÓN

Se investigó la existencia de oxidación en aminoácidos de proteínas, en particular, proteínas carbonilo derivadas de oxidación proteica catalizada por metales³⁷³, como el semialdehído glutámico (GSA), que deriva de la oxidación catalizada por metales de la prolina y la arginina, y el semialdehído aminoadípico (AASA), que proviene de la oxidación de la lisina. Las rutas químicas que relacionan el incremento de flujo de radicales libres y la modificación estructural de proteínas también engloba terceras moléculas, que pueden dar lugar a un incremento en la cantidad de carbonilos reactivos en proteínas³⁷⁵. En particular, investigamos la concentración de aductos de Nε-(carboxietil)-lisina (CEL) y Nε-(carboximetil)-lisina (CML), previamente descritos como productos finales derivados de la glicooxidación. Finalmente, el daño proteico derivado de la lipooxidación fue determinado mediante GC/MS mediante el estudio de MDA, Nε-malonildialdehído-lisina (MDA)³⁷³.

Resultados

Los valores más altos de proteínas carbonilo glutámicas (GSA) se encontraron en el grupo DOX (3818.6 ± 694.8 $\mu\text{mol/mol}$ de lisina), pero no fueron significativas comparadas con el grupo control (2424.9 ± 131.1 $\mu\text{mol/mol}$ de lisina) y el grupo HT (2697.6 ± 141.8 $\mu\text{mol/mol}$ de lisina). La menor cantidad de GSA se encontró en el grupo DOX+HT (2180.2 ± 178.8 $\mu\text{mol/mol}$ de lisina) con quien sí mostró diferencias estadísticamente significativas (figura 38).

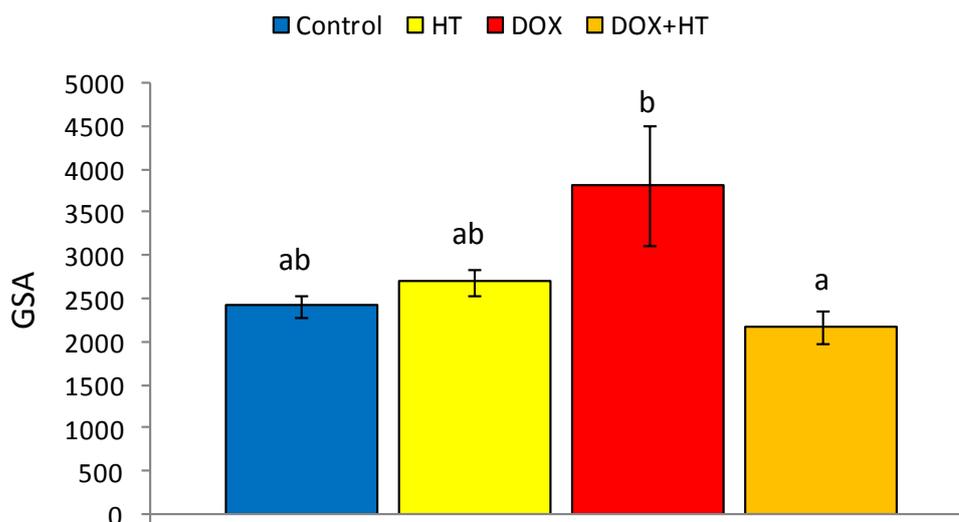


Figura 38. Niveles de GSA en las ratas de experimentación. Los valores se expresan como media \pm EEM. Las letras, cuando son diferentes, representan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Control: grupo control; HT: grupo de ratas tratadas con hidroxitirosol; DOX: grupo de ratas tratadas con doxorubicina; DOX+HT: grupo de ratas tratadas con doxorubicina e hidroxitirosol.

La mayor cantidad de AASA se encontró en el grupo DOX (444.5 ± 53.0 $\mu\text{mol/mol}$ de lisina), difiriendo significativamente del resto de los grupos. En los otros grupos, control (302.9 ± 10.8 $\mu\text{mol/mol}$ de lisina), HT (260.5 ± 7.8 $\mu\text{mol/mol}$ de lisina) y DOX + HT (325.0 ± 6.5 $\mu\text{mol/mol}$ de lisina), los valores no tuvieron diferencias significativas entre ellos (figura 39).

Resultados

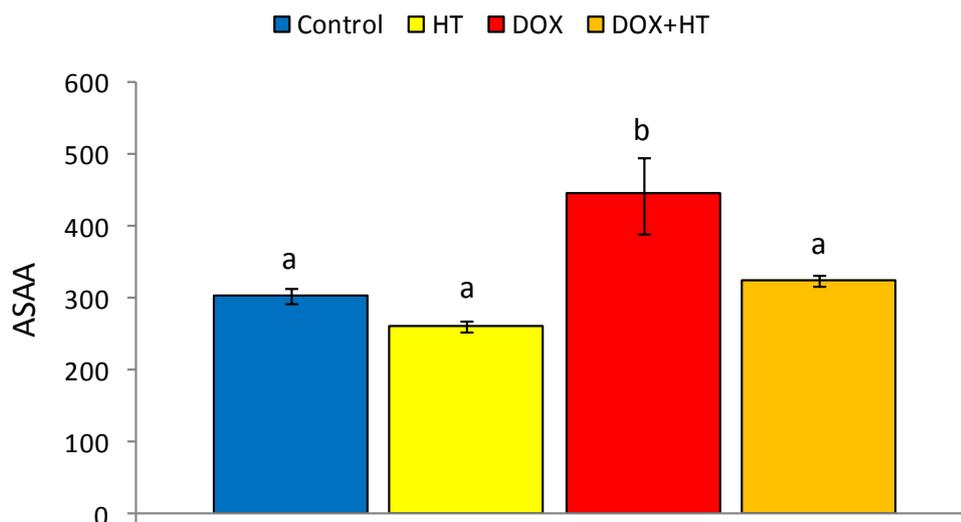


Figura 39. Niveles de ASAA en las ratas de experimentación. Los valores se expresan como media \pm EEM. Las letras, cuando son diferentes, representan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Control: grupo control; HT: grupo de ratas tratadas con hidroxitirosol; DOX: grupo de ratas tratadas con doxorubicina; DOX+HT: grupo de ratas tratadas con doxorubicina e hidroxitirosol.

El grupo DOX también presentó mayores niveles de CEL ($521.3 \pm 39.8 \mu\text{mol/mol}$ de lisina), marcador de glicoxidación, comparado con el grupo control ($382.8 \pm 2.9 \mu\text{mol/mol}$ de lisina) y el HT ($354.8 \pm 53.0 \mu\text{mol/mol}$ de lisina), pero no fue significativo comparado con el grupo DOX+HT ($424.8 \pm 29.1 \mu\text{mol/mol}$ de lisina), y éste a su vez no se diferenció significativamente de los grupos control e HT (figura 40).

Resultados

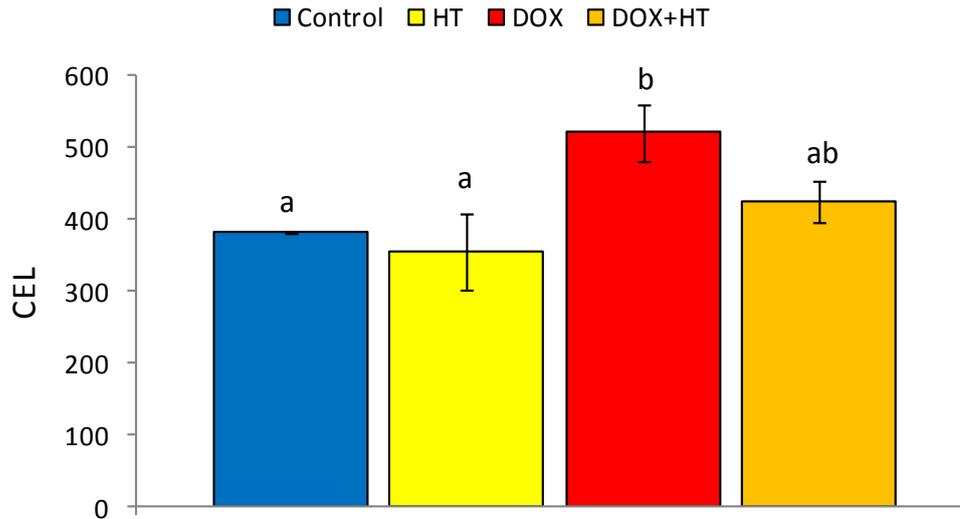


Figura 40. Niveles de CEL en las ratas de experimentación. Los valores se expresan como media \pm EEM. Las letras, cuando son diferentes, representan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Control: grupo control; HT: grupo de ratas tratadas con hidroxitirosol; DOX: grupo de ratas tratadas con doxorubicina; DOX+HT: grupo de ratas tratadas con doxorubicina e hidroxitirosol.

Para CML, de nuevo encontramos mayor cantidad el grupo DOX (1279.1 ± 109.9 $\mu\text{mol/mol}$ de lisina), que volvió a diferenciarse significativamente del grupo DOX + HT (911.8 ± 3.7 $\mu\text{mol/mol}$ de lisina). Los grupos control (949.4 ± 10.4 $\mu\text{mol/mol}$ de lisina), HT (747.5 ± 52.1 $\mu\text{mol/mol}$ de lisina) y DOX + HT no presentaron diferencias entre ellos (figura 41).

Resultados

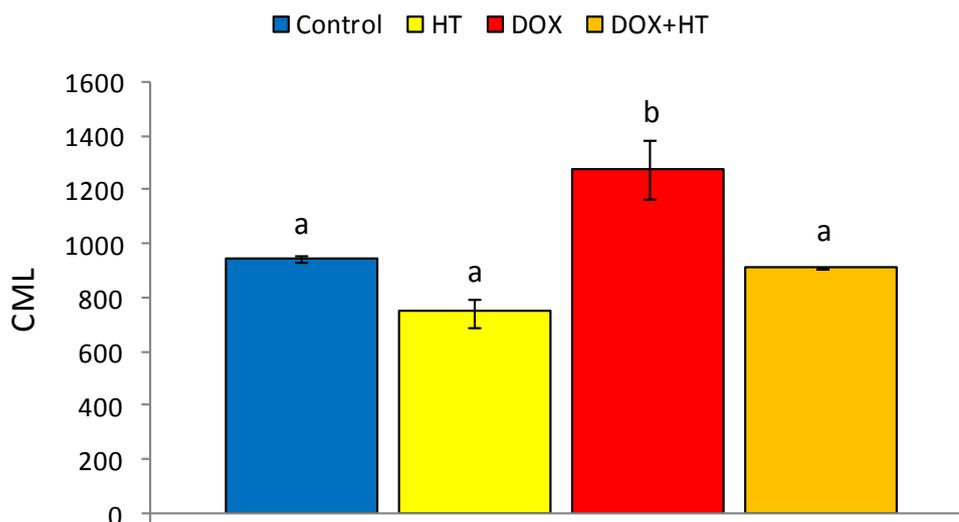


Figura 41. Niveles de CML en las ratas de experimentación. Los valores se expresan como media \pm EEM. Las letras, cuando son diferentes, representan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Control: grupo control; HT: grupo de ratas tratadas con hidroxitirosol; DOX: grupo de ratas tratadas con doxorubicina; DOX+HT: grupo de ratas tratadas con doxorubicina e hidroxitirosol.

Finalmente, el producto de lipooxidación MDA se obtuvo en mayor medida en el grupo DOX ($505.6 \pm 39.6 \mu\text{mol/mol}$ de lisina) en comparación con los otros grupos. No hubo diferencias entre los grupos control ($305.1 \pm 13.0 \mu\text{mol/mol}$ de lisina), HT ($269.4 \pm 10.6 \mu\text{mol/mol}$ de lisina) y DOX+HT ($346.4 \pm 17.7 \mu\text{mol/mol}$ de lisina) para este último marcador (figura 42).

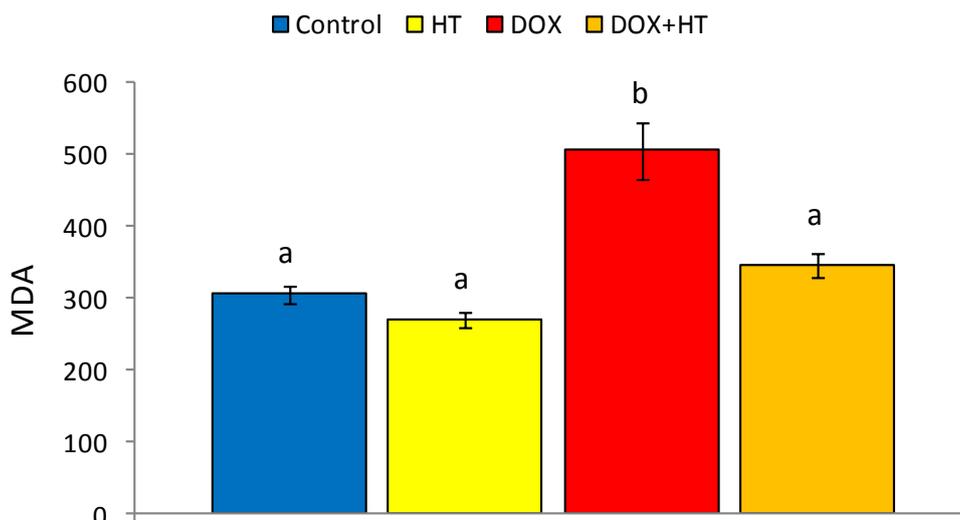


Figura 42. Niveles de MDA en las ratas de experimentación. Los valores se expresan como media \pm EEM. Las letras, cuando son diferentes, representan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Control: grupo control; HT: grupo de ratas tratadas con hidroxitirosol; DOX: grupo de ratas tratadas con doxorubicina; DOX+HT: grupo de ratas tratadas con doxorubicina e hidroxitirosol.

4.8. COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL Y FACTOR INDUCTOR DE APOPTOSIS

El contenido de complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial se presenta en la figura 43. Los resultados muestran que no hubo diferencias significativas entre los grupos con respecto a la cantidad de complejo I, aunque la menor cantidad se encontró para el grupo HT, observándose una leve tendencia a la baja en el caso de la subunidad NDUFA9 (figura 43A). La otra subunidad del complejo I determinada presentó una mayor cantidad en el grupo DOX+HT con respecto a los demás grupos, siendo los valores del grupo control, HT y DOX similares (figura 43B). En el caso del complejo II, el grupo DOX+HT mostró la mayor cantidad, seguido del grupo DOX, en contradicción con el grupo control e HT, que presentaron menor cantidad de este complejo (figura 43C). La mayor cantidad de sub-unidad COREII del complejo III se encontró en el grupo control, donde la menor cantidad fue para el grupo HT, seguido por el grupo DOX y luego el DOX+HT (Figura 43D). Con respecto a la sub-unidad Rieske, el grupo HT presenta el valor más bajo, mientras que los grupos DOX y DOX+HT no presentan diferencias frente al control (figura 43E). Para el último complejo estudiado, el IV (Figura 43F), encontramos menor contenido mitocondrial en todos los grupos tratados (HT, DOX y DOX+HT) con respecto al grupo control, pero no hubo diferencias significativas entre los

Resultados

grupos tratados. El efecto de los diferentes tratamientos sobre AIF se muestra en la figura 44. No se observan diferencias significativas entre el grupo control, el grupo DOX y el grupo DOX+HT. El contenido de AIF fue estadísticamente menor en el grupo HT frente a los demás grupos.

Resultados

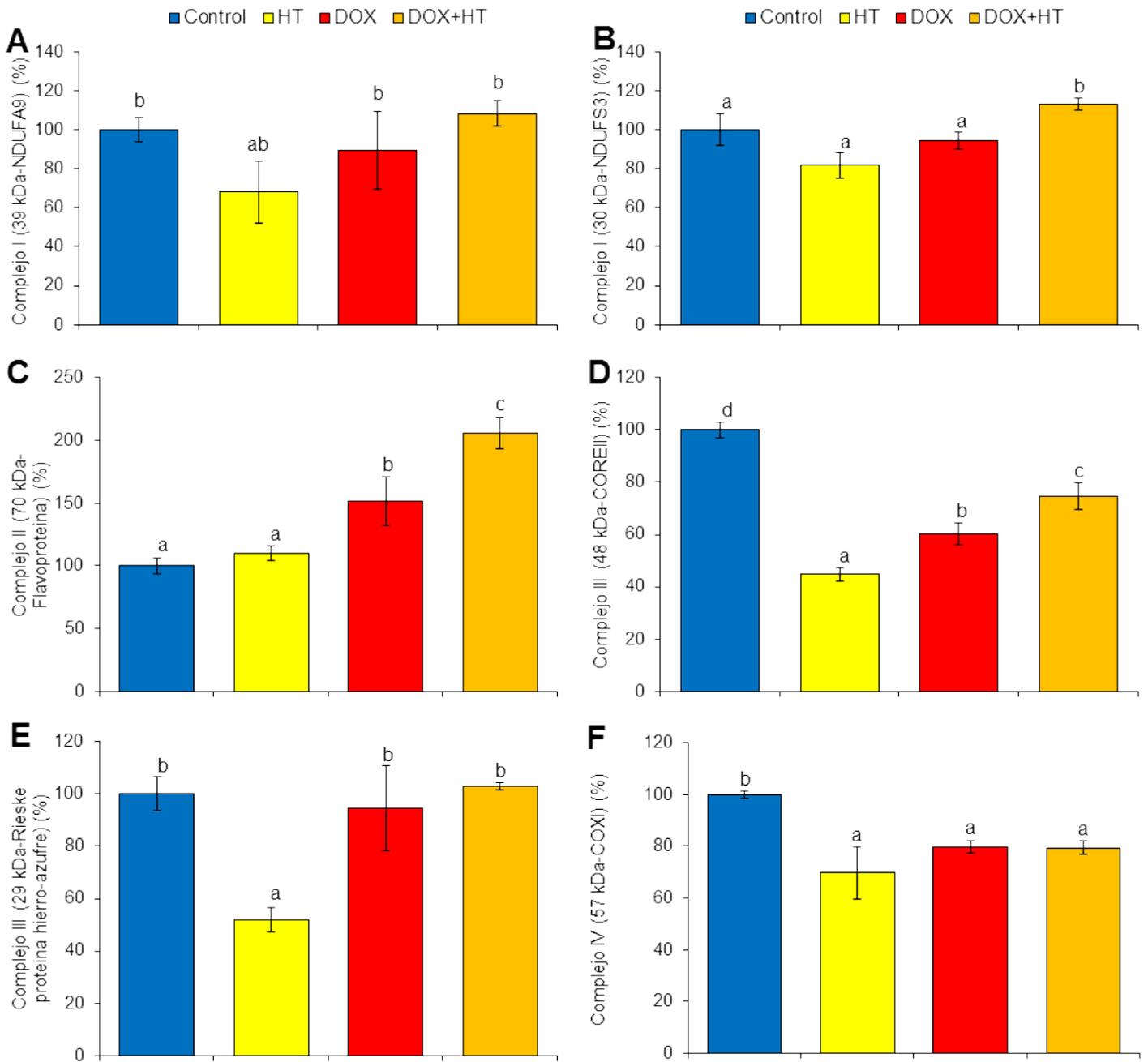


Figura 43. Efectos de adriamicina, hidroxitirosol y su combinación sobre la cantidad de complejo mitocondrial I (Sub-unidad de 39 KDa, NDUFA9) (A), I (Sub-unidad de 30 KDa, NDUFS3) (B), II (Sub-unidad de 70 KDa, Flavoproteína) (C), III (Sub-unidad de 48 KDa, COREII) (D), III (Sub-unidad de 29 KDa, Rieske) (E), IV (Sub-unidad de 57 KDa, COXI) (F) en corazón. Los valores están expresados como media \pm EEM de un n=5 muestras por grupo. Las barras con diferentes letras difieren significativamente entre grupos ($P < 0.05$). Control: grupo control; HT: grupo de ratas tratadas con hidroxitirosol; DOX: grupo de ratas tratadas con doxorubicina; DOX + HT: grupo de ratas tratadas con doxorubicina e hidroxitirosol.

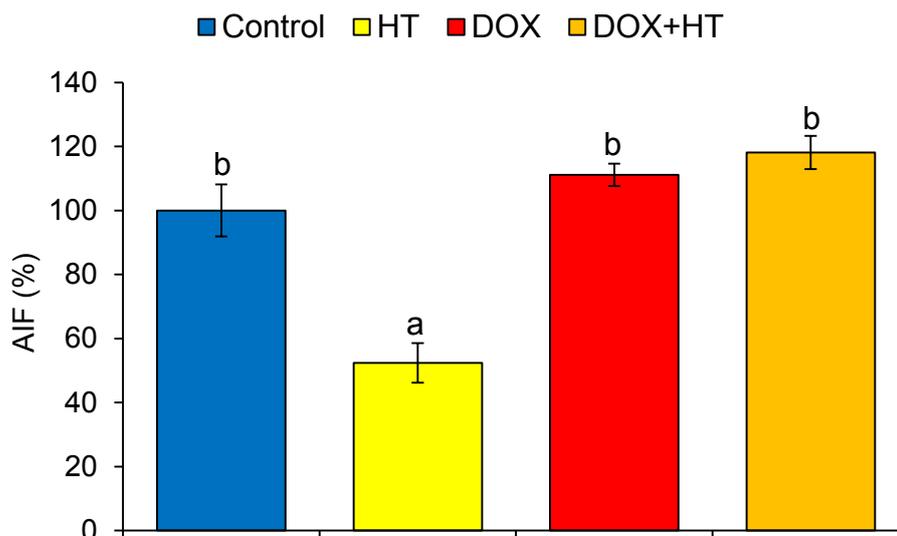


Figura 44. Efecto de la adriamicina, hidroxitirosol y su combinación en los niveles de AIF en corazón. Los valores están expresados como media \pm EEM de un n=5 muestras por grupo. Las barras con diferentes letras difieren significativamente entre grupos ($P < 0.05$). Control: grupo control; HT: grupo de ratas tratadas con hidroxitirosol; DOX: grupo de ratas tratadas con doxorubicina; DOX + HT: grupo de ratas tratadas con hidroxitirosol y doxorubicina.

4.9. ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES I Y IV

Los resultados de actividad del complejo I mitocondrial muestran una disminución significativa en todos los grupos respecto al control. El grupo HT, DOX y DOX+HT no presentaban diferencias entre ellos (Figura 45).

Para el complejo IV, la actividad del grupo HT no disminuyó con respecto al control, pero sí que lo hicieron el grupo DOX y el DOX+HT, no habiendo diferencias significativas entre estos 2 últimos grupos.

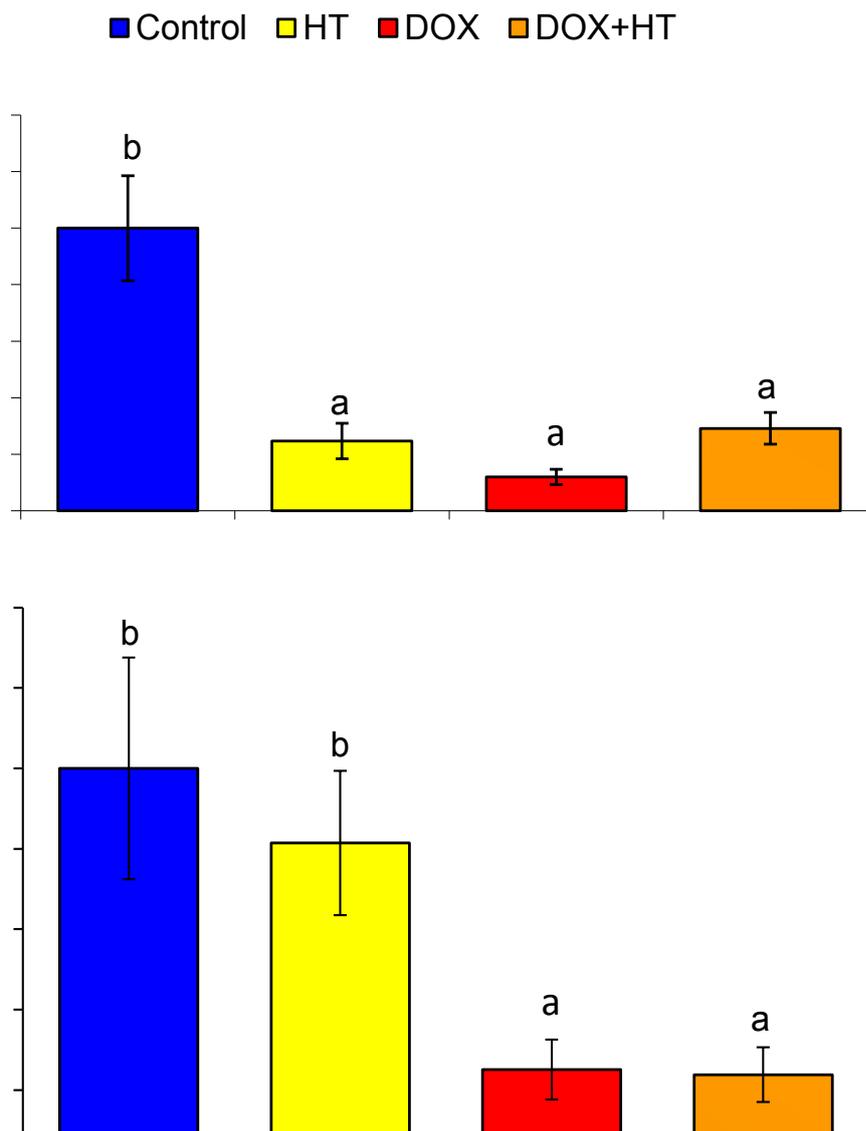


Figura 45. Efecto del hidroxitirosol, doxorubicina y su combinación sobre la actividad del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Los valores están expresados como media \pm EEM de un n=5 muestras por grupo. (A) Efecto del hidroxitirosol, doxorubicina y su combinación sobre la actividad del complejo IV de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. (B) Control: grupo control; HT: grupo de ratas tratadas con hidroxitirosol; DOX: grupo de ratas tratadas con doxorubicina; DOX + HT: grupo de ratas tratadas con doxorubicina e hidroxitirosol.

4.10. DETECCIÓN *IN SITU* DE APOPTOSIS

Uno de los mecanismos de toxicidad cardíaca atribuidos a la doxorubicina se apoya en la teoría de los radicales libres, según la cual, esta antraciclina genera una elevada cantidad de ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN) a nivel mitocondrial¹⁹⁸. Como consecuencia de este elevado nivel de estrés oxidativo, las células miocárdicas activan rutas de apoptosis³⁷⁶. En

Resultados

la mitocondria, las ERO y ERN tienen efectos dañinos sobre enzimas clave que aumentan los niveles de radicales libres intracelulares. Este aumento en la generación de radicales libres lleva a una liberación de factores apoptóticos como AIF, y por lo tanto a rutas apoptóticas caspasa dependientes o independientes³⁷⁷.

Para determinar si dosis crónicas de hidroxitirosol, dosis crónicas y clínicamente relevantes de doxorubicina, y su combinación, producían miocitos apoptóticos, realizamos un ensayo TUNEL en tejido cardíaco embebido en parafina.

Nuestros resultados mostraron que no hubo diferencias entre los niveles de apoptosis de cardiomiocitos control positivos y ninguno de los grupos tratados con doxorubicina, por lo cual, no se produjo apoptosis (figura 46).

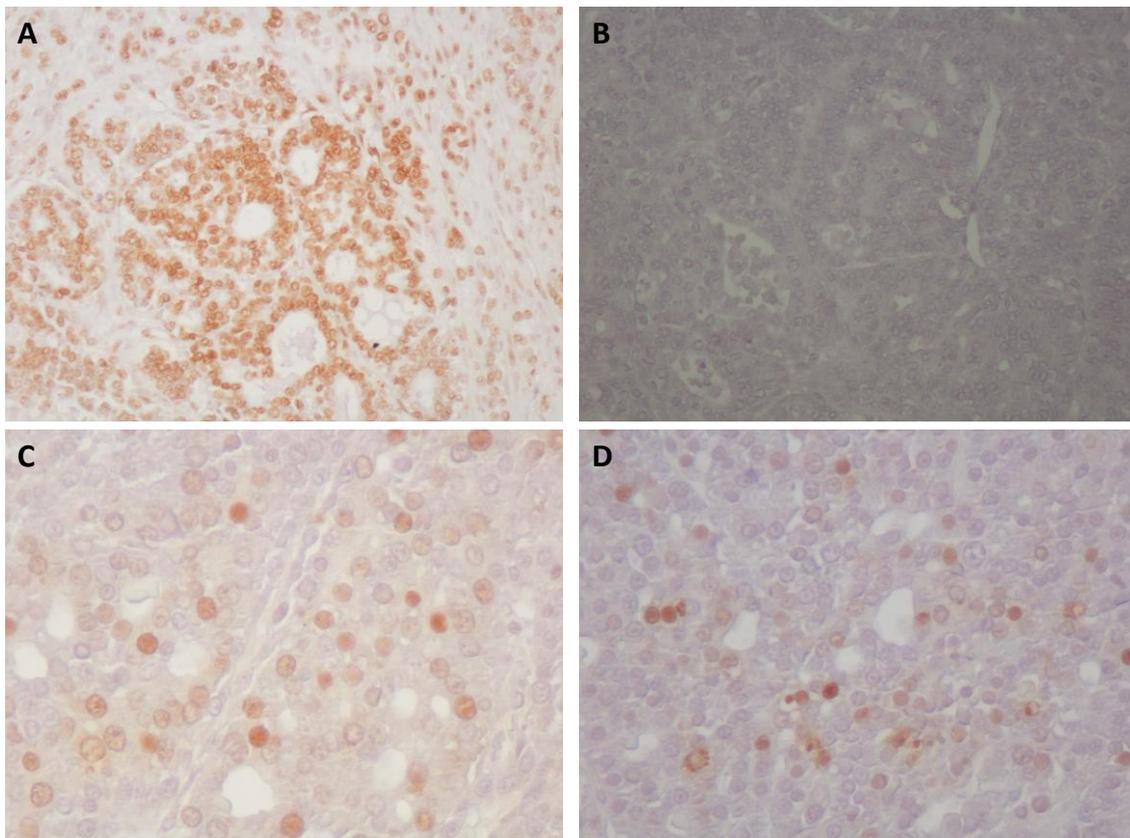


Figura 46. Imágenes de cardiomiocitos mediante el ensayo TUNEL para la detección de apoptosis. (A), control positivo (B), control negativo (C), grupo DOX (D), grupo DOX + HT.

4.11. WESTERN BLOT

TFAM

Los resultados de la producción de la proteína TFAM muestran un aumento de la síntesis de esta proteína en el grupo DOX con respecto a los grupos DMBA e HT y no se encontraron diferencias de expresión entre el grupo DOX y el grupo DOX+HT (figura 47).

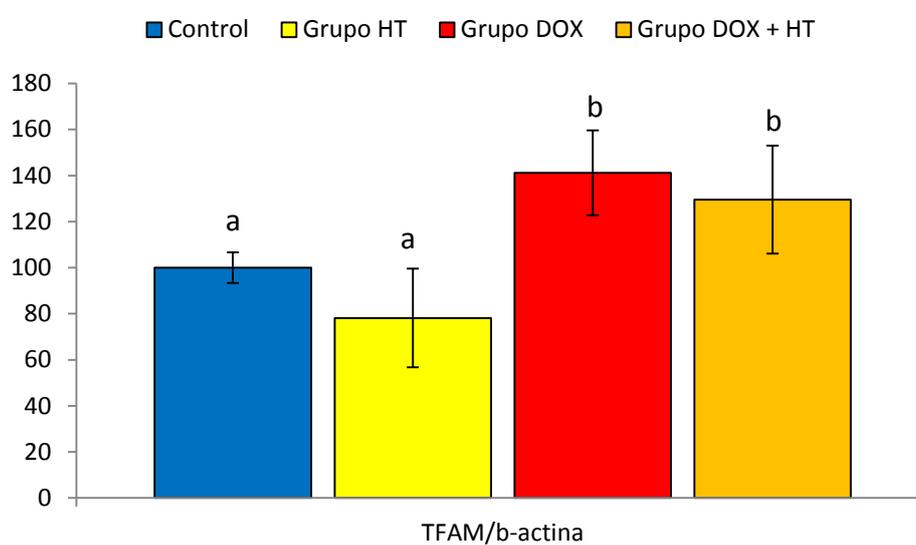


Figura 47. Expresión de la proteína TFAM en muestras de tejido cardíaco. Los valores están expresados como media \pm EEM de un n=5 muestras por grupo. DMBA: Grupo de ratas control tratadas con DMBA; HT: grupo de ratas tratadas con hidroxitirosol; DOX: grupo de ratas tratadas con doxorubicina; DOX + HT: grupo de ratas tratadas con hidroxitirosol y doxorubicina.

Nrf2

La expresión de Nrf2 revela diferencias significativas entre el grupo DOX y DOX+HT, siendo la expresión de Nrf2 más elevada en el grupo DOX. No hay diferencias entre los grupos DMBA, HT y DOX, ni entre los grupos HT y DOX+HT (figura 48).

Resultados

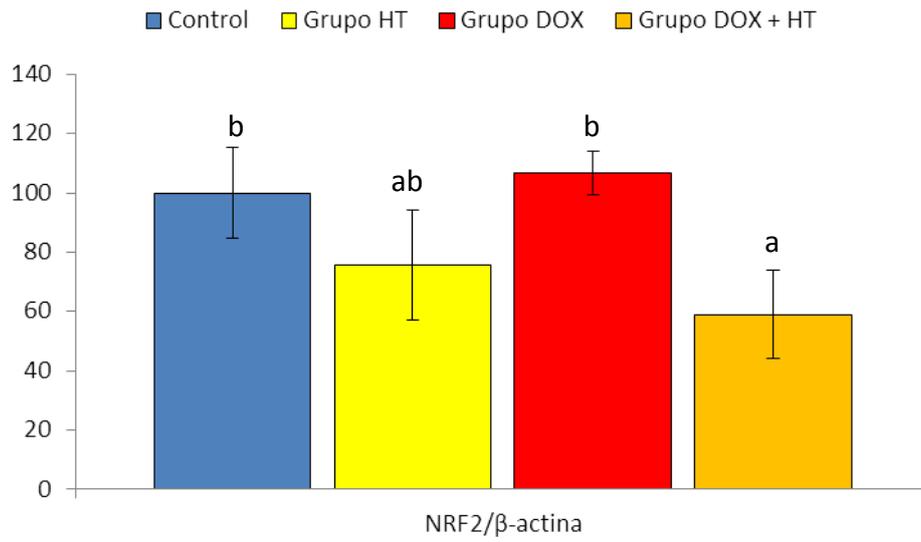


Figura 48. Expresión de la proteína Nrf2 en muestras de tejido cardíaco. Los valores están expresados como media \pm EEM de un n=5 muestras por grupo. DMBA: Grupo de ratas control tratadas con DMBA; HT: grupo de ratas tratadas con hidroxitirosol; DOX: grupo de ratas tratadas con doxorubicina; DOX + HT: grupo de ratas tratadas con hidroxitirosol y doxorubicina

5. DISCUSION

El cáncer de mama es una de las enfermedades más frecuentes en los países desarrollados, y constantemente se investigan nuevos métodos y fármacos para combatirlo. Por desgracia, estos fármacos, como la doxorubicina, tienen numerosos efectos secundarios que afectan a la calidad de vida del paciente y por lo tanto, al progreso de la enfermedad.

La reducción de la cardiotoxicidad producida por doxorubicina mediante la administración de hidroxitirosol sería una gran ventaja para mejorar la salud y evolución de los pacientes que reciban esta medicación.

5.1. CUANTIFICACIÓN PLASMÁTICA DE HIDROXITIRO SOL Y ALCOHOL HOMOVANÍLICO.

La mayor presencia de hidroxitirosol en el plasma de los animales pertenecientes al grupo HT con respecto a los de DOX+HT, indica que la tasa de metabolización fue superior en las ratas de este último grupo. Esto podría deberse al aumento de los sistemas de detoxificación del organismo como consecuencia de la presencia de doxorubicina³⁷⁸. Lo anterior explicaría por qué los niveles de hidroxitirosol fueron inferiores en el grupo DOX+HT, que tendrían elevados estos sistemas de eliminación de tóxicos, y por tanto se vería acelerado el metabolismo del HT.

Si el metabolismo está incrementado en el grupo DOX+HT, lo normal sería hallar mayores niveles de metabolitos. Sin embargo, lo anterior no fue hallado en relación al alcohol homovanílico, cuya baja presencia podría explicarse teniendo en cuenta los resultados de Miro-Casas y colaboradores. Estos autores describen que a las 8 horas tras la administración de 25ml de aceite de oliva, los niveles de este metabolito del hidroxitirosol alcanzan en algunos casos concentraciones similares al límite de cuantificación²⁹⁹

Además de lo anterior, habría que tener en cuenta que la última administración de hidroxitirosol en nuestros animales se hizo como mínimo 24 horas antes del sacrificio. Los estudios de determinación de hidroxitirosol y sus metabolitos, se llevan a cabo en plasma de sangre recogida minutos después de la administración del compuesto. La tesis doctoral realizada por González-Santiago muestra en un estudio de absorción realizado en ratas con 25 μ moles de HT la presencia de este compuesto y sus derivados a los 5 minutos tras su

administración. La administración de una solución acuosa de 2.5mg/kg de hidroxitirosol a humanos produjo un aumento de las concentraciones plasmáticas de hidroxitirosol y alcohol homovanílico inmediatamente después de su consumo³⁷⁹. Esta razón podría explicar las bajas cantidades encontradas para ambos compuestos en el plasma de nuestros animales.

5.2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Como se ha descrito en los resultados, la tabla 8 muestra los valores de los parámetros bioquímicos indicadores de daño en el tejido cardíaco. No se pudo corroborar con otros trabajos la eficacia del hidroxitirosol sobre la reducción de los niveles de los marcadores de daño cardíaco frente a doxorubicina porque no existen estudios en los que se implique a estas 2 sustancias conjuntamente. No obstante, no se observan diferencias significativas entre los grupos en ninguno de los marcadores (CK, LDH, ALT y AST), en concordancia con otro estudio³⁸⁰ en el que se contrastaba el efecto protector del fulerenol frente a la doxorubicina a dosis crónicas (1,5 mg/Kg a la semana durante 3 semanas, para una dosis acumulativa total de 4,5 mg/Kg), ni tampoco en el peso corporal o del corazón de los animales ni en el perfil lipídico. La falta de significación de estos parámetros de daño cardíaco indica una ausencia de destrucción de células del miocardio. Sí se encuentran elevaciones en los niveles de CK, LDH, ALT y AST en estudios en los que la dosis de doxorubicina administrada a ratas Wistar es más elevada (15 mg/Kg de dosis i.p. acumulada en 2 semanas)³⁸¹ o en los que se administró a ratas Wistar una única dosis i.p. de 15 mg/Kg³⁸² o de 20 mg/Kg i.p.^{383, 384} frente a la dosis de 1 mg/Kg semanalmente i.v. durante 7 semanas utilizadas en este estudio.

Con respecto al peso corporal y del corazón de las ratas, no hubo variaciones entre grupos. Otros tratamientos con dosis crónicas de doxorubicina a 1 mg/Kg i.v. revelan una disminución del peso de los animales a partir de la 6ª semana de la administración³⁸⁵. En un estudio de Campos y col.³⁸⁶, dosis acumulativas de doxorubicina i.p. de 3,75; 7,5 y 15 mg/Kg durante 2 semanas a ratas produjeron una disminución del peso de las ratas mayor cuanto más alta fue la dosis, aunque no provocaron una disminución de la relación peso del corazón/peso corporal con respecto al grupo control.

El peso corporal y del corazón varía en otros estudios^{168, 368}, en el que el peso disminuye progresivamente después del tratamiento. Esto indica que la reducción de peso se produce tiempo después de la administración.

Discusión

El perfil lipídico no se modificó en ninguno de los grupos experimentales. Se podría esperar una alteración en la composición lipídica de la membrana mitocondrial de los cardiomiocitos en los grupos DOX y DOX + HT, producida por la generación de ERO y consiguiente lipoperoxidación pero en este estudio no ocurrió. En un estudio llevado a cabo en ratas Sprague-Dawley con dosis agudas de doxorubicina i.p. (5 mg/Kg 2 veces a la semana durante 2 semanas) sí encuentran un aumento en la cantidad de ácidos grasos totales, especialmente de los C16 y C18³⁸⁷, algo que también se produce en varios experimentos realizados en cultivos celulares de cardiomiocitos de ratas Wistar expuestos a dosis de 10⁻⁶ M de doxorubicina durante 24 horas. Además de la elevación en los niveles de ácidos grasos C16 y C18, también se registraron aumentos en la cantidad de ácido araquidónico (20:4n-6), ácido adrenico (22:4n-6) y una disminución en el índice de insaturación³⁸⁸. En otro experimento llevado a cabo por Bordoni y col.³⁸⁹, se cultivaron también cardiomiocitos de ratas Wistar pero con varias concentraciones: una concentración de 10⁻⁵ M y otra menor de 10⁻⁷ M de doxorubicina. No se observaron cambios en el perfil lipídico al cabo de 1 hora, pero sí a las 24 horas. Se produjeron alteraciones en la cantidad de ácidos grasos C16, C18:2, C20:4n-6, C20:5n-3, C22:4n-6, C22:5n-3 y en el índice de insaturación. A una dosis de 10⁻⁵ M, hubo una mayor alteración sobre la composición de ácidos grasos de los cardiomiocitos.

En este estudio, los niveles de afectación del tejido cardíaco a nivel macroscópico, medido por el grado Billingham, mostraron ciertos niveles de daño en los cardiomiocitos pero fueron bajos. Hay muchos estudios en los que se describe la relación dosis-tiempo en la aparición de daño cardíaco tras la administración de doxorubicina. Lebrech y col.³⁹⁰, usando una dosis y tiempo similar a este estudio (1 mg/Kg de doxorubicina i.v. durante 7 semanas), compararon la dependencia de la producción de daño por parte de la doxorubicina sobre el tejido cardíaco con el tiempo tras el tratamiento. Estos autores mostraron que el daño producido aumentaba progresivamente hasta las 30 semanas tras la administración de doxorubicina, mientras que el grupo que recibió el tratamiento y fue sacrificado inmediatamente tras la última administración, presentó sólo alteraciones leves. Della Torre y col.³⁶⁸, utilizaron al igual que en este estudio, una pauta de administración de 1 mg/Kg de doxorubicina i.v. durante 7 semanas a las ratas de experimentación. El resultado del análisis histopatológico mostró un incremento del daño a las 8 semanas, un mayor daño a las 12 semanas y aun mayor a las 26 semanas tras la administración del fármaco. En efecto, Herman y col.³⁸⁵, también obtienen resultados parecidos usando dosis crónicas de 1 mg/Kg i.v. y observan un aumento de las lesiones producidas en el miocardio a causa de la administración de la doxorubicina tras 12 semanas de tratamiento. En otro estudio llevado a cabo por Aversano y Boor³⁹¹, se compara el efecto de

Discusión

tratamientos agudos con doxorubicina a diferentes dosis y tiempos frente a tratamientos crónicos también a diferentes dosis y tiempos. En el estudio se pone de manifiesto la clara dependencia del daño producido por la doxorubicina sobre la histopatología cardíaca con el tipo de tratamiento realizado. Tanto a dosis agudas como crónicas, el daño era mayor cuanto más dosis se administraba, y empeoraba cuanto mayor era el tiempo que transcurría desde la última administración del fármaco.

Por otro lado, en este estudio, no se observan diferencias de peso entre los animales de los grupos experimentales. Tampoco hubo, como ya hemos indicado, diferencias entre los parámetros marcadores de daño cardíaco. El estudio se realizó administrando un tratamiento a dosis bajas y crónicas y tomando las muestras una semana después de haber finalizado el tratamiento. Los estudios previamente descritos han demostrado que tanto la aparición de cardiotoxicidad como el aumento de los valores de marcadores de daño cardíaco, variaciones de peso y/o composición lipídica del cardiomiocito se producen cuando las dosis alcanzan unas concentraciones elevadas en sangre y/o al cabo de un cierto tiempo desde la administración.

A la vista de estos datos, los bajos niveles de daño sobre los cardiomiocitos en este estudio se deben a un sacrificio prematuro de los animales de experimentación, ya que el objetivo fue el de administrar un tratamiento crónico que se asemejase al tratamiento de una mujer con cáncer de mama. Las dosis crónicas y el corto periodo de tiempo desde la última administración del fármaco hasta el sacrificio de los animales posiblemente son los responsables de no observar los efectos perniciosos que ejerce la doxorubicina sobre el corazón a largo plazo y que sí se observan en otros estudios con dosis y tiempos desde la última administración mayores, aunque estos resultados han validado la dependencia de este efecto con la dosis y el tiempo.

5.3. ULTRAESTRUCTURA MITOCONDRIAL

En el presente estudio se ha estudiado el efecto de la doxorubicina a nivel ultraestructural en la mitocondria y se observó que se produce un aumento del área mitocondrial (Figura 36B)³⁹² y del número de mitocondrias alteradas (Figura 36C), que es máximo al administrar doxorubicina. Cuando se da doxorubicina conjuntamente con hidroxitirosol, disminuye el área de las mitocondrias afectadas (Figura 36B) y el número de mitocondrias afectadas (Figura 36C). Estos resultados son similares a un estudio en el que se incluía un grupo de ratas Wistar tratado con doxorubicina a una dosis i.v. de 0,8 mg/Kg y otro tratado con doxorubicina + dexrazosano. El sacrificio de las ratas se realizó 29 semanas después del tratamiento. En el grupo tratado con doxorubicina también se alteraba la estructura y morfología de la mitocondria, y se producía un efecto protector al administrar dexrazosano, potente antioxidante con propiedades cardioprotectoras¹⁶⁸. Teng y col.³⁹³ comprueban el efecto de los ácidos grasos n-3 poliinsaturados sobre la cardiotoxicidad producida por doxorubicina a una dosis algo mayor pero también crónica. En uno de los grupos, administran 2 mg/Kg i.p. de doxorubicina cada semana durante 8 semanas a ratas. La toma de muestras se produce inmediatamente después del tratamiento y tras realizar el análisis histopatológico, observan cómo se habían producido alteraciones mitocondriales en el tejido cardíaco al igual que en el estudio que se presenta.

Esto indica que los cambios a nivel ultraestructural en los cardiomiocitos tras la administración de doxorubicina empiezan a producirse rápidamente tras la administración del fármaco incluso a dosis bajas. El hidroxitirosol tiene un efecto protector sobre la estructura mitocondrial parecido al efecto del dexrazosano que protege frente al daño oxidativo producido por la doxorubicina¹⁵¹, ya que también disminuye el grado de alteración del área mitocondrial y el número de mitocondrias afectadas. Esta reducción del volumen mitocondrial es un dato importante, ya que la doxorubicina es capaz de alterar la estructura y el funcionamiento mitocondrial, produciendo la apoptosis de la célula. En este sentido, la apoptosis de los cardiomiocitos es clave en el desarrollo de cardiomiopatías en los pacientes con cáncer de mama que toman como tratamiento doxorubicina.

5.4. DAÑO OXIDATIVO EN MOLÉCULAS

La doxorubicina produce daños a nivel oxidativo¹⁶⁸, reflejado en el aumento de las moléculas que se han determinado (GSA, AASA, CML, CEL, MDA), como marcadores de daño proteico, glucídico y lipídico. Los resultados demuestran que la administración conjunta de doxorubicina e hidroxitirosol reducen los valores de manera significativa con respecto al grupo doxorubicina, evitando así parte del daño oxidativo que produce la doxorubicina sobre proteínas, glúcidos y lípidos. El aumento de estos marcadores también se produce en otros estudios en los que se emplean otras sustancias antioxidantes para prevenir el daño oxidativo producido por la doxorubicina, como en el de Moriyama y col.³⁹⁴ que tras una administración de 2 mg/Kg i.v. de doxorubicina semanalmente durante 8 semanas encuentran un incremento de la formación de CML atribuido a la producción de ERO; el de Rashikh y col.³⁹⁵, donde trataron de evitar la aparición de daño cardíaco mediante el empleo del fármaco Aliskiren. Estos autores describieron un incremento del marcador de lipoperoxidación medido como MDA tras la administración de una dosis de 20 mg/Kg de doxorubicina i.p. y un descenso en los parámetros de daño o riesgo cardíaco como LDH, MDA, aumento de GSH y mejora de la histopatología al administrar este fármaco con propiedades antioxidantes. Othman y col.³⁹⁶ emplearon melatonina para tratar de disminuir el daño de la doxorubicina. En su estudio se observa un aumento de proteínas carbonilo y otros marcadores relacionados con el estrés oxidativo como sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), GSH, glutation-S-transferasa (GST) y catalasa. En el grupo tratado con doxorubicina con una única dosis de 10 mg/Kg i.p., todos estos parámetros se ven alterados, aumentando los marcadores de daño oxidativo como proteínas carbonilo y TBARS y disminuyendo GSH, GST y catalasa. El grupo que recibió además de la dosis de doxorubicina, melatonina, vió como se atenuó este daño oxidativo del fármaco. La melatonina, con un elevado poder antioxidante fue capaz de prevenir el daño oxidativo de la doxorubicina.

Esta reducción en la oxidación de los marcadores de daño oxidativo en proteínas, glúcido y lípidos corrobora el efecto antioxidante del hidroxitirosol. Previamente, en la introducción, se describen 2 fármacos o principios activos capaces de disminuir el daño oxidativo y proteger así al cardiomiocito. Estas sustancias eran el Carvedilol^{150, 397, 398} y el Dexrazosano^{151, 168, 399}. Al igual que estas 2 sustancias y otras como ya se comentó anteriormente, el hidroxitirosol posee capacidad antioxidante y es capaz de secuestrar moléculas de hierro y radicales libres, evitando la producción de ERO y la aparición de estrés oxidativo que provoquen daños en macromoléculas del cardiomiocito. Al ser una sustancia

natural, no posee los efectos secundarios que pueda tener un fármaco sintético, aunque es cierto que tampoco posee la misma eficacia, pero es un punto de partida para el estudio de la aplicación de esta molécula producida de manera natural como sustancia antioxidante ya sea en este u otros ámbitos de la salud.

5.5. COMPLEJOS DE LA CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL Y FACTOR INDUCTOR DE APOPTOSIS

La cantidad de complejo I disminuyó de manera estadísticamente significativa cuando se administró hidroxitirosol con respecto al grupo control, pero no así en el grupo de doxorubicina y doxorubicina con hidroxitirosol (Figura 37A).

Esto lo atribuimos al AIF, que en el grupo hidroxitirosol disminuyó, de manera que la biogénesis del complejo I disminuyó un poco, aunque no de manera significativa para comprometer la función respiratoria. Esta misma disminución también la observaron Caro y col.³⁷³ en varios experimentos^{400, 401}, con ratas sometidas a restricción de aminoácidos en la dieta. Los niveles de AIF y de marcadores de estrés oxidativo también disminuyeron en sus animales, provocando una disminución de la cantidad de complejo I y de los demás complejos. Teniendo en cuenta la función pro apoptótica del AIF en situaciones de estrés oxidativo cuando se libera de la mitocondria y se transloca al núcleo, esta disminución en su cantidad puede ser importante para proteger frente a la apoptosis del cardiomiocito. Una reducción muy elevada en los niveles de AIF puede provocar serios problemas sobre el sistema nervioso central y la retina¹¹². Al haberse producido una reducción leve en la cantidad de complejo I, que no afecta al correcto funcionamiento de la cadena de transporte electrónico mitocondrial como se ha visto en los resultados de actividad del complejo I, no se compromete el normal funcionamiento de la mitocondria y por lo tanto de la célula⁴⁰². Además, el complejo I es el principal responsable de la producción de ERO en la mitocondria, junto con el complejo III, y una reducción en su cantidad supone una reducción por lo tanto de la producción de ERO, protegiendo así a la mitocondria frente al daño oxidativo⁴⁰⁰. Realmente, no se conoce el mecanismo por el cual el hidroxitirosol actúa disminuyendo la cantidad de AIF, algo que podría ser objeto de futuros estudios. Aun así, la administración de hidroxitirosol conjuntamente con doxorubicina no provocó el mismo efecto y la cantidad de AIF no disminuyó en este caso. La hipótesis que se plantea es la de la producción de estrés oxidativo en la mitocondria. Al administrar hidroxitirosol, su capacidad antioxidante disminuye los niveles de ERO en la mitocondria, y por eso, disminuye también AIF, que dentro de la mitocondria actúa también

Discusión

como antioxidante. En los estudios anteriormente comentados sobre restricción calórica y de aminoácidos, también se produce una disminución de los niveles de estrés oxidativo y de AIF conjuntamente. Según todo lo anterior, hipotetizamos que la generación de radicales libres y la disminución del estrés oxidativo, bien sea mediante restricción calórica o mediante el empleo del hidroxitirosol, es el nexo en común entre esos estudios y el nuestro y la prueba de que la disminución de AIF se produce al disminuir la generación de ERO. Cuando administramos hidroxitirosol conjuntamente con doxorubicina, la cantidad de ERO generada fue mayor y el hidroxitirosol posiblemente no fue capaz de eliminar el exceso de radicales libres en la mitocondria, sintetizándose AIF para mantener el equilibrio en los niveles de estrés oxidativo.

Para el complejo II, la cantidad de complejo en el grupo hidroxitirosol fue igual al grupo control, pero la formación de complejo aumentó en el grupo doxorubicina y más aún en el grupo doxorubicina con hidroxitirosol. En otros estudios realizados sobre cultivos celulares en cardiomiocitos de rata y preparaciones submitcondriales de corazón de vacas, se observa que tras la incubación con doxorubicina, la actividad del complejo II disminuye en ambos estudios^{182, 403}. El aumento en la cantidad de complejo II puede deberse a un intento de compensar la disminución de su actividad provocada por la doxorubicina o por la disminución de la actividad del complejo I, generando más complejo para suplir la deficiencia de transporte de electrones. Aun así, no se puede confirmar estos datos, ya que solamente se han analizado los valores de cantidad de complejo II, insuficiente para poder determinar un posible mecanismo sin margen de error.

En el complejo III, la cantidad de complejo disminuyó notablemente en el grupo hidroxitirosol con respecto al control, aumentando en el grupo doxorubicina con respecto al hidroxitirosol y aumentando en el doxorubicina con hidroxitirosol respecto al anterior.

En relación al complejo IV, los niveles de complejo se mantuvieron semejantes entre los grupos pero menores que el grupo control. Atendiendo a la comparación de Lebrech y col.³⁹⁰ entre un grupo de ratas tratado con doxorubicina y sacrificado a las 30 semanas después del tratamiento y otro grupo sacrificado justo después de 7 semanas de tratamiento (1 mg/Kg i.v. de doxorubicina en ambos casos), la cantidad de complejo IV disminuyó en el primer grupo más que en el segundo, aunque las cantidades de complejo IV no fueron diferentes estadísticamente del grupo control. En el estudio que se presenta sí se observan diferencias entre los grupos tratados, tanto con hidroxitirosol como con doxorubicina y conjuntamente

frente al grupo control, aunque es cierto que la disminución que se produjo en la cantidad de complejo IV no fue muy elevada.

En otro estudio realizado con ratones y a dosis de 1 mg/Kg i.p. semanalmente, también se confirma que la disminución de la expresión de las distintas subunidades que forman el complejo IV empieza a producirse a partir de aproximadamente la semana 8 de tratamiento³⁹². Chandran y col.¹⁶³ administran una dosis de 2,5 mg/Kg i.v. de doxorubicina a ratas durante 4, 8 y 12 semanas obtienen que para la subunidad I del complejo IV, hay una reducción de su cantidad en el grupo tratado con doxorubicina a la semana 12, pero no a la semana 8 del tratamiento. Teniendo en cuenta que la dosis de nuestro estudio era menor y que nuestro experimento duró 8 semanas, estos resultados coinciden.

Los complejos I y III son los principales productores de ROS en la mitocondria⁴⁰⁴, la disminución de la cantidad de complejos producirá una disminución de la cantidad de ROS generada y así se protegerá a la mitocondria frente al daño oxidativo.

5.6. ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES I Y IV

Los resultados de actividad muestran para el hidroxitirosol, una disminución de la actividad con respecto al grupo control en el complejo I, pero no así en el complejo IV. Esto es indicativo de que la actuación del hidroxitirosol tiene lugar sobre el complejo I, disminuyendo su actividad, pero no inactivando la cadena de transporte electrónica, ya que la actividad del complejo IV es normal. Una posible explicación a esto la dan Cornwell y Ma.⁴⁰⁵, que describen la formación de quinonas arilantes electrofílicas como posible mecanismo mediante el cual el hidroxitirosol atrapa electrones que puedan dar lugar a la producción de ERO si interaccionan con O₂. Esto podría ser un posible mecanismo por el cual se provoca una disminución de la actividad del complejo I al administrar hidroxitirosol. Puede ser que el hidroxitirosol reaccione con H₂O₂ generada en los complejos I y III⁴⁰⁴, produciendo estas quinonas arilantes electrofílicas, y transportando electrones desde el complejo I al resto de los complejos de la cadena de transporte electrónico. Se sabe que el ciclo redox del hidroxitirosol para formar quinonas arilantes, produce ROS como ya se ha determinado en otros estudios⁴⁰⁵, pero en este estudio, la cantidad de complejo I y III estaban disminuidas, y no se observaban daños a nivel oxidativo en las moléculas marcadoras de daño proteico, glucídico o lipídico (GSA, AASA, CEL, CML and MDAL), por lo que se mantenía el equilibrio redox mitocondrial.

Discusión

En cuanto al efecto de la doxorubicina, vemos como disminuye la actividad de los complejos tanto I como IV según Lebrech y col.¹⁶⁸.

El complejo I ve reducida su actividad y la administración conjunta de doxorubicina e hidroxitirosol aumenta levemente la actividad del complejo I, pero no significativamente. El bloqueo de la actividad del complejo I por parte de la doxorubicina se puede ver en otros estudios como el de Pointon y col.⁴⁰⁶ en el que usan una dosis aguda de 15 mg/Kg sobre ratas, o en un estudio de Xiong y col.⁴⁰⁷ donde al usar la misma dosis antes de sacrificar a las ratas observan una disminución de la actividad del complejo I. Este último estudio, además, compara el efecto de una cepa mutante de ratón que sobreexpresa Gpx1 con cepas de ratones normales. La capacidad antioxidante de la cepa mutante se ve por lo tanto fuertemente incrementada frente a la cepa no mutante. Esta capacidad antioxidante permitió a estos animales evitar la disminución de la actividad causada por la doxorubicina, aunque en nuestro estudio, el hidroxitirosol no fue capaz de provocar este efecto pese a su actividad antioxidante. Tampoco se conoce qué hubiese ocurrido en el caso de emplear dosis agudas de doxorubicina como en estos estudios, ya que se ha visto que los efectos perjudiciales de la doxorubicina dependen de la dosis administrada, pero sobretodo del tiempo transcurrido de administración.

En otro estudio cuya dosis eran algo más reducidas, de 2,5 mg/Kg de doxorubicina i.p. en 6 administraciones durante 2 semanas a ratas Wistar, se compara el efecto antioxidante del extracto de la planta *Centella asiatica* frente al efecto de la doxorubicina sobre las mitocondrias del tejido cardiaco. La doxorubicina consigue disminuir la actividad del complejo I, pero la administración conjunta de doxorubicina y extracto de *Centella asiatica* consigue devolver los valores a la normalidad⁴⁰⁸.

Lebrech y col.⁴⁰⁹ realizan una comparación sobre la modificación de la actividad del complejo IV entre un grupo de ratas Wistar que reciben una dosis de doxorubicina de 1 mg/Kg i.v. semanalmente durante 7 semanas, siendo sacrificadas a las 30 semanas después del fin de la administración y otro grupo que sigue la misma pauta de dosificación pero que es sacrificado justo después de la última dosis. Encuentran una disminución significativa de la actividad del complejo IV en el grupo que fue sacrificado a las 30 semanas, pero no así en el otro grupo. Según el estudio, la generación de ERO por parte de la doxorubicina y la aparición de daño en el ADNm es clave en la disminución de la actividad del complejo IV, siendo esto corroborado en otro estudio por el mismo autor⁴¹⁰. Este daño se traduce en fallos en la expresión del complejo IV que finalmente acaban con la disminución de su actividad. Hubiese

sido interesante en nuestro estudio haber medido la cantidad de daño en el ADNm para tener una mayor cantidad de información sobre este punto.

Este estrés oxidativo generado y su disminución mediante la ingesta de antioxidantes se pone de manifiesto en un estudio de Valls-Belles y col.⁴¹¹ en el que se administran 2 dosis de 5 mg/Kg i.p. de doxorubicina durante 21 días a ratas Wistar que fueron alimentadas con cerveza con y sin alcohol. La actividad del complejo IV en el grupo doxorubicina disminuyó, pero volvió a normalizarse en el grupo tratado con doxorubicina y cerveza (tanto con como sin alcohol), poniendo de manifiesto que una intervención con un producto con propiedades antioxidantes fue capaz de disminuir el daño oxidativo generado por la doxorubicina.

Son varias las teorías de cómo afecta la doxorubicina a las actividades de los complejos mitocondriales. Puede que la degradación lipídica producida por las ERO generadas tras la administración de doxorubicina provoque una deficiencia en la síntesis de los complejos o que se provoque una entrada de calcio excesiva a la mitocondria que los inactive⁴⁰⁸, que se dañen directamente proteínas y estructuras macromoleculares por la acción oxidativa de las ERO⁴¹² o la teoría anteriormente expuesta sobre el daño al ADNm⁴¹⁰.

A la vista de los resultados, no se espera que el hidroxitirosol aumente los niveles de actividad del complejo I mitocondrial en el grupo doxorubicina + hidroxitirosol, ya que también lo disminuye por sí solo, y en cuanto a la combinación de hidroxitirosol y doxorubicina para el complejo IV, el hidroxitirosol no es capaz de prevenir la disminución de la actividad por parte de la doxorubicina.

5.7. DETECCIÓN *IN SITU* DE APOPTOSIS

No hubo ninguna diferencia de apoptosis entre grupos, lo que nos indica que la doxorubicina no produjo apoptosis. Esta ausencia de efecto puede ser debido al diseño experimental. Según Nakamura y col.⁴¹³, la doxorubicina empieza a producir apoptosis entre 9 y 10 semanas después del tratamiento con dosis crónicas. Si se administra una dosis de doxorubicina aguda (20 mg/Kg i.p.) como hicieron Bae y col.⁴¹⁴, la aparición de apoptosis empieza a darse al cabo de 5 días después de la administración de una manera leve con incremento a los 10 días. Sea crónica o aguda la dosis, la apoptosis, igual que los efectos sobre la histopatología del corazón, dependen del tiempo transcurrido desde la última administración del fármaco. En nuestro estudio, las muestras se recogieron una semana

después del tratamiento, tiempo que se ha demostrado insuficiente para dar lugar a la aparición de apoptosis.

5.8. WESTERN BLOT

TFAM

Parece haber una respuesta de las mitocondrias en contraposición al efecto proapoptótico de la doxorubicina. Ikeda y col.⁴¹⁵ miden la expresión de TFAM en ratas a las que se administró una dosis de 20 mg/Kg i.p. y se sacrificaron 5 días después de esta administración. En este estudio, la expresión de TFAM disminuyó al contrario que en el este estudio, que aumentó. Una posible explicación la puede ofrecer el grado de apoptosis. En este estudio, la apoptosis generada sobre los cardiomiocitos fue elevada en los grupos a los que se les administró doxorubicina, al contrario que en nuestro estudio, en donde no observamos un nivel significativo de apoptosis. La proteína TFAM se encarga de la biogénesis mitocondrial entre otros procesos, y en una situación en la que las células están activando mecanismos de apoptosis, no sería lógico producir esta proteína, ya que el destino final de la célula es ser destruida y no reparada. En cambio, en una situación en la que la mitocondria está siendo dañada pero aun no se ha empezado a producir la destrucción de la célula, cabe pensar que como mecanismo de compensación, el cardiomiocito trate de generar nuevas mitocondrias, y esto lo hace aumentando la expresión de TFAM, necesario para la biogénesis mitocondrial. La administración conjunta de DOX+HT no disminuye la generación de TFAM, posiblemente porque el HT no es capaz de proteger completamente a las mitocondrias frente al efecto destructor de la DOX.

Nrf2

Es bien conocido que la activación de Nrf2 está relacionada con la presencia de peróxido de hidrógeno⁴¹⁶. Efectivamente, la administración de doxorubicina aumenta la expresión de Nrf2 como mecanismo de defensa frente a la generación de estrés oxidativo. Thompson y col.⁴¹⁷ realizan un estudio para comprobar la capacidad antioxidante del dexrazosano frente a la doxorubicina y también miden la expresión de Nrf2. Administran dosis de 3 mg/Kg i.v. a los días 1, 8 y 15 y sacrifican a los animales 24 horas después de la última administración. Inmediatamente, a las 24 horas tras la administración de la primera dosis de

Discusión

doxorubicina, encuentran un aumento de la expresión de genes relacionados con la activación de la ruta de Nrf2, pero no encuentran una disminución de esta activación en el grupo tratado con doxorubicina y dexrazosano. Por el contrario, en este estudio, sí se observa una disminución de la activación de Nrf2 en el grupo tratado con doxorubicina e hidroxitirosol, este hecho puede ser debido a que el mecanismo antioxidante de dexrazosano e hidroxitirosol sigan rutas diferentes. El HT actúa reduciendo la presencia de peróxido de hidrogeno, activándose, por tanto, en menor medida, Nrf2. Esa es la razón de que esta proteína “antioxidante” este menos expresada en el grupo DOX+HT, ya que no es tan necesaria la activación de Nrf2 en el cardiomiocito en estas condiciones, al no producirse tanto daño oxidativo como en el caso del grupo DOX, posiblemente porque el HT con su capacidad antioxidante, evita el efecto de las ERO, como el caso del peróxido de hidrogeno. Y parece ser que el HT per se también reduce la activación de Nrf2, protegiendo al cardiomiocito de la producción de peróxido de hidrogeno que producen las mitocondrias en condiciones normales (véase la comparación DMBA frente a HT). Esto refuerza la idea de la actividad antioxidante que posee el hidroxitirosol.

6. CONCLUSIONES

1. CONCLUSIÓN: Antioxidante

El hidroxitirosol es una molécula con alta capacidad antioxidante, que reduce los niveles de estrés oxidativo producidos en el corazón. Esta capacidad antioxidante se ha puesto de manifiesto gracias a la determinación de los marcadores moleculares de daño oxidativo anteriormente mencionados (GSA, MDA, CME, CML y ASAA), que el hidroxitirosol ha disminuido tras su administración en el grupo DOX+HT, debido al efecto antioxidante de esta molécula, por lo que es capaz de evitar que las ERO provocados por la doxorubicina dañen proteínas, glúcidos y lípidos. La disminución de la cantidad de la proteína Nrf2, activada en situaciones de estrés oxidativo, apoya esta afirmación.

2. CONCLUSIÓN: Protector de la integridad estructural de la mitocondria

El hidroxitirosol mantiene la integridad física de las mitocondrias del músculo cardíaco. El hidroxitirosol disminuye el grado de alteración de la ultraestructura mitocondrial y el número de mitocondrias afectadas por la producción de ERO por parte de la doxorubicina. Es importante evitar la destrucción de las mitocondrias del músculo cardíaco porque ello conllevaría la apoptosis del cardiomiocito y a la larga, la aparición de problemas cardíacos.

3. CONCLUSIÓN: Disminución de la generación de ERO

El mecanismo molecular de protección por parte del hidroxitirosol frente al daño producido por ERO sobre los componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial se ha puesto de manifiesto gracias a la determinación de la actividad de los complejos I y IV en donde el hidroxitirosol provoca una disminución de la actividad del complejo I pero no del complejo IV, lo que no comprometía el correcto funcionamiento de la cadena de transporte electrónico, pero al reducir la actividad del complejo I, el principal complejo mitocondrial productor de ERO.

4. CONCLUSIÓN: Disminución de la cantidad de AIF

La disminución de la cantidad de AIF en el grupo HT frente a los demás grupos es un dato interesante, ya que AIF es una molécula capaz de producir apoptosis una vez liberada al citosol y mediante posterior translocación al núcleo, pero también necesaria para la biosíntesis de los complejos de la cadena de transporte electrónico. La disminución de su concentración en la mitocondria hace pensar que podría estar disminuyendo el riesgo de que se libere AIF al citosol, disminuyendo el riesgo de que se produzca apoptosis, pero sin comprometer la función de la cadena de transporte electrónica.

5. CONCLUSIÓN: Protección frente a la apoptosis

No se han encontrado diferencias entre los niveles de apoptosis y por lo tanto no se ha comprobado la eficacia del hidroxitirosol frente a la apoptosis inducida por doxorubicina sobre los cardiomiocitos.

CONCLUSIÓN GENERAL

El hidroxitirosol protege al cardiomiocito de los daños secundarios generados por la doxorubicina inhibiendo la generación de radicales libres en la mitocondria, manteniendo la funcionalidad de la mitocondria y protegiendo a la célula del daño oxidativo provocado por el citostático.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Escrich E, Solanas M, Moral R, Costa I, Grau L. Are the olive oil and other dietary lipids related to cancer? Experimental evidence. *Clin Transl Oncol*. 2006; 8(12):868-83
2. Chin L, Gray JW. Translating insights from the cancer genome into clinical practice. *Nature*. 2008; 452(7187):553-63
3. Bartek J, Bartkova J, Lukas J. DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene*. 2007; 26(56):7773-9
4. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(7):3983-8
5. Velasco-Velázquez MA, Popov VM, Lisanti MP, Pestell RG. The role of breast cancer stem cells in metastasis and therapeutic implications. *Am J Pathol*. 2011; 179(1):2-11
6. Chuthapisith S, Eremin J, El-Sheemey M, Eremin O. Breast cancer chemoresistance: emerging importance of cancer stem cells. *Surg Oncol*. 2010; 19(1):27-32
7. Klonisch T, Wiechec E, Hombach-Klonisch S, Ande SR, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K, Los M. Cancer stem cell markers in common cancers - therapeutic implications. *Trends Mol Med*. 2008; 14(10):450-60
8. Vermeulen L, de Sousa e Melo F, Richel DJ, Medema JP. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *Lancet Oncol*. 2012; 13(2):e83-9
9. Badve S, Nakshatri H. Breast-cancer stem cells-beyond semantics. *Lancet Oncol*. 2012; 13(1):e43-8
10. Al-Ejeh F, Smart CE, Morrison BJ, Chenevix-Trench G, López JA, Lakhani SR, Brown MP, Khanna KK. Breast cancer stem cells: treatment resistance and therapeutic opportunities. *Carcinogenesis*. 2011; 32(5):650-8
11. Marsh S, Liu G. Pharmacokinetics and pharmacogenomics in breast cancer chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009; 61(5):381-7
12. Nguyen NP, Almeida FS, Chi A, Nguyen LM, Cohen D, Karlsson U, Vinh-Hung V. Molecular biology of breast cancer stem cells: potential clinical applications. *Cancer Treat Rev*. 2010; 36(6):485-91
13. Liu S, Wicha MS. Targeting breast cancer stem cells. *J Clin Oncol*. 2010; 28(25):4006-12
14. Creighton CJ, Chang JC, Rosen JM. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor-initiating cells and its clinical implications in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010; 15(2):253-60

Bibliografía

15. Levi F, Bosetti C, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Monitoring the decrease in breast cancer mortality in Europe. *Eur J Cancer Prev.* 2005; 14(6):497-502
16. GLOBOCAN 2008 (IARC). Section of Cancer Information. Recuperado en Diciembre, 2011, de <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>
17. Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G; Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94(8):606-16
18. Hirayama T, Wynder EL. A study of the epidemiology of cancer of the breast. II. The influence of hysterectomy. *Cancer.* 1962; 5:28-38
19. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet.* 1997; 350(9084):1047-59
20. Genetics of Breast and Ovarian Cancer (PDQ®). National Cancer Institute - PDQ Cancer Information Summaries. 2012
21. Morimoto LM, White E, Chen Z, Chlebowski RT, Hays J, Kuller L, Lopez AM, Manson J, Margolis KL, Muti PC, Stefanick ML, McTiernan A. Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States). *Cancer Causes Control.* 2002; 13(8):741-51
22. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, Heath CW Jr, Coates RJ, Liff JM, Talamini R, Chantarakul N y col.; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer.* 2002; 87(11):1234-45
23. Carmichael A, Sami AS, Dixon JM. Breast cancer risk among the survivors of atomic bomb and patients exposed to therapeutic ionising radiation. *Eur J Surg Oncol.* 2003; 29(5):475-9
24. Potischman N, Swanson CA, Siiteri P, Hoover RN. Reversal of relation between body mass and endogenous estrogen concentrations with menopausal status. *J Natl Cancer Inst.* 1996; 88(11):756-8
25. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet.* 2008; 371(9612):569-78
26. Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA.* 2001; 286(17):2143-51.
27. Nagata C, Hu YH, Shimizu H. Effects of menstrual and reproductive factors on the risk of breast cancer: meta-analysis of the case-control studies in Japan. *Jpn J Cancer Res.* 1995; 86(10):910-5

Bibliografía

28. Thune I, Brenn T, Lund E, Gaard M. Physical activity and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 1997; 336(18):1269-75
29. Hoffman-Goetz L, Apter D, Demark-Wahnefried W, Goran MI, McTiernan A, Reichman ME. Possible mechanisms mediating an association between physical activity and breast cancer. *Cancer.* 1998; 83(3 Suppl):621-8
30. Howard JH, Bland KI. Current management and treatment strategies for breast cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2012; 24(1):44-8
31. Fisher B, Dignam J, Wolmark N, Wickerham DL, Fisher ER, Mamounas E, Smith R, Begovic M, Dimitrov NV, Margolese RG y col. Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomized controlled trial. *Lancet* 1999; 353:1993–2000
32. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, Leitch AM, Saha S, McCall LM, Morrow M. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2011; 305(6):569-75
33. Yi M, Giordano SH, Meric-Bernstam F, Mittendorf EA, Kuerer HM, Hwang RF, Bedrosian I, Rourke L, Hunt KK. Trends in and outcomes from sentinel lymph node biopsy (SLNB) alone vs. SLNB with axillary lymph node dissection for node-positive breast cancer patients: experience from the SEER database. *Ann Surg Oncol.* 2010; 17 Suppl 3:343-51
34. de Boer M, van Deurzen CH, van Dijck JA, Borm GF, van Diest PJ, Adang EM, Nortier JW, Rutgers EJ, Seynaeve C, Menke-Pluymers MB, Bult P, Tjan-Heijnen VC. Micrometastases or isolated tumor cells and the outcome of breast cancer. *N Engl J Med.* 2009; 361(7):653-63
35. Oostendorp LJ, Stalmeier PF, Donders AR, van der Graaf WT, Ottevanger PB. Efficacy and safety of palliative chemotherapy for patients with advanced breast cancer pretreated with anthracyclines and taxanes: a systematic review. *Lancet Oncol.* 2011; 12(11):1053-61
36. Le Guellec S, Perallon R, Alunni JP, Charitansky H, Leaha C, Gonzalez AM, Chateau MC, Simony-Lafontaine J, Jacot W, Gutowski M, Penault-Llorca F, Dalenc F, Lacroix-Triki M. [Neoadjuvant treatment of breast cancer: implications for the pathologist]. *Ann Pathol.* 2011; 31(6):442-54. doi: 10.1016/j.annpat.2011.10.003
37. Asociación Española contra el cáncer (AECC) [Sede web]. 2012 [Acceso el 9 de Febrero de 2012]. Cáncer de mama. Disponible en: <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/CancerMama/Paginas/cancerdemama.aspx>
38. Hudis C, McArthur H, Dang C. Current status of the taxanes as adjuvant therapy for breast cancer. *Breast.* 2007; 16 Suppl 2:S132-5
39. Miller ML, Ojima I. Chemistry and chemical biology of taxane anticancer agents. *Chem Rec.* 2001; 1(3):195-211

Bibliografia

40. National Cancer Dictionary: cyclophosphamide.
<http://www.cancer.gov/drugdictionary/?CdrID=39748>
41. Takimoto CH, Calvo E. "Principles of Oncologic Pharmacotherapy" in Pazdur R, Wagman LD, Camphausen KA, Hoskins WJ (Eds) *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach*. 11 ed. 2008
42. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(5):330-8
43. Cronstein BN. The mechanism of action of methotrexate. *Rheum Dis Clin North Am*. 1997; 23(4):739-55
44. Huennekens FM. The methotrexate story: a paradigm for development of cancer chemotherapeutic agents. *Adv Enzyme Regul*. 1994; 34:397-419
45. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004; 56(2):185-229
46. Perego P, Corna E, De Cesare M, Gatti L, Polizzi D, Pratesi G, Supino R, Zunino F. Role of apoptosis and apoptosis-related genes in cellular response and antitumor efficacy of anthracyclines. *Curr Med Chem*. 2001; 8(1):31-7
47. Zunino F, Pratesi G, Perego P. Role of the sugar moiety in the pharmacological activity of anthracyclines: development of a novel series of disaccharide analogs. *Biochem Pharmacol*. 2001; 61(8):933-8
48. Guano F, Pourquier P, Tinelli S, Binaschi M, Bigioni M, Animati F, Manzini S, Zunino F, Kohlhagen G, Pommier Y, Capranico G. Topoisomerase poisoning activity of novel disaccharide anthracyclines. *Mol Pharmacol*. 1999; 56(1):77-84
49. Capranico G, Riva A, Tinelli S, Dasdia T, Zunino F. Markedly reduced levels of anthracycline-induced DNA strand breaks in resistant P388 leukemia cells and isolated nuclei. *Cancer Res*. 1987; 47(14):3752-6
50. Bellamy WT, Dorr RT, Dalton WS, Alberts DS. Direct relation of DNA lesions in multidrug-resistant human myeloma cells to intracellular doxorubicin concentration. *Cancer Res*. 1988; 48(22):6360-4
51. Deffie AM, Batra JK, Goldenberg GJ. Direct correlation between DNA topoisomerase II activity and cytotoxicity in adriamycin-sensitive and -resistant P388 leukemia cell lines. *Cancer Res*. 1989; 49(1):58-62
52. Doroshow JH, Synold TW, Somlo G, Akman SA, Gajewski E. Oxidative DNA base modifications in peripheral blood mononuclear cells of patients treated with high-dose infusional doxorubicin. *Blood*. 2001; 97(9):2839-45
53. Gajewski E, Rao G, Nackerdien Z, Dizdaroglu M. Modification of DNA bases in mammalian chromatin by radiation-generated free radicals. *Biochemistry*. 1990; 29(34):7876-82

Bibliografia

54. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* 1999; 57(7):727-41
55. Kato S, Burke PJ, Koch TH, Bierbaum VM. Formaldehyde in human cancer cells: detection by preconcentration-chemical ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2001; 73(13):2992-7
56. Zeman SM, Phillips DR, Crothers DM. Characterization of covalent adriamycin-DNA adducts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(20):11561-5
57. Taatjes DJ, Koch TH. Nuclear targeting and retention of anthracycline antitumor drugs in sensitive and resistant tumor cells. *Curr Med Chem.* 2001; 8(1):15-29
58. Fornari FA, Randolph JK, Yalowich JC, Ritke MK, Gewirtz DA. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol Pharmacol.* 1994; 45(4):649-56
59. Bachur NR, Yu F, Johnson R, Hickey R, Wu Y, Malkas L. Helicase inhibition by anthracycline anticancer agents. *Mol Pharmacol.* 1992; 41(6):993-8
60. Bachur NR, Johnson R, Yu F, Hickey R, Applegren N, Malkas L. Antihelicase action of DNA-binding anticancer agents: relationship to guanosine-cytidine intercalator binding. *Mol Pharmacol.* 1993; 44(5):1064-9
61. Tuteja N, Phan TN, Tuteja R, Ochem A, Falaschi A. Inhibition of DNA unwinding and ATPase activities of human DNA helicase II by chemotherapeutic agents. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 236(3):636-40
62. Liu LF. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem.* 1989; 58:351-75
63. Takano H, Kohno K, Ono M, Uchida Y, Kuwano M. Increased phosphorylation of DNA topoisomerase II in etoposide-resistant mutants of human cancer KB cells. *Cancer Res.* 1991; 51(15):3951-7
64. Danks MK, Warmoth MR, Friche E, Granzen B, Bugg BY, Harker WG, Zwelling LA, Futscher BW, Suttle DP, Beck WT. Single-strand conformational polymorphism analysis of the M(r) 170,000 isozyme of DNA topoisomerase II in human tumor cells. *Cancer Res.* 1993; 53(6):1373-9
65. Campaign JA, Padmanabhan R, Hwang J, Gottesman MM, Pastan I. Characterization of an unusual mutant of human melanoma cells resistant to anticancer drugs that inhibit topoisomerase II. *J Cell Physiol.* 1993; 155(2):414-25
66. Campaign JA, Gottesman MM, Pastan I. A novel mutant topoisomerase II alpha present in VP-16-resistant human melanoma cell lines has a deletion of alanine 429. *Biochemistry.* 1994; 33(37):11327-32
67. Wray J, Williamson EA, Royce M, Shaheen M, Beck BD, Lee SH, Nickoloff JA, Hromas R. Metnase mediates resistance to topoisomerase II inhibitors in breast cancer cells. *PLoS One.* 2009; 4(4):e5323

Bibliografia

68. Ponder J, Yoo BH, Abraham AD, Li Q, Ashley AK, Amerin CL, Zhou Q, Reid BG, Reigan P, Hromas R, Nickoloff JA, LaBarbera DV. Neoamphimedine circumvents metnase-enhanced DNA topoisomerase II α activity through ATP-competitive inhibition. *Mar Drugs*. 2011; 9(11):2397-408
69. Cusack JC. Rationale for the treatment of solid tumors with the proteasome inhibitor bortezomib. *Cancer Treat Rev*. 2003; 29 Suppl 1:21-31
70. Kiyomiya K, Matsuo S, Kurebe M. Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex. *Cancer Res*. 2001; 61(6):2467-71
71. Ogiso Y, Tomida A, Tsuruo T. Nuclear localization of proteasomes participates in stress-inducible resistance of solid tumor cells to topoisomerase II-directed drugs. *Cancer Res*. 2002; 62(17):5008-12
72. Ogiso Y, Tomida A, Lei S, Omura S, Tsuruo T. Proteasome inhibition circumvents solid tumor resistance to topoisomerase II-directed drugs. *Cancer Res*. 2000; 60(9):2429-34
73. Liu J, Zheng H, Tang M, Ryu YC, Wang X. A therapeutic dose of doxorubicin activates ubiquitin-proteasome system-mediated proteolysis by acting on both the ubiquitination apparatus and proteasome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 295(6):H2541-50
74. Sishi BJ, Bester DJ, Wergeland A, Loos B, Jonassen AK, van Rooyen J, Engelbrecht AM. Daunorubicin therapy is associated with upregulation of E3 ubiquitin ligases in the heart. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012; 237(2):219-26
75. Schumacher U, Nehmann N, Adam E, Mukthar D, Slotki IN, Horny HP, Flens MJ, Schlegelberger B, Steinemann D. MDR-1-overexpression in HT 29 colon cancer cells grown in SCID mice. *Acta Histochem*. 2011.
76. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ, Wapnir I, Dirbas FM, Somlo G, Garberoglio C, Paz B, Shen J, Lau SK, Quake SR, Brown JM, Weissman IL, Clarke MF. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*. 2009; 458(7239):780-3
77. Pani G, Galeotti T, Chiarugi P. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev*. 2010; 29(2):351-78
78. Damelin M, Bestor TH. The decatenation checkpoint. *Br J Cancer*. 2007; 96(2):201-5
79. Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci*. 2005; 26(4):190-5
80. Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20(7):1716-23
81. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A discussion of the chemistry of oxidative and nitrosative stress in cytotoxicity. *J Inorg Biochem*. 2000; 79(1-4):237-40

Bibliografía

82. Espey MG, Miranda KM, Feelisch M, Fukuto J, Grisham MB, Vitek MP, Wink DA. Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 899:209-21
83. Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 1999; 65(18-19):1865-74
84. Lassen N, Black WJ, Estey T, Vasiliou V. The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress. *Semin Cell Dev Biol.* 2008; 19(2):100-12
85. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Freeradicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1):44-84
86. Vásquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Pritchard KA Jr, Kalyanaraman B. Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry.* 1997; 36(38):11293-7
87. Minotti G, Cairo G, Monti E. Role of iron in anthracyclinecardiotoxicity: new tunes for an old song? *FASEB J.* 1999; 13(2):199-212
88. Ravi D, Das KC. Redox-cycling of anthracyclines by thioredoxin system: increased superoxide generation and DNA damage. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004; 54(5):449-58
89. Gille L, Nohl H. Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Free Radic Biol Med.* 1997; 23(5):775-82
90. Licata S, Saponiero A, Mordente A, Minotti G. Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. *Chem Res Toxicol.* 2000; 13(5):414-20
91. Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011; 254(2):86-99
92. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat.* 2007; 28(6):622-9
93. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997; 88(3):323-31
94. Chargari C, Leteur C, Ferté C, Deberne M, Lahon B, Rivera C, Bourhis J, Deutsch E. [Pharmacological targeting of Mdm2: rationale and perspectives for radiosensitization]. *Cancer Radiother.* 2011; 15(4):316-22
95. Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxicstresses. *Eur J Biochem.* 2001; 268(10):2764-72
96. Fenton RG, Longo DL. Biología de la célula cancerosa y angiogénesis. En: HarrisonOnLine. Principios de medicina interna (Dennis L. Kasper, Eugene Braunwald, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, y Kurt J. Isselbacher) McGraw Hill-Interamericana Editores, España, Cap. 68, Ed. 16ª, 2006. (www.harrisonmedicina.com)

Bibliografia

97. Hait WN, Yang JM. The individualization of cancer therapy: the unexpected role of p53. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2006; 117:85-101
98. el-Deiry WS. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol.* 1998; 8(5):345-57
99. Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mack DH, Levine AJ. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev.* 2000; 14(8):981-93
100. Chang YL, Lee HJ, Liu ST, Lin YS, Chen TC, Hsieh TY, Huang HS, Huang SM. Different roles of p53 in the regulation of DNA damage caused by 1,2-heteroannelated anthraquinones and doxorubicin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011; 43(12):1720-8
101. Tsang WP, Chau SP, Kong SK, Fung KP, Kwok TT. Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. *Life Sci.* 2003; 73(16):2047-58
102. Manna SK, Gangadharan C, Edupalli D, Raviprakash N, Navneetha T, Mahali S, Thoh M. Ras puts the brake on doxorubicin-mediated cell death in p53-expressing cells. *J Biol Chem.* 2011; 286(9):7339-47
103. Laurent G, Jaffrézou JP. Signaling pathways activated by daunorubicin. *Blood.* 2001; 98(4):913-24
104. Green PS, Leeuwenburgh C. Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1588(1):94-101
105. Clementi ME, Giardina B, Di Stasio E, Mordente A, Misiti F. Doxorubicin-derived metabolites induce release of cytochrome C and inhibition of respiration on cardiac isolated mitochondria. *Anticancer Res.* 2003; 23(3B):2445-50
106. Verschoor ML, Wilson LA, Singh G. Mechanisms associated with mitochondrial-generated reactive oxygen species in cancer. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010; 88(3):204-19
107. Jourdain A, Martinou JC. Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41(10):1884-9
108. Hüttemann M, Pecina P, Rainbolt M, Sanderson TH, Kagan VE, Samavati L, Doan JW, Lee I. The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. *Mitochondrion.* 2011; 11(3):369-81
109. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 1999; 397(6718):441-6
110. McKenzie M, Ryan MT. Assembly factors of human mitochondrial complex I and their defects in disease. *IUBMB Life.* 2010; 62(7):497-502

111. Bénit P, Goncalves S, Dassa EP, Brière JJ, Rustin P. The variability of the harlequin mouse phenotype resembles that of human mitochondrial-complex I-deficiency syndromes. *PLoS One*. 2008; 3(9):e3208
112. Vahsen N, Candé C, Brière JJ, Bénit P, Joza N, Larochette N, Mastroberardino PG, Pequignot MO, Casares N, Lazar V, Feraud O, Debili N, Wissing S, Engelhardt S, Madeo F, Piacentini M, Penninger JM, Schägger H, Rustin P, Kroemer G. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J*. 2004; 23(23):4679-89
113. Joza N, Oudit GY, Brown D, Bénit P, Kassiri Z, Vahsen N, Benoit L, Patel MM, Nowikovsky K, Vassault A, Backx PH, Wada T, Kroemer G, Rustin P, Penninger JM. Muscle-specific loss of apoptosis-inducing factor leads to mitochondrial dysfunction, skeletal muscle atrophy, and dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(23):10261-72
114. Sevrioukova IF. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 14(12):2545-79
115. Zhou S, Heller LJ, Wallace KB. Interference with calcium-dependent mitochondrial bioenergetics in cardiac myocytes isolated from doxorubicin-treated rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001; 175(1):60-7
116. Davidson SM, Yellon DM, Murphy MP, Duchon MR. Slow calcium waves and redox changes precede mitochondrial permeability transition pore opening in the intact heart during hypoxia and reoxygenation. *Cardiovasc Res*. 2012; 93(3):445-53
117. Chang WT, Li J, Haung HH, Liu H, Han M, Ramachandran S, Li CQ, Sharp WW, Hamann KJ, Yuan CS, Hoek TL, Shao ZH. Baicalein protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by attenuation of mitochondrial oxidant injury and JNK activation. *J Cell Biochem*. 2011; 112(10):2873-81
118. Shen HM, Liu ZG. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med*. 2006; 40(6):928-39
119. Ranek MJ, Wang X. Activation of the ubiquitin-proteasome system in doxorubicin cardiomyopathy. *Curr Hypertens Rep*. 2009; 11(6):389-95
120. Lal S, Mahajan A, Chen WN, Chowbay B. Pharmacogenetics of target genes across doxorubicin disposition pathway: a review. *Curr Drug Metab*. 2010; 11(1):115-28
121. Nithipongvanitch R, Ittarat W, Cole MP, Tangpong J, Clair DK, Oberley TD. Mitochondrial and nuclear p53 localization in cardiomyocytes: redox modulation by doxorubicin (Adriamycin)? *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9(7):1001-8
122. Liu TC, Ismail S, Brennan O, Hastings C, Duffy GP. Encapsulation of cardiac stem cells in superoxide dismutase-loaded alginate prevents doxorubicin-mediated toxicity. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011.doi: 10.1002/term.523
123. Hoch M, Fischer P, Stapel B, Missol-Kolka E, Sekkali B, Scherr M, Favret F, Braun T, Eder M, Schuster-Gossler K, Gossler A, Hilfiker A, Balligand JL, Drexler H, Hilfiker-Kleiner D.

Erythropoietin preserves the endothelial differentiation capacity of cardiac progenitor cells and reduces heart failure during anticancer therapies. *Cell Stem Cell*. 2011; 9(2):131-43

124. De Angelis A, Piegari E, Cappetta D, Marino L, Filippelli A, Berrino L, Ferreira-Martins J, Zheng H, Hosoda T, Rota M, Urbanek K, Kajstura J, Leri A, Rossi F, Anversa P. Anthracycline cardiomyopathy is mediated by depletion of the cardiac stem cell pool and is rescued by restoration of progenitor cell function. *Circulation*. 2010; 121(2):276-92

125. Quiles, J.L., Ochoa, J.J., Huertas, J.R., López-Frías, M., Mataix, J., 2006. Olive oil and mitochondrial oxidative stress: studies on adriamycin toxicity, physical exercise and ageing. In: Quiles, J.L., Ramirez-Tortosa, M.C., Yaqoob, P. (Eds.), Olive Oil and Health. CABI Publishing, Oxford, pp. 119–151

126. Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan CT, Heller G, Murphy ML. Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *JAMA*. 1991; 266(12):1672-7

127. Chen Y, Jungsuwadee P, Vore M, Butterfield DA, St Clair DK. Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in nontargeted tissues. *Mol Interv*. 2007; 7(3):147-56

128. Wallace KB. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacol Toxicol*. 2003; 93(3):105-15

129. Bertinchant JP, Polge A, Juan JM, Oliva-Lauraire MC, Giuliani I, Marty-Double C, Burdy JY, Fabbro-Peray P, Laprade M, Bali JP y col. Evaluation of cardiac troponin I and T levels as markers of myocardial damage in doxorubicin-induced cardiomyopathy rats, and their relationship with echocardiographic and histological findings. *Clin Chim Acta*. 2003; 329(1-2):39-51

130. Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mataix J, Ramírez-Tortosa MC. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology*. 2002; 180(1):79-95

131. Yoshida M, Shiojima I, Ikeda H, Komuro I. Chronic doxorubicin cardiotoxicity is mediated by oxidative DNA damage-ATM-p53-apoptosis pathway and attenuated by pitavastatin through the inhibition of Rac1 activity. *J Mol Cell Cardiol*. 2009; 47(5):698-705

132. Liu J, Mao W, Ding B, Liang CS. ERKs/p53 signal transduction pathway is involved in doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells and cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 295(5):H1956-65

133. Wang S, Konorev EA, Kotamraju S, Joseph J, Kalivendi S, Kalyanaraman B. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. Intermediacy of H₂O₂- and p53-dependent pathways. *J Biol Chem*. 2004; 279(24):25535-43

134. Chen Y, Jungsuwadee P, Vore M, Butterfield DA, St Clair DK. Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in nontargeted tissues. *Mol Interv*. 2007; 7(3):147-56

135. Bai P, Mabley JG, Liaudet L, Virág L, Szabó C, Pacher P. Matrix metalloproteinase activation is an early event in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncol Rep*. 2004; 11(2):505-8

Bibliografía

136. Huertas JR, Battino M, Barzanti V, Maranesi M, Parenti-Castelli G, Littarru GP, Turchetto E, Mataix FJ, Lenaz G. Mitochondrial and microsomal cholesterol mobilization after oxidative stress induced by adriamycin in rats fed with dietary olive and corn oil. *Life Sci.* 1992; 50(26):2111-8
137. Huertas JR, Battino M, Lenaz G, Mataix FJ. Changes in mitochondrial and microsomal rat liver coenzyme Q9 and Q10 content induced by dietary fat and endogenous lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 1991; 287(1-2):89-92
138. Huertas JR, Battino M, Mataix FJ, Lenaz G. Cytochrome oxidase induction after oxidative stress induced by adriamycin in liver of rats fed with dietary olive oil. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 181(1):375-82
139. Wang S, Kotamraju S, Konorev E, Kalivendi S, Joseph J, Kalyanaraman B. Activation of nuclear factor-kappaB during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic: the role of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 2002; 367(Pt 3):729-40
140. Ranek MJ, Wang X. Activation of the ubiquitin-proteasome system in doxorubicin cardiomyopathy. *Curr Hypertens Rep.* 2009; 11(6):389-95
141. van Norren K, van Helvoort A, Argilés JM, van Tuijl S, Arts K, Gorselink M, Laviano A, Kegler D, Haagsman HP, van der Beek EM. Direct effects of doxorubicin on skeletal muscle contribute to fatigue. *Br J Cancer.* 2009; 100(2):311-4
142. Little GH, Saw A, Bai Y, Dow J, Marjoram P, Simkhovich B, Leeka J, Kedes L, Kloner RA, Poizat C. Critical role of nuclear calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIdeltaB in cardiomyocyte survival in cardiomyopathy. *J Biol Chem.* 2009; 284(37):24857-68
143. Dudka J. Decrease in NADPH-cytochrome P450 reductase activity of the human heart, Liver and lungs in the presence of alpha-lipoic acid. *Ann Nutr Metab.* 2006; 50(2):121-5
144. Barth E, Stämmler G, Speiser B, Schaper J. Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *J Mol Cell Cardiol.* 1992; 24(7):669-81
145. Doroshov JH, Locker GY, Myers CE. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *J Clin Invest.* 1980; 65(1):128-35
146. Deng S, Kulle B, Hosseini M, Schlüter G, Hasenfuss G, Wojnowski L, Schmidt A. Dystrophin-deficiency increases the susceptibility to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Eur J Heart Fail.* 2007; 9(10):986-94
147. Sarvazyan N. Visualization of doxorubicin-induced oxidative stress in isolatedcardiacmyocytes. *Am J Physiol.* 1996; 271(5 Pt 2):H2079-85
148. Conklin KA. Coenzyme q10 for prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Integr Cancer Ther.* 2005; 4(2):110-30

Bibliografia

149. Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi M, Preuss HG, Vinson JA. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutat Res.* 2003; 523-524:87-97
150. Carreira RS, Monteiro P, Gon Alves LM, Providência LA. Carvedilol: just another Beta-blocker or a powerful cardioprotector?. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2006; 6(4):257-66
151. Hasinoff BB, Schnabl KL, Marusak RA, Patel D, Huebner E. Dexrazoxane (ICRF-187) protects cardiac myocytes against doxorubicin by preventing damage to mitochondria. *Cardiovasc Toxicol.* 2003; 3(2):89-99
152. Puri A, Maulik SK, Ray R, Bhatnagar V. Electrocardiographic and biochemical evidence for the cardioprotective effect of vitamin E in doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rats. *Eur J Pediatr Surg.* 2005; 15(6):387-91
153. Berthiaume JM, Oliveira PJ, Fariss MW, Wallace KB. Dietary vitamin E decreases doxorubicin-induced oxidative stress without preventing mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc Toxicol.* 2005; 5(3):257-67
154. Anjos Ferreira AL, Russell RM, Rocha N, Placido Ladeira MS, Favero Salvadori DM, Oliveira Nascimento MC, Matsui M, Carvalho FA, Tang G, Matsubara LS, Matsubara BB. Effect of lycopene on doxorubicin-induced cardiotoxicity: an echocardiographic, histological and morphometrical assessment. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007; 101(1):16-24
155. Ateşşahin A, Türk G, Karahan I, Yilmaz S, Ceribaşı AO, Bulmuş O. Lycopene prevents adriamycin-induced testicular toxicity in rats. *Fertil Steril.* 2006; 85 Suppl 1:1216-22
156. Kaiserová H, Šimůnek T, van der Vijgh WJ, Bast A, Kvasnicková E. Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1772(9):1065-74
157. Abou El Hassan MA, Heijn M, Rabelink MJ, van der Vijgh WJ, Bast A, Hoeben RC. The protective effect of cardiac gene transfer of CuZn-sod in comparison with the cardioprotector monohydroxyethylrutoside against doxorubicin-induced cardiotoxicity in cultured cells. *Cancer Gene Ther.* 2003; 10(4):270-7
158. Bast A, Kaiserová H, den Hartog GJ, Haenen GR, van der Vijgh WJ. Protectors against doxorubicin-induced cardiotoxicity: flavonoids. *Cell Biol Toxicol.* 2007; 23(1):39-47
159. Bast A, Haenen GR, Bruynzeel AM, Van der Vijgh WJ. Protection by flavonoids against anthracycline cardiotoxicity: from chemistry to clinical trials. *Cardiovasc Toxicol.* 2007; 7(2):154-9
160. Abou El Hassan MA, Verheul HM, Jorna AS, Schalkwijk C, van Bezu J, van der Vijgh WJ, Bast A. The new cardioprotector Monohydroxyethylrutoside protects against doxorubicin-induced inflammatory effects in vitro. *Br J Cancer.* 2003; 89(2):357-62

Bibliografia

161. Bruynzeel AM, Abou El Hassan MA, Schalkwijk C, Berkhof J, Bast A, Niessen HW, van der Vijgh WJ. Anti-inflammatory agents and monoHER protect against DOX-induced cardiotoxicity and accumulation of CML in mice. *Br J Cancer*. 2007; 96(6):937-43
162. Conklin KA. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. *Nutr Cancer*. 2000; 37(1):1-18
163. Chandran K, Aggarwal D, Migrino RQ, Joseph J, McAllister D, Konorev EA, Antholine WE, Zielonka J, Srinivasan S, Avadhani NG, Kalyanaraman B. Doxorubicin inactivates myocardial cytochrome c oxidase in rats: cardioprotection by Mito-Q. *Biophys J*. 2009; 96(4):1388-98
164. Danesi F, Malaguti M, Nunzio MD, Maranesi M, Biagi PL, Bordoni A. Counteraction of adriamycin-induced oxidative damage in rat heart by selenium dietary supplementation. *J Agric Food Chem*. 2006; 54(4):1203-8
165. Armstrong SC. Anti-oxidants and apoptosis: attenuation of doxorubicin induced cardiomyopathy by carvedilol. *J Mol Cell Cardiol*. 2004; 37(4):817-21
166. Machado V, Cabral A, Monteiro P, Gonçalves L, Providência LA. Carvedilol as a protector against the cardiotoxicity induced by anthracyclines (doxorubicin). *Rev Port Cardiol*. 2008; 27(10):1277-96
167. Spallarossa P, Garibaldi S, Altieri P, Fabbi P, Manca V, Nasti S, Rossettin P, Ghigliotti G, Ballestrero A, Patrone F, Barsotti A, Brunelli C. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol*. 2004; 37(4):837-46
168. Lebrecht D, Geist A, Ketelsen UP, Haberstroh J, Setzer B, Walker UA. Dexrazoxane prevents doxorubicin-induced long-term cardiotoxicity and protects myocardial mitochondria from genetic and functional lesions in rats. *Br J Pharmacol*. 2007; 151(6):771-8
169. Dr. Sastry, Dr. Singh & Dr. Tomar. Cell & Developmental Biology. Published by Rakesh Kumar Rastogi for Rastogi publications, "Gangroti" shivaji road. Printed at Rajsons printers, New Delhi, India. 2006-2007
170. Indiveri C, Iacobazzi V, Tonazzi A, Giangregorio N, Infantino V, Convertini P, Console L, Palmieri F. The mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier: function, structure and physiopathology. *Mol Aspects Med*. 2011; 32(4-6):223-33
171. Satoh M, Kuroiwa T. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res*. 1991; 196(1):137-40
172. Clason T, Ruiz T, Schägger H, Peng G, Zickermann V, Brandt U, Michel H, Radermacher M. The structure of eukaryotic and prokaryotic complex I. *J Struct Biol*. 2010; 169(1):81-8
173. Hägerhäll C. Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1320(2):107-41
174. Mulkidjanian AY. Ubiquinol oxidation in the cytochrome bc1 complex: reaction mechanism and prevention of short-circuiting. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1709(1):5-34

Bibliografia

175. Brunori M, Wilson MT. Electron transfer and proton pumping in cytochrome oxidase. *Biochimie*. 1995; 77(7-8):668-76
176. Ackerman SH, Tzagoloff A. Function, structure, and biogenesis of mitochondrial ATP synthase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2005; 80:95-133
177. Schlame M, Rua D, Greenberg ML. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res*. 2000; 39:257-88
178. Ardail D, Privat JP, Egret-Charlier M, Levrat C, Lerme F, Louisot P. Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J Biol Chem*. 1990; 265(31):18797-802
179. Goormaghtigh E, Huart P, Praet M, Brasseur R, Ruyschaert JM. Structure of the adriamycin-cardiolipin complex. Role in mitochondrial toxicity. *Biophys Chem*. 1990; 35(2-3):247-57
180. Goormaghtigh E, Chatelain P, Caspers J, Ruyschaert JM. Evidence of a complex between adriamycin derivatives and cardiolipin: possible role in cardiotoxicity. *Biochem Pharmacol*. 1980; 29(21):3003-10
181. Nicolay K, de Kruijff B. Effects of adriamycin on respiratory chain activities in mitochondria from rat liver, rat heart and bovine heart. Evidence for a preferential inhibition of complex III and IV. *Biochim Biophys Acta*. 1987; 892(3):320-30
182. Marcillat O, Zhang Y, Davies KJ. Oxidative and non-oxidative mechanisms in the inactivation of cardiac mitochondrial electron transport chain components by doxorubicin. *Biochem J*. 1989; 259(1):181-9
183. Halestrap AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans*. 2006; 34:232-7
184. Zhou S, Starkov A, Froberg MK, Leino RL, Wallace KB. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *Cancer Res*. 2001; 61(2):771-7
185. Grimm S, Brdiczka D. The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis*. 2007; 12(5):841-55
186. Montaigne D, Marechal X, Preau S, Baccouch R, Modine T, Fayad G, Lancel S, Neviere R. Doxorubicin induces mitochondrial permeability transition and contractile dysfunction in the human myocardium. *Mitochondrion*. 2011; 11(1):22-6
187. Scharstuhl A, Mutsaers HA, Pennings SW, Russel FG, Wagener FA. Involvement of VDAC, Bax and ceramides in the efflux of AIF from mitochondria during curcumin-induced apoptosis. *PLoS One*. 2009; 4(8):e6688
188. Springs SL, Diavolitsis VM, Goodhouse J, McLendon GL. The kinetics of translocation of Smac/DIABLO from the mitochondria to the cytosol in HeLa cells. *J Biol Chem*. 2002; 277(48):45715-8

Bibliografía

189. Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?. *Trends Cell Biol.* 1998; 8(7):267-71
190. Tokarska-Schlattner M, Wallimann T, Schlattner U. Alterations in myocardial energy metabolism induced by the anti-cancer drug doxorubicin. *C R Biol.* 2006; 329(9):657-68
191. Comisión de las comunidades europeas. Reglamento (CE) No 1019/2002 de la comisión de 13 de junio de 2002 sobre las normas de comercialización del aceite de oliva. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. 2002
192. Escrich E, Moral R, Grau L, Costa I, Solanas M. Molecular mechanisms of the effects of olive oil and other dietary lipids on cancer. *Mol Nutr Food Res.* 2007; 51(10):1279-92
193. Hegsted DM, Ausman LM, Johnson JA, Dallal GE. Dietary fat and serum lipids: an evaluation of the experimental data. *Am J Clin Nutr.* 1993; 57(6):875-83
194. Gardner CD, Kraemer HC. Monounsaturated versus polyunsaturated dietary fat and serum lipids. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15(11):1917-27
195. Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb.* 1992; 12(8):911-9
196. Fitó M, de la Torre R, Farré-Albaladejo M, Khymenetz O, Marrugat J, Covas MI. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *Ann Ist Super Sanita.* 2007; 43(4):375-81
197. Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev.* 2005; 18(1):98-112
198. Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr Rev.* 2010; 68(4):191-206
199. Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol.* 2000; 38(8):647-59
200. de la Puerta R, Martínez Domínguez ME, Ruíz-Gutiérrez V, Flavill JA, Hoult JR. Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitric oxide neurotransmission. *Life Sci.* 2001; 69(10):1213-22
201. Menendez JA, Vazquez-Martin A, Garcia-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Oliveras-Ferreros C, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. Anti-HER2 (erbB-2) oncogene effects of phenolic compounds directly isolated from commercial Extra-Virgin Olive Oil (EVOO). *BMC Cancer.* 2008; 8:377
202. Han J, Talorete TP, Yamada P, Isoda H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology.* 2009; 59(1):45-53

Bibliografia

203. Miles EA, Zoubouli P, Calder PC. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition*. 2005; 21(3):389-94
204. de la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Hoult JR. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem Pharmacol*. 1999; 57(4):445-9
205. Prasad K. Hydroxyl radical-scavenging property of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) isolated from flax-seed. *Mol Cell Biochem*. 1997; 168(1-2):117-23
206. Kitts DD, Yuan YV, Wijewickreme AN, Thompson LU. Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. *Mol Cell Biochem*. 1999; 202(1-2):91-100
207. Magee PJ, Rowland IR. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr*. 2004; 91(4):513-31
208. Hutchins AM, Martini MC, Olson BA, Thomas W, Slavin JL. Flaxseed consumption influences endogenous hormone concentrations in postmenopausal women. *Nutr Cancer*. 2001; 39(1):58-65
209. Tan KP, Chen J, Ward WE, Thompson LU. Mammary gland morphogenesis is enhanced by exposure to flaxseed or its major lignan during suckling in rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004; 229(2):147-57
210. Giridharan P, Somasundaram ST, Perumal K, Vishwakarma RA, Karthikeyan NP, Velmurugan R, Balakrishnan A. Novel substituted methylenedioxy lignan suppresses proliferation of cancer cells by inhibiting telomerase and activation of c-myc and caspases leading to apoptosis. *Br J Cancer*. 2002; 87(1):98-105
211. Saarinen NM, Wärrä A, Mäkelä SI, Eckerman C, Reunanen M, Ahotupa M, Salmi SM, Franke AA, Kangas L, Santti R. Hydroxymatairesinol, a novel enterolactone precursor with antitumor properties from coniferous tree (*Picea abies*). *Nutr Cancer*. 2000; 36(2):207-16
212. Mutanen M, Pajari AM, Oikarinen SI. Beef induces and rye bran prevents the formation of intestinal polyps in Apc(Min) mice: relation to beta-catenin and PKC isozymes. *Carcinogenesis*. 2000; 21(6):1167-73
213. Webb AL, McCullough ML. Dietary lignans: potential role in cancer prevention. *Nutr Cancer*. 2005; 51(2):117-31
214. Bindoli A, Cavallini L, Siliprandi N. Inhibitory action of silymarin of lipid peroxide formation in rat liver mitochondria and microsomes. *Biochem Pharmacol*. 1977; 26(24):2405-9
215. Cavallini L, Bindoli A, Siliprandi N. Comparative evaluation of antiperoxidative action of silymarin and other flavonoids. *Pharmacol Res Commun*. 1978; 10(2):133-6
216. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*. 1988; 334(6184):661-5

Bibliografía

217. Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*. 1995; 80(2):225-36
218. González R, Ballester I, López-Posadas R, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, Sánchez de Medina F. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2011; 51(4):331-62
219. Markaverich BM, Roberts RR, Alejandro MA, Johnson GA, Middleditch BS, Clark JH. Bioflavonoid interaction with rat uterine type II binding sites and cell growth inhibition. *J Steroid Biochem*. 1988; 30(1-6):71-8
220. Ahmad N, Gali H, Javed S, Agarwal R. Skin cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin are mediated via impairment of receptor tyrosine kinase signaling and perturbation in cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 247(2):294-301
221. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cáncer. *Pharmacol Rev*. 2000; 52(4):673-751
222. Servili M, Baldioli M, Selvaggini R, Macchioni A, Montedoro G. Phenolic compounds of olive fruit: one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of Nüzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *J Agric Food Chem*. 1999; 47(1):12-8
223. Ryan D, Antolovich M, Herlt T, Prenzler PD, Lavee S, Robards K. Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar hardy's mammoth. *J Agric Food Chem*. 2002; 50(23):6716-24
224. Abaza L, Talorete TP, Yamada P, Kurita Y, Zarrouk M, Isoda H. Induction of growth inhibition and differentiation of human leukemia HL-60 cells by a Tunisian gerboui olive leaf extract. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007; 71(5):1306-12
225. Waterman E, Lockwood B. Active components and clinical applications of olive oil. *Altern Med Rev*. 2007; 12(4):331-42
226. Liu GC, Ahrens EH Jr, Schreiberman PH, Crouse JR. Measurement of squalene in human tissues and plasma: validation and application. *J Lipid Res*. 1976; 17(1):38-45
227. Bellosa S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med*. 2000; 32(3):164-76
228. Newmark HL. Squalene, olive oil, and cancer risk. Review and hypothesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 889:193-203
229. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med*. 1986; 314(8):488-500.
230. Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17(10):1859-67

Bibliografia

231. Hingorani AD. Diet, the endothelium and atherosclerosis. *Clin Sci (Lond)*. 2004; 106(5):447-8
232. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000; 407(6801):233-41
233. Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nature Rev Immunol*. 2010; 10:36-46
234. Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med*. 2002; 8:1235-42
235. Bobryshev YV. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron*. 2006; 37:208-22
236. Weber C, Fraemohs L, Dejana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7:467-77
237. McLaren JE, Ramji DP. Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009; 20:125-35
238. Li N, McLaren JE, Michael DR, Clement M, Fielding CA, Ramji DP. ERK is integral to the interferon-gamma-mediated activation of STAT1, the expression of key genes implicated in atherosclerosis, and the uptake of modified lipoproteins by human macrophages. *J Immunol*. 2010; 185:3041-8
239. Panousis CG, Zuckerman SH. Interferon-gamma induces downregulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20:1565-71
240. Brand K, Mackman N, Curtiss LK. Interferon-gamma inhibits macrophage apolipoprotein E production by posttranslational mechanisms. *J Clin Invest*. 1993; 91:2031-9
241. Panousis CG, Zuckerman SH. Regulation of cholesterol distribution in macrophage-derived foam cells by interferon-gamma. *J Lipid Res*. 2000; 41:75-83
242. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989; 320(14):915-24
243. Galle J, Hansen-Hagge T, Wanner C, Seibold S. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis*. 2006; 185(2):219-26
244. Katsuda S, Kaji T. Atherosclerosis and extracellular matrix. *J Atheroscler Thromb*. 2003; 10:267-74
245. McLaren JE, Michael DR, Ashlin TG, Ramji DP. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy. *Prog Lipid Res*. 2011; 50(4):331-47

Bibliografía

246. Stark AH, Madar Z. Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches. *Nutr Rev.* 2002; 60(6):170-6
247. Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D, Mountokalakis T, Trichopoulou A. Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80:1012-8
248. Visioli F, Galli C. Phenolics from olive oil and its waste products. Biological activities in vitro and in vivo studies. *World Rev Nutr Diet.* 2001; 88:233-7
249. Ochoa JJ, Huertas JR, Quiles JL, Olvera AB, Mataix J. Relative importance of the saponified and unsaponified fractions of dietary olive oil on mitochondrial lipid peroxidation in rabbit heart. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 1999; 9(6):284-8
250. World Health Organization. 2012. [acceso el 9 de Febrero de 2012]. Global health Observatory Map Gallery. Disponible en: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>
251. Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Almazan F, Mattson FH, Khoo JC, Steinberg D, Witztum JL. Feasibility of using an oleate-rich diet to reduce the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification in humans. *Am J Clin Nutr.* 1991; 54(4):701-6
252. Bonanome A, Pagnan A, Biffanti S, Opportuno A, Sorgato F, Dorella M, Maiorino M, Ursini F. Effect of dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on the susceptibility of plasma low density lipoproteins to oxidative modification. *Arterioscler Thromb.* 1992; 12(4):529-33
253. Moreno JJ, Mitjavila MT. The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (review). *J Nutr Biochem.* 2003; 14(4):182-95
254. Parthasarathy S, Khoo JC, Miller E, Barnett J, Witztum JL, Steinberg D. Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: implications for dietary prevention of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(10):3894-8
255. Ramírez-Tortosa MC, Aguilera CM, Quiles JL, Gil A. Influence of dietary lipids on lipoprotein composition and LDL Cu(2+)-induced oxidation in rabbits with experimental atherosclerosis. *Biofactors.* 1998; 8(1-2):79-85
256. Fitó M, Gimeno E, Covas MI, Miró E, López-Sabater Mdel C, Farré M, de TR, Marrugat J. Postprandial and short-term effects of dietary virgin olive oil on oxidant/antioxidant status. *Lipids.* 2002; 37(3):245-51
257. Mesa MD, Aguilera CM, Ramírez-Tortosa CL, Gil A, Ramírez-Tortosa MC. Effect of olive oil on cardiovascular risk factor, LDL oxidation and atherosclerosis development. In: Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Yaqoob P, eds. *Olive Oil and Health.* Oxford: CABI Publishing; 2006:194–222
258. Ruano J, López-Miranda J, de la Torre R, Delgado-Lista J, Fernández J, Caballero J, Covas MI, Jiménez Y, Pérez-Martínez P, Marín C, Fuentes F, Pérez-Jiménez F. Intake of phenol-rich

Bibliografía

- virgin olive oil improves the postprandial prothrombotic profile in hypercholesterolemic patients. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86(2):341-6
259. Degirolamo C, Rudel LL. Dietary monounsaturated fatty acids appear not to provide cardioprotection. *Curr Atheroscler Rep.* 2010; 12(6):391-6
260. Cicerale S, Lucas L, Keast R. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int J Mol Sci.* 2010; 11(2):458-79
261. Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev.* 2005; 18(1):98-112
262. Covas MI. Bioactive effects of olive oil phenolic compounds in humans: reduction of heart disease factors and oxidative damage. *Inflammopharmacology.* 2008; 16(5):216-8
263. Fitó M, Cladellas M, de la Torre R, Martí J, Muñoz D, Schröder H, Alcántara M, Pujadas-Bastardes M, Marrugat J, López-Sabater MC y col; SOLOS Investigators. Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: a randomized, crossover, controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 2008; 62(4):570-4
264. Escrich E, Solanas M, Moral R, Escrich R. Modulatory effects and molecular mechanisms of olive oil and other dietary lipids in breast cancer. *Curr Pharm Des.* 2011; 17(8):813-30
265. Corona G, Deiana M, Incani A, Vauzour D, Dessì MA, Spencer JP. Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1. *Mol Nutr Food Res.* 2009; 53(7):897-903
266. Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr Rev.* 2010; 68(4):191-206
267. Visioli F, Grande S, Bogani P, Galli C. Antioxidant properties of olive oil phenolics. In: Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Yaqoob P, eds. *Olive Oil and Health.* Oxford: CABI Publishing; 2006:109–118
268. Di Benedetto R, Vari R, Scaccocchio B, Filesi C, Santangelo C, Giovannini C, Matarrese P, D'Archivio M, Masella R. Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007; 17(7):535-45
269. González-Santiago M, Martín-Bautista E, Carrero JJ, Fonollá J, Baró L, Bartolomé MV, Gil-Loyzaga P, López-Huertas E. One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis.* 2006; 188:35–42
270. Rietjens SJ, Bast A, Haenen GR. New insights into controversies on the antioxidant potential of the olive oil antioxidant hydroxytyrosol. *J Agric Food Chem.* 2007; 55:7609–7614

Bibliografia

271. Masella R, Vari R, D'Archivio M, Di Benedetto R, Matarrese P, Malorni W, Scazzocchio B, Giovannini C. Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *J Nutr.* 2004; 134(4):785-91
272. Weinbrenner T, Fitó M, de la Torre R, Saez GT, Rijken P, Tormos C, Coolen S, Albaladejo MF, Abanades S, Schroder H, Marrugat J, Covas MI. Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *J Nutr.* 2004; 134(9):2314-21
273. Visioli F, Caruso D, Grande S, Bosisio R, Villa M, Galli G, Sirtori C, Galli C. Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur J Nutr.* 2005; 44(2):121-7
274. Cicerale S, Conlan XA, Sinclair AJ, Keast RS. Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2009; 49(3):218-36
275. Goya L, Mateos R, Bravo L. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Eur J Nutr.* 2007; 46(2):70-8
276. Moreno JJ. Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radic Biol Med.* 2003; 35(9):1073-81
277. Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 247(1):60-4
278. Bogani P, Galli C, Villa M, Visioli F. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis.* 2007; 190(1):181-6
279. Salvini S, Sera F, Caruso D, Giovannelli L, Visioli F, Saieva C, Masala G, Ceroti M, Giovacchini V, Pitozzi V y col. Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *Br J Nutr.* 2006; 95(4):742-51
280. Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Montedoro G, Zappia V. Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J Nutr Biochem.* 1999; 10(3):159-65
281. Trichopoulou A, Dilis V. Olive oil and longevity. *Mol Nutr Food Res.* 2007; 51(10):1275-8
282. Servili M, Esposto S, Fabiani R, Urbani S, Taticchi A, Mariucci F, Selvaggini R, Montedoro GF. Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology.* 2009; 17(2):76-84
283. Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa C, Camacho-Corencia P, Sanchez-Rovira P, Vera-Ramirez L, Ramirez-Tortosa MC. Hydroxytyrosol inhibits growth and cell proliferation and promotes high expression of sfrp4 in rat mammary tumours. *Mol Nutr Food Res.* 2011; 55 Suppl 1:S117-26. doi: 10.1002/mnfr.201000220
284. Bouallagui Z, Han J, Isoda H, Sayadi S. Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 2011; 49(1):179-84

Bibliografía

285. Sirianni R, Chimento A, De Luca A, Casaburi I, Rizza P, Onofrio A, Iacopetta D, Puoci F, Andò S, Maggiolini M y col. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Mol Nutr Food Res*. 2010; 54(6):833-40
286. Della Ragione F, Cucciolla V, Criniti V, Indaco S, Borriello A, Zappia V. Antioxidants induce different phenotypes by a distinct modulation of signal transduction. *FEBS Lett*. 2002; 532(3):289-94
287. Sergio Granados Principal. Papel del aceite de oliva en nuevos tratamientos del cáncer de mama: Estudio del potencial terapéutico del hidroxitirosol y los mecanismos moleculares asociados a su uso como quimioterápico. Editorial academica española. 2008
288. Acquaviva R, Di Giacomo C, Sorrenti V, Galvano F, Santangelo R, Cardile V, Gangia S, D'Orazio N, Abraham NG, Vanella L. Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *Int J Oncol*. 2012. doi: 10.3892/ijo.2012.1428
289. Hamdi HK, Castellon R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 334(3):769-78
290. Van Duuren BL, Goldschmidt BM. Cocarcinogenic and tumor-promoting agents in tobacco carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 1976; 56(6):1237-42
291. Murakoshi M, Nishino H, Tokuda H, Iwashima A, Okuzumi J, Kitano H, Iwasaki R. Inhibition by squalene of the tumor-promoting activity of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse-skin carcinogenesis. *Int J Cancer*. 1992; 52(6):950-2
292. Newmark HL. Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997; 6(12):1101-3
293. Kato K, Cox AD, Hisaka MM, Graham SM, Buss JE, Der CJ. Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(14):6403-7
294. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 1989; 49(17):4682-9
295. Abarzua S, Serikawa T, Szewczyk M, Richter DU, Piechulla B, Briese V. Antiproliferative activity of lignans against the breast carcinoma cell lines MCF 7 and BT 20. *Arch Gynecol Obstet*. 2012; 285(4):1145-51
296. Mousavi Y, Adlercreutz H. Enterolactone and estradiol inhibit each other's proliferative effect on MCF-7 breast cancer cells in culture. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992; 41(3-8):615-9
297. Theil C, Briese V, Gerber B, Richter DU. The effects of different lignans and isoflavones, tested as aglycones and glycosides, on hormone receptor-positive and -negative breast carcinoma cells in vitro. *Arch Gynecol Obstet*. 2011; 284(2):459-65
298. Yoo JH, Lee HJ, Kang K, Jho EH, Kim CY, Baturen D, Tunsag J, Nho CW. Lignans inhibit cell growth via regulation of Wnt/beta-catenin signaling. *Food Chem Toxicol*. 2010; 48(8-9):2247-52

Bibliografía

299. Miro-Casas E, Covas MI, Farre M, Fito M, Ortuño J, Weinbrenner T, Roset P, de la Torre R. Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clin Chem*. 2003; 49(6 Pt 1):945-52
300. D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrìca P, Capasso G, Pontoni G, Galletti P, Zappia V. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metab Dispos*. 2001; 29(11):1492-8
301. Christian MS, Sharper VA, Hoberman AM, Seng JE, Fu L, Covell D, Diener RM, Bitler CM, Crea R. The toxicity profile of hydrolyzed aqueous olive pulp extract. *Drug Chem Toxicol*. 2004; 27(4):309-30
302. D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrìca P, Capasso G, Pontoni G, Galletti P, Zappia V. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metab Dispos*. 2001; 29(11):1492-8
303. Rodríguez-Ramiro I, Martín MÁ, Ramos S, Bravo L, Goya L. Olive oil hydroxytyrosol reduces toxicity evoked by acrylamide in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress. *Toxicology*. 2011; 288(1-3):43-8
304. St-Laurent-Thibault C, Arseneault M, Longpré F, Ramassamy C. Tyrosol and hydroxytyrosol, two main components of olive oil, protect N2a cells against amyloid- β -induced toxicity. Involvement of the NF- κ B signaling. *Curr Alzheimer Res*. 2011; 8(5):543-51
305. Ilavarasi K, Kiruthiga PV, Pandian SK, Devi KP. Hydroxytyrosol, the phenolic compound of olive oil protects human PBMC against oxidative stress and DNA damage mediated by 2,3,7,8-TCDD. *Chemosphere*. 2011; 84(7):888-93
306. Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Eur J Cancer Prev*. 2002; 11(4):351-8
307. Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Morozzi G. Inhibition of cell cycle progression by hydroxytyrosol is associated with upregulation of cyclin-dependent protein kinase inhibitors p21(WAF1/Cip1) and p27(Kip1) and with induction of differentiation in HL60 cells. *J Nutr*. 2008; 138:42-48
308. Menendez JA, Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, Carrasco-Pancorbo A, Garcia-Villalba R, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2007; 7:80
309. Romero C, Medina E, Vargas J, Brenes M, De Castro A. In vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J Agric Food Chem*. 2007; 55(3):680-6
310. Medina E, de Castro A, Romero C, Brenes M. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *J Agric Food Chem*. 2006; 54(14):4954-61

Bibliografia

311. Medina E, Brenes M, Romero C, García A, de Castro A. Main antimicrobial compounds in table olives. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(24):9817-23
312. Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol.* 1999; 51(8):971-4.
313. Rowley D, Gutteridge JM, Blake D, Farr M, Halliwell B. Lipid peroxidation in rheumatoid arthritis: thiobarbituric acid-reactive material and catalytic iron salts in synovial fluid from rheumatoid patients. *Clin Sci (Lond).* 1984; 66(6):691-5
314. Grootveld M, Henderson EB, Farrell A, Blake DR, Parkes HG, Haycock P. Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint. Detection of abnormal low-molecular-mass metabolites by proton-n.m.r. spectroscopy. *Biochem J.* 1991; 273(Pt 2):459-67
315. Cooper B, Creeth JM, Donald AS. Studies of the limited degradation of mucus glycoproteins. The mechanism of the peroxide reaction. *Biochem J.* 1985; 228(3):615-26
316. Davies JM, Horwitz DA, Davies KJ. Potential roles of hypochlorous acid and N-chloroamines in collagen breakdown by phagocytic cells in synovitis. *Free Radic Biol Med.* 1993; 15(6):637-43
317. Wasil M, Halliwell B, Moorhouse CP, Hutchison DC, Baum H. Biologically-significant scavenging of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by some anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol.* 1987; 36(22):3847-50
318. Darlington LG, Stone TW. Antioxidants and fatty acids in the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders. *Br J Nutr.* 2001; 85(3):251-69
319. Kaklamani VG, Kaklamani E, Koumantaki Y, Giziaki E, Papazoglou S, Mantzoros CS. Dietary factors in relation to rheumatoid arthritis: a role for olive oil and cooked vegetables?. *Am J Clin Nutr.* 1999; 70(6):1077-82
320. Kremer JM, Lawrence DA, Jubiz W, DiGiacomo R, Rynes R, Bartholomew LE, Sherman M. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects. *Arthritis Rheum.* 1990; 33(6):810-20
321. Zhang X, Cao J, Zhong L. Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2009; 379(6):581-6
322. Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *J Nutr.* 2008; 138(8):1411-6
323. O'Dowd Y, Driss F, Dang PM, Elbim C, Gougerot-Pocidal MA, Pasquier C, El-Benna J. Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen

Bibliografía

- peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68(10):2003-8
324. Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, Galli C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res.* 1995; 78(2):151-60
325. González-Correa JA, Navas MD, Muñoz-Marín J, Trujillo M, Fernández-Bolaños J, de la Cruz JP. Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to rats on platelet function compared to acetylsalicylic acid. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(17):7872-6
326. Petroni A, Blasevich M, Papini N, Salami M, Sala A, Galli C. Inhibition of leukocyte leukotriene B4 production by an olive oil-derived phenol identified by mass-spectrometry. *Thromb Res.* 1997; 87(3):315-22
327. Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distanti A, De Caterina R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(4):622-9
328. Manna C, Napoli D, Cacciapuoti G, Porcelli M, Zappia V. Olive oil phenolic compounds inhibit homocysteine-induced endothelial cell adhesion regardless of their different antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2009; 57(9):3478-82
329. Leenen R, Roodenburg AJ, Vissers MN, Schuurbijs JA, van Putte KP, Wiseman SA, van de Put FH. Supplementation of plasma with olive oil phenols and extracts: influence on LDL oxidation. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(5):1290-7
330. Marrugat J, Covas MI, Fitó M, Schröder H, Miró-Casas E, Gimeno E, López-Sabater MC, de la Torre R, Farré M; SOLOS Investigators. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation--a randomized controlled trial. *Eur J Nutr.* 2004; 43(3):140-7
331. Jemai H, Fki I, Bouaziz M, Bouallagui Z, El Feki A, Isoda H, Sayadi S. Lipid-lowering and antioxidant effects of hydroxytyrosol and its triacetylated derivative recovered from olive tree leaves in cholesterol-fed rats. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(8):2630-6
332. Pérez-Jiménez F, Ruano J, Perez-Martinez P, Lopez-Segura F, Lopez-Miranda J. The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Mol Nutr Food Res.* 2007; 51(10):1199-208
333. Carluccio MA, Ancora MA, Massaro M, Carluccio M, Scoditti E, Distanti A, Storelli C, De Caterina R. Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293(4):H2344-54
334. Lee-Huang S, Huang PL, Zhang D, Lee JW, Bao J, Sun Y, Chang YT, Zhang J, Huang PL. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. fusion [corrected] inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 354(4):872-8

Bibliografia

335. Yamada K, Ogawa H, Hara A, Yoshida Y, Yonezawa Y, Karibe K, Nghia VB, Yoshimura H, Yamamoto Y, Yamada M, Nakamura K, Imai K. Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. *Antiviral Res.* 2009; 83(1):35-44
336. Poudyal H, Campbell F, Brown L. Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *J Nutr.* 2010; 140(5):946-53
337. Hamden K, Allouche N, Damak M, Elfeki A. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chem Biol Interact.* 2009; 180(3):421-32
338. Eidi A, Eidi M, Darzi R. Antidiabetic effect of *Olea europaea* L. in normal and diabetic rats. *Phytother Res.* 2009; 23(3):347-50
339. Jemai H, El Feki A, Sayadi S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J Agric Food Chem.* 2009; 57(19):8798-804
340. Chimi H, Morel I, Lescoat G, Padeloup N, Cillard P, Cillard J. Inhibition of iron toxicity in rat hepatocyte culture by natural phenolic compounds. *Toxicol In Vitro.* 1995; 9(5):695-702
341. Ramirez-Tortosa MC, Urbano G, López-Jurado M, Nestares T, Gomez MC, Mir A, Ros E, Mataix J, Gil A. Extra-virgin olive oil increases the resistance of LDL to oxidation more than refined olive oil in free-living men with peripheral vascular disease. *J Nutr.* 1999; 129(12):2177-83
342. de la Torre R. Bioavailability of olive oil phenolic compounds in humans. *Inflammopharmacology.* 2008; 16(5):245-7
343. Carluccio MA, Massaro M, Scoditti E, De Caterina R. Vasculoprotective potential of olive oil components. *Mol Nutr Food Res.* 2007; 51(10):1225-34
344. Visioli F, Poli A, Gall C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev.* 2002; 22(1):65-75
345. Barros AC, Muranaka EN, Mori LJ, Pelizon CH, Iriya K, Giocondo G, Pinotti JA. Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 2004; 59(5):257-61
346. Russo J, Russo IH. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res Treat.* 1996; 39(1):7-20
347. Murad TM, Von Haam E. Studies of mammary carcinoma induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene administration. *Cancer Res.* 1972; 32(7):1404-15
348. Griswold DP, Skipper HE, Laster WR Jr, Wilcox WS, Schabel FM Jr. Induced mammary carcinoma in the female rat as a drug evaluation system. *Cancer Res.* 1966; 26(10):2169-80

Bibliografia

349. Thakur P, Sanyal SN. Induction of pulmonary carcinogenesis in Wistar rats by a single dose of 9, 10 dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) and the chemopreventive role of diclofenac. *Exp Mol Pathol.* 2010; 88(3):394-400
350. Hoyer PB, Davis JR, Bedrnicek JB, Marion SL, Christian PJ, Barton JK, Brewer MA. Ovarian neoplasm development by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) in a chemically-induced rat model of ovarian failure. *Gynecol Oncol.* 2009; 112(3):610-5
351. Hollingsworth AB, Lerner MR, Lightfoot SA, Wilkerson KB, Hanas JS, McCay PB, Brackett DJ. Prevention of DMBA-induced rat mammary carcinomas comparing leuprolide, oophorectomy, and tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 1998; 47(1):63-70
352. Huggins C, Grand LC, Brillantes FP. CRITICAL SIGNIFICANCE OF BREAST STRUCTURE IN THE INDUCTION OF MAMMARY CANCER IN THE RAT. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1959; 45(8):1294-300
353. Cuggins C, Grand LC, Brillantes FP. Mammary cancer induced by a single feeding of polymucular hydrocarbons, and its suppression. *Nature.* 1961; 189:204-7
354. Johnson AT, Kaufmann Y, Luo S, Babb K, Hawk R, Klimberg VS. Gut glutathione metabolism and changes with 7,12-DMBA and glutamine. *J Surg Res.* 2003; 115(2):242-246
355. Johnson AT, Kaufmann YC, Luo S, Todorova V, Klimberg VS. Effect of glutamine on glutathione, IGF-I, and TGF-beta 1. *J Surg Res.* 2003; 111(2):222-228
356. Todorova VK, Harms SA, Luo S, Kaufmann Y, Babb KB, Klimberg VS. Oral glutamine (AES-14) supplementation inhibits PI-3K/Akt signaling in experimental breast cancer. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2003; 27(6):404-410
357. Todorova VK, Harms SA, Kaufmann Y, Luo S, Luo KQ, Babb K, Klimberg VS. Effect of dietary glutamine on tumor glutathione levels and apoptosis-related proteins in DMBA-induced breast cancer of rats. *Breast Cancer Res Treat.* 2004; 88:247-256
358. Todorova VK, Kaufmann Y, Luo S, Klimberg VS. Modulation of p53 and c-myc in DMBA-induced mammary tumors by oral glutamine. *Nutr Cancer.* 2006; 54(2):263-273
359. Perumal SS, Shanthi P, Sachdanandam P. Combined efficacy of tamoxifen and coenzyme Q10 on the status of lipid peroxidation and antioxidants in DMBA induced breast cancer. *Mol Cell Biochem.* 2005; 273(1-2):151-60
360. Abbadessa G, Spaccamiglio A, Sartori ML, Nebbia C, Dacasto M, Di Carlo F, Racca S. The aspirin metabolite, salicylate, inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-DNA adduct formation in breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2006; 28(5):1131-1140
361. Veena K, Shanthi P, Sachdanandam P. The biochemical alterations following administration of Kalpaamruthaa and Semecarpusanacardium in mammary carcinoma. *Chem Biol Interact.* 2006; 161(1):69-78

Bibliografía

362. Arulkumaran S, Ramprasath VR, Shanthi P, Sachdanandam P. Alteration of DMBA-induced oxidative stress by additive action of a modified indigenous preparation--Kalpaamruthaa. *Chem Biol Interact.* 2007; 167(2):99-106
363. Escrich E, Moral R, García G, Costa I, Sánchez JA, Solanas M. Identification of novel differentially expressed genes by the effect of a high-fat n-6 diet in experimental breast cancer. *Mol Carcinog.* 2004; 40(2):73-8
364. Liu J, Kraut EH, Balcerzak S, Grever M, D'Ambrosio S, Chan KK. Dosing sequence-dependent pharmacokinetic interaction of oxaliplatin with paclitaxel in the rat. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002; 50: 445-453
365. Ueno M, Kakinuma Y, Yuhki K, Murakoshi N, Iemitsu M, Miyauchi T, Yamaguchi I. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *J Pharmacol Sci.* 2006; 101(2):151-158
366. Xiang P, Deng HY, Li K, Huang GY, Chen Y, Tu L, Ng PC, Pong NH, Zhao H, Zhang L y col. Dexrazoxane protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy: upregulation of Akt and Erk phosphorylation in a rat model. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009; 63(2):343-9
367. Della Torre P, Imondi AR, Bernardi C, Podesta A, Moneta D, Riflettuto M, Mazue G. Cardioprotection by dexrazoxane in rats treated with doxorubicin and paclitaxel. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999; 44(2):138-142
368. Della Torre P, Mazué G, Podestá A, Moneta D, Sammartini U, Imondi AR. Protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity in weanling rats by dexrazoxane. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999; 43:151-156
369. Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J.* 1992; 281 (Pt 1):21-40
370. Billingham ME. Direct and indirect morphological markers of cocaine toxicity in the human heart. *NIDA Res Monogr.* 1991; 108:202-19
371. Rasband MN. Na⁺ channels get anchored...with a little help. *J Cell Biol.* 2008; 183(6):975-7
372. Pamplona R, Dalfó E, Ayala V, Bellmunt MJ, Prat J, Ferrer I, Portero-Otín M. Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycooxidation, and lipoxidation. Effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets. *J Biol Chem.* 2005; 280(22):21522-30
373. Caro P, Gomez J, Sanchez I, Garcia R, López-Torres M, Naudí A, Portero-Otín M, Pamplona R, Barja G. Effect of 40% restriction of dietary amino acids (except methionine) on mitochondrial oxidative stress and biogenesis, AIF and SIRT1 in rat liver. *Biogerontology.* 2009; 10(5):579-92

Bibliografía

374. Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(6):1425-38
375. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997; 272(33):20313-6
376. Frias MA, Lang U, Gerber-Wicht C, James RW. Native and reconstituted HDL protect cardiomyocytes from doxorubicin-induced apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2010; 85(1):118-26
377. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Bátkai S, Kashiwaya Y, Haskó G, Liaudet L, Szabó C, Pacher P. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 296(5):H1466-83
378. Berthiaume JM, Wallace KB. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell Biol Toxicol.* 2007; 23(1):15-25
379. González-Santiago M. Estudio de los efectos cardiovasculares y la absorción oral del hidroxitirosol en modelos animales y humanos. Ed. Universidad de Granada. 2005. ISBN: 84-338-3409-6
380. Injac R, Perse M, Cerne M, Potocnik N, Radic N, Govedarica B, Djordjevic A, Cerar A, Strukelj B. Protective effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats with colorectal cancer. *Biomaterials.* 2009; 30(6):1184-96
381. Momin FN, Kalai BR, Shikalgar TS, Naikwade NS. Cardioprotective effect of methanolic extract of *Ixora coccinea* Linn. leaves on doxorubicin-induced cardiac toxicity in rats. *Indian J Pharmacol.* 2012; 44(2):178-83
382. Elberry AA, Abdel-Naim AB, Abdel-Sattar EA, Nagy AA, Mosli HA, Mohamadin AM, Ashour OM. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(5):1178-84
383. Andreadou I, Sigala F, Iliodromitis EK, Papaefthimiou M, Sigalas C, Aligiannis N, Savvari P, Gorgoulis V, Papalabros E, Kremastinos DT. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42(3):549-58
384. Iqbal M, Dubey K, Anwer T, Ashish A, Pillai KK. Protective effects of telmisartan against acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Pharmacol Rep.* 2008; 60(3):382-90
385. Herman EH, Zhang J, Chadwick DP, Ferrans VJ. Comparison of the protective effects of amifostine and dexrazoxane against the toxicity of doxorubicin in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000; 45(4):329-34
386. Campos EC, O'Connell JL, Malvestio LM, Romano MM, Ramos SG, Celes MR, Prado CM, Simões MV, Rossi MA. Calpain-mediated dystrophin disruption may be a potential structural

Bibliografia

- culprit behind chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Eur J Pharmacol.* 2011; 670(2-3):541-53
387. Hong YM, Kim HS, Yoon HR. Serum lipid and fatty acid profiles in adriamycin-treated rats after administration of L-carnitine. *Pediatr Res.* 2002; 51(2):249-55
388. Hrelia S, Bordoni A, Angeloni C, Leoncini E, Toschi TG, Lercker G, Biagi PL. Green tea extracts can counteract the modification of fatty acid composition induced by doxorubicin in cultured cardiomyocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002; 66(5-6):519-24
389. Bordoni A, Biagi P, Hrelia S. The impairment of essential fatty acid metabolism as a key factor in doxorubicin-induced damage in cultured rat cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1440(1):100-6
390. Lebrecht D, Setzer B, Ketelsen UP, Haberstroh J, Walker UA. Time-dependent and tissue-specific accumulation of mtDNA and respiratory chain defects in chronic doxorubicin cardiomyopathy. *Circulation.* 2003; 108(19):2423-9
391. Aversano RC, Boor PJ. Histochemical alterations of acute and chronic doxorubicin cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol.* 1983; 15(8):543-53
392. Papadopoulou LC, Theophilidis G, Thomopoulos GN, Tsiftoglou AS. Structural and functional impairment of mitochondria in adriamycin-induced cardiomyopathy in mice: suppression of cytochrome c oxidase II gene expression. *Biochem Pharmacol.* 1999; 57(5):481-9
393. Teng LL, Shao L, Zhao YT, Yu X, Zhang DF, Zhang H. The beneficial effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on doxorubicin-induced chronic heart failure in rats. *J Int Med Res.* 2010; 38(3):940-8
394. Moriyama T, Kemi M, Okumura C, Yoshihara K, Horie T. Involvement of advanced glycation end-products, pentosidine and N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine, in doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Toxicology.* 2010; 268(1-2):89-97
395. Rashikh A, Abul Kalam Najmi, Akhtar M, Mahmood D, Pillai KK, Ahmad SJ. Protective effects of aliskiren in doxorubicin-induced acute cardiomyopathy in rats. *Hum Exp Toxicol.* 2011; 30(2):102-9
396. Othman AI, El-Missiry MA, Amer MA, Arafa M. Melatonin controls oxidative stress and modulates iron, ferritin, and transferrin levels in adriamycin treated rats. *Life Sci.* 2008; 83(15-16):563-8
397. Oliveira PJ, Gonçalves L, Monteiro P, Providencia LA, Moreno AJ. Are the antioxidant properties of carvedilol important for the protection of cardiac mitochondria?. *Curr Vasc Pharmacol.* 2005; 3(2):147-58
398. Santos DL, Moreno AJ, Leino RL, Froberg MK, Wallace KB. Carvedilol protects against doxorubicin-induced mitochondrial cardiomyopathy. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002; 185(3):218-27

Bibliografía

399. Junjing Z, Yan Z, Baolu Z. Scavenging effects of dexrazoxane on free radicals. *J Clin Biochem Nutr.* 2010; 47(3):238-45
400. Caro P, Gómez J, López-Torres M, Sánchez I, Naudí A, Jove M, Pamplona R, Barja G. Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology.* 2008; 9(3):183-96
401. Caro P, Gomez J, Sanchez I, Naudi A, Ayala V, López-Torres M, Pamplona R, Barja G. Forty percent methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I during forward electron flow and lowers oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in rat kidney and brain mitochondria. *Rejuvenation Res.* 2009; 12(6):421-34
402. Urbano A, Lakshmanan U, Choo PH, Kwan JC, Ng PY, Guo K, Dhakshinamoorthy S, Porter A. AIF suppresses chemical stress-induced apoptosis and maintains the transformed state of tumor cells. *EMBO J.* 2005; 24(15):2815-26
403. Xu LJ, Jin L, Pan H, Zhang AZ, Wei G, Li PP, Lu WY. Deferiprone protects the isolated atria from cardiotoxicity induced by doxorubicin. *Acta Pharmacol Sin.* 2006; 27(10):1333-9
404. Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev.* 2007; 87(4):1175-213
405. Cornwell DG, Ma J. Nutritional benefit of olive oil: the biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(19):8774-86
406. Pointon AV, Walker TM, Phillips KM, Luo J, Riley J, Zhang SD, Parry JD, Lyon JJ, Marczylo EL, Gant TW. Doxorubicin in vivo rapidly alters expression and translation of myocardial electron transport chain genes, leads to ATP loss and caspase 3 activation. *PLoS One.* 2010; 5(9):e12733
407. Xiong Y, Liu X, Lee CP, Chua BH, Ho YS. Attenuation of doxorubicin-induced contractile and mitochondrial dysfunction in mouse heart by cellular glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med.* 2006; 41(1):46-55
408. Gnanapragasam A, Yogeeta S, Subhashini R, Ebenezer KK, Sathish V, Devaki T. Adriamycin induced myocardial failure in rats: protective role of *Centella asiatica*. *Mol Cell Biochem.* 2007; 294(1-2):55-63
409. Lebrecht D, Kirschner J, Geist A, Haberstroh J, Walker UA. Respiratory chain deficiency precedes the disrupted calcium homeostasis in chronic doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol.* 2010; 19(5):e167-74
410. Lebrecht D, Kokkori A, Ketelsen UP, Setzer B, Walker UA. Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin. *J Pathol.* 2005; 207(4):436-44
411. Valls-Belles V, Torres C, Muñiz P, Codoñer-Franch P. Effect of beer consumption on levels of complex I and complex IV liver and heart mitochondrial enzymes and coenzymes Q9 and Q10 in adriamycin-treated rats. *Eur J Nutr.* 2010; 49(3):181-7

Bibliografía

412. Wallace KB. Adriamycin-induced interference with cardiac mitochondrial calcium homeostasis. *Cardiovasc Toxicol*. 2007; 7(2):101-7
413. Nakamura T, Ueda Y, Juan Y, Katsuda S, Takahashi H, Koh E. Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: In vivo study. *Circulation*. 2000; 102(5):572-8
414. Bae S, Siu PM, Choudhury S, Ke Q, Choi JH, Koh YY, Kang PM. Delayed activation of caspase-independent apoptosis during heart failure in transgenic mice overexpressing caspase inhibitor CrmA. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 299(5):H1374-81
415. Ikeda Y, Aihara K, Akaike M, Sato T, Ishikawa K, Ise T, Yagi S, Iwase T, Ueda Y, Yoshida S y col. Androgen receptor counteracts Doxorubicin-induced cardiotoxicity in male mice. *Mol Endocrinol*. 2010; 24(7):1338-48
416. Ding Y, Choi KJ, Kim JH, Han X, Piao Y, Jeong JH, Choe W, Kang I, Ha J, Forman HJ y col. Endogenous hydrogen peroxide regulates glutathione redox via nuclear factor erythroid 2-related factor 2 downstream of phosphatidylinositol 3-kinase during muscle differentiation. *Am J Pathol*. 2008; 172(6):1529-41
417. Thompson KL, Rosenzweig BA, Zhang J, Knapton AD, Honchel R, Lipshultz SE, Retief J, Sistare FD, Herman EH. Early alterations in heart gene expression profiles associated with doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010; 66(2):303-14

Anexo de tablas y figuras

Figura 1. Fenotipo de una célula cancerosa

Figura 2. Esquema sobre la replicación de las células madre

Figura 3. Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más frecuentes en mujeres en el mundo en el 2008

Figura 4. Cáncer de mama en mujeres. Tasas de incidencia por cada 100.000 habitantes, divididos por raza y grupo étnico, EE.UU., 1999-2007

Figura 5. Cáncer de mama en mujeres. Tasas de mortalidad por cada 100.000 habitantes, divididos por raza y grupo étnico, EE.UU., 1999-2007

Figura 6. Esquema de la técnica del ganglio centinela

Figura 7. Mecanismo de acción de los antimetabolitos 5-Fluorouracilo y Metotrexato

Figura 8. Formula química del 14-hidroxi-daunorubicina o doxorubicina

Figura 9. Mecanismo de actuación de la doxorubicina

Figura 10. Consecuencias de la producción de especies reactivas de oxígeno por parte de la doxorubicina

Figura 11. Ciclo de oxidoreducción de la doxorubicina

Figura 12. Ciclo celular y fases en las que interviene p53

Figura 13. Funciones de AIF

Figura 14. Causas de la mayor susceptibilidad del tejido cardiaco frente al daño oxidativo producido por la doxorubicina

Figura 15. Esquema de los diferentes componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial

Figura 16. Consecuencias de la producción de ROS sobre la mitocondria

Figura 17. Principales compuestos fenólicos del aceite de oliva

Figura 18. Aceite de oliva como antioxidante

Figura 19. Hidroxitirosol como antioxidante

Figura 20. Estructura molecular del 3,4-dihidroxifeniletanol o hidroxitirosol

Figura 21. Mecanismos mediante los cuales el hidroxitirosol puede evitar la formación de ERO

Figura 22. Modelo de inducción química de cáncer de mama con DMBA

Figura 23. Diferentes modelos de agujas de gavage

Figura 24. Radiografía de una rata con una aguja de gavage introducida hasta el estómago

Figura 25. Sistema de implantación y lectura de microchips

Figura 26. Esquema simplificado del tratamiento semanal con hidroxitirosol

Figura 27. Secuencia de imágenes de la canulación de la arteria aorta abdominal

Figura 28. Microplaca estándar de 96 pocillos

Figura 29. Esquema de la reacción producida en la lámina de los dipsticks

Figura 30. Dibujo esquemático de la lámina donde se produce la reacción entre el complejo I y el NADH, que proporcionará la medida de la actividad del complejo I

Figura 31. Esquema general de la reacción producida en la lámina de los dipsticks

Figura 32. Esquema de la reacción de determinación de la actividad para el complejo IV de la cadena de transporte electrónico mitocondrial

Figura 33. Dibujo esquemático de la lámina donde se produce la reacción entre el complejo IV y el citocromo c, que proporcionará la medida de la actividad del complejo IV

Figura 34. Niveles de hidroxitirosol y su metabolito alcohol homovanílico en plasma en los grupos tratados con hidroxitirosol e hidroxitirosol con doxorubicina

Figura 35. Tinción hematoxilina-eosina de tejido cardíaco de rata tras un tratamiento crónico con doxorubicina

Figura 36. Grado Billingham, indicador del grado de daño producido por la doxorubicina sobre los cardiomiocitos

Figura 37. Efecto de la doxorubicina, hidroxitirosol y su combinación en la ultraestructura mitocondrial en corazón

Figura 38. Niveles de GSA en las ratas de experimentación

Figura 39. Niveles de ASAA en las ratas de experimentación

Figura 40. Niveles de CEL en las ratas de experimentación

Figura 41. Niveles de CML en las ratas de experimentación

Figura 42. Niveles de MDAL en las ratas de experimentación

Figura 43. Efectos de adriamicina, hidroxitirosol y su combinación sobre la cantidad de complejo mitocondrial I (Sub-unidad de 39 KDa, NDUFA9), I (Sub-unidad de 30 KDa, NDUFS3), II (Sub-unidad de 70 KDa, Flavoproteína), III (Sub-unidad de 48 KDa, COREII), III (Sub-unidad de 29 KDa, Rieske), IV (Sub-unidad de 57 KDa, COXI) en corazón

Figura 44. Efecto de la adriamicina, hidroxitirosol y su combinación en los niveles de AIF en corazón

Figura 45. Efecto del hidroxitirosol, doxorubicina y su combinación sobre la actividad del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial

Figura 46. Imágenes de cardiomiocitos mediante el ensayo TUNEL para la detección de apoptosis

Figura 47. Expresión de la proteína TFAM en muestras de tejido cardíaco

Figura 48. Expresión de la proteína Nrf2 en muestras de tejido cardíaco

Tabla 1. Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más frecuentes en la mujer en el mundo en el 2008

Tabla 2. Resumen de los factores de riesgo que intervienen en la aparición de cáncer de mama

Tabla 3. Terapias más usadas en el tratamiento del cáncer de mama

Tabla 4. Concentración de los principales compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen extra

Tabla 5. Concentración de los principales compuestos fenólicos del aceite de la hoja del olivo

Tabla 6. Proporciones de reactivos necesarias para elaborar el reactivo de trabajo para el complejo I

Tabla 7. Proporciones de reactivos necesarias para elaborar el reactivo de trabajo para el complejo IV

Tabla 8. Efectos de la doxorubicina, hidroxitirosol y su combinación en los parámetros plasmáticos, peso corporal y del corazón

Tabla 9. Efecto de la doxorubicina, hidroxitirosol y su combinación sobre la composición (%) de ácidos grasos del total de lípidos en corazón