

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS

COMPLEJO HOSPITALARIO DE JAÉN



“MECANISMOS MOLECULARES Y EFECTO MODULADOR DEL
HIDROXITIROSOLO EN LA TERAPIA ANTITUMORAL DEL
CÁNCER DE MAMA”

TESIS DOCTORAL

MARIO PULIDO MORÁN

2016

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Mario Pulido Morán
ISBN: 978-84-9125-918-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/43835>

The seal of the University of Granada is a circular emblem. It features a central shield supported by two lions, topped with a crown. The shield is surrounded by a decorative border. The Latin inscription around the border reads: "UNIVERSITATIS GRANATENSIS CAROLVS RO IMP AVG HISPAN REX FVNDATOR".

Esta memoria de Tesis Doctoral forma parte del proyecto PI-0695-2012, concedido por el Servicio Andaluz de Salud y financiado a través del programa de subvenciones para la financiación de la investigación, desarrollo e innovación biomédica y en ciencias de la salud en Andalucía, para el año 2012

D^a. María del Carmen Ramírez Tortosa. Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Universidad de Granada.

D. José Luis Quiles Morales. Catedrático del Departamento de Fisiología. Universidad de Granada.

D. César Luis Ramírez Tortosa. Jefe de Servicio de Anatomía Patológica. Complejo Hospitalario de Jaén.

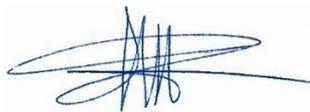
CERTIFICAN:

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral: **“mecanismos moleculares y efecto modulador del hidroxitirosol en la terapia antitumoral del cáncer de mama”**, han sido realizados bajo nuestra dirección por el licenciado en Farmacia Mario Pulido Morán y la encontramos conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada con el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada a.



Dr. D. César Luis Ramírez Tortosa



Dra. D^a. María del Carmen Ramírez Tortosa



Dr. D. José Luis Quiles Morales



MEMORIA QUE PRESENTA EL LDO. MARIO PULIDO MORÁN PARA
ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Dra. D.ª. María del Carmen Ramírez Tortosa

Dr. D. César Luis Ramírez Tortosa

Dr. D. José Luis Quiles Morales

Ldo. D. Mario Pulido Morán

Granada, 2016



El doctorando Mario Pulido Morán y los directores de la tesis D^a. María del Carmen Ramírez Tortosa, D. César Luis Ramírez Tortosa y D. José Luis Quiles Morales, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Dra. D^a. María del Carmen Ramírez Tortosa

Dr. D. César Luis Ramírez Tortosa

Dr. D. José Luis Quiles Morales

Ldo. D. Mario Pulido Morán

Granada, a de Marzo, 2016

ABREVIATURAS	17
RESUMEN	24
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO	35
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 QUÉ ES EL CÁNCER DE MAMA:	1
1.2 ¿CUÁNTOS TIPOS DE CÁNCER DE MAMA EXISTEN?	1
1.3 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA:	5
1.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO:	9
1.5 TRATAMIENTOS CONVENCIONALES	10
1.5.1 <i>Tratamiento quirúrgico:</i>	11
1.5.2 <i>Tratamiento por Radioterapia:</i>	11
1.5.3 <i>Quimioterapia:</i>	12
1.5.3.1 Antraciclinas:	13
1.5.3.2 Ciclofosfamida:.....	15
1.5.3.3 Taxanos:	16
1.5.4 <i>Hormonoterapia:</i>	18
1.6 ESTRÉS OXIDATIVO:	19
1.6.1 <i>Oxidación/reducción:</i>	19
1.6.2 <i>Radicales libres:</i>	19
1.6.3 <i>Especies Reactivas de Oxígeno (EROs):</i>	20
1.7 MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO:	22
1.7.1 <i>Daño a nivel lipídico e hidratos de carbono</i>	22
1.7.2 <i>Daño a nivel proteico</i>	24
1.7.3 <i>Daño a nivel génico:</i>	25
1.7.3.1 Efectos mitocondriales de estrés oxidativo:.....	25
1.7.3.2 Efectos del estrés oxidativo en el material genético nuclear:	26
1.8 ESTRÉS OXIDATIVO Y CÁNCER DE MAMA.....	28
1.8.1 <i>Iniciación</i>	29
1.8.2 <i>Promoción</i>	30
1.8.2.1 Receptores de factores de crecimiento y citoquinas	31
1.8.2.2 Proteínas quinasas citoplasmáticas.....	32
1.8.3 <i>Progresión</i>	32
1.9 HIDROXITIRO SOL:.....	35
1.9.1 <i>¿Qué es y de dónde proviene el HT?</i>	35
1.9.2 <i>Procesos ADME del HT</i>	37
1.9.2.1 Absorción del HT	37
1.9.2.2 Distribución del HT en el organismo	37
1.9.2.3 Metabolismo del HT	38
1.9.2.4 Eliminación del HT	39
1.9.2.5 Toxicidad del HT	39
1.9.3 <i>Principales actividades del HT</i>	40
1.9.3.1 Actividad antimicrobiana:	40
1.9.3.2 HT como erradicador de las EROs y su implicación cardiovascular	40
1.9.3.3 Propiedades antiinflamatorias del HT	41
1.9.3.4 Actividad antitumoral del HT.....	42
CAPÍTULO 2 MATERIAL Y MÉTODOS	47
2.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	47
2.1.1 <i>Intervenciones del estudio</i>	47
2.2 CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL:	48

2.2.1	<i>Tamaño muestral</i>	48
2.2.2	<i>Generación de la secuencia aleatoria/asignación oculta/ implementación/ enmascaramiento</i>	49
2.3	POBLACIÓN DE ESTUDIO	49
2.4	CARACTERÍSTICAS DE LOS TRATAMIENTOS	50
2.5	EVALUACIÓN DEL CUMPLIMIENTO Y SEGURIDAD	50
2.6	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LAS MUESTRAS:.....	50
2.7	ANÁLISIS DEL BALANCE OXIDATIVO, VARIABLES BIOQUÍMICAS E HISTOPATOLÓGICAS:.....	51
2.7.1	<i>Análisis del balance oxidativo:</i>	51
2.7.2	<i>Determinación del daño oxidativo asociado a proteínas:</i>	51
2.7.2.1	Concentración de proteínas totales	51
2.7.2.2	Proteínas carbonilo plasmáticas.....	52
2.7.2.3	Productos proteicos de oxidación avanzada (AOPP).....	53
2.7.3	<i>Determinación del daño oxidativo asociado a lípidos e hidratos de carbono:</i>	54
2.7.3.1	Determinación de Lípidos totales.....	54
2.7.3.2	F2-isoprostanos plasmáticos:.....	55
2.7.3.3	Determinación de NEFA	56
2.7.3.4	Productos de glicación avanzada (AGE)	57
2.7.4	<i>Determinación del daño oxidativo asociado ácidos nucleicos:</i>	58
2.7.4.1	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) plasmática	58
2.7.4.2	Ensayo Comet alcalino (Linfocitos Sangre Periférica).....	59
2.7.5	<i>Determinación del sistema de defensa antioxidante plasmático:</i>	60
2.7.5.1	Capacidad antioxidante total del plasma:	60
2.7.5.2	Vitaminas liposolubles.....	61
2.7.5.3	Determinación de actividad SOD.....	63
2.7.5.4	Determinación de actividad Catalasa (CAT)	64
2.7.6	<i>Determinación de Secreted Frizzled Related Protein 4 (SFRP-4)</i>	65
2.7.7	<i>Variables histopatológicas y bioquímicas</i>	66
2.7.7.1	Determinación inmunohistoquímica de la proliferación celular mediante ki67, determinación de receptores hormonales del tumor (Estrógenos [RE] y Progesterona [RP])y estado del HER-2.....	66
2.7.8	<i>Determinación plasmática de Hidroxitirosol:</i>	68
2.8	MATERIAL EMPLEADO:.....	69
2.8.1	<i>Elementos de uso general:</i>	69
2.8.2	<i>Software específico</i>	71
2.8.3	<i>Material para el estudio anatomopatológico</i>	71
CAPÍTULO 3 RESULTADOS		73
3.1	<i>DAÑO OXIDATIVO, VARIABLES BIOQUÍMICAS E HISTOPATOLÓGICAS DURANTE EL TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO (T1, T2 Y T3):</i>	83
3.1.1	<i>Daño oxidativo:</i>	83
3.1.1.1	Daño oxidativo asociado a lípidos e hidratos de carbono	83
3.1.1.2	Daño oxidativo asociado ácidos nucleicos	85
3.1.1.3	Antioxidantes plasmáticos.....	86
3.1.1.4	Secreted Frizzled Related Protein 4 (Sfrp-4).....	88
3.1.1.5	Variables bioquímicas e histopatológicas.....	89
3.2	<i>DAÑO OXIDATIVO Y VARIABLES BIOQUÍMICAS E HISTOPATOLÓGICAS DURANTE LA TERAPIA ANTITUMORAL NEOADYUVANTE (T1 Y T6):</i>	105
3.2.1	<i>Daño oxidativo:</i>	105
3.2.1.1	Daño oxidativo asociado a proteínas	105
3.2.1.2	Daño oxidativo asociado a lípidos e hidratos de carbono	106
3.2.1.3	Daño oxidativo asociado ácidos nucleicos	108
3.2.1.4	Antioxidantes plasmáticos.....	109

3.2.1.5	Concentración de Sfrp-4 en plasma.....	111
3.2.1.6	Variables histopatológicas y bioquímicas	111
CAPITULO 4 DISCUSIÓN.....		123
4.1	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO CLÍNICO Y EFECTO DEL HIDROXITIRO SOL.....	123
4.2	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN	126
4.3	EFECTO DE LA TERAPIA ANTITUMORAL SOBRE LAS PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA	128
4.3.1	<i>La terapia neoadyuvante modifica parámetros de oxidación de lípidos e hidratos de carbono.....</i>	<i>128</i>
4.3.2	<i>La terapia neoadyuvante modifica parámetros de oxidación proteica</i>	<i>132</i>
4.3.3	<i>El daño en el ADN de pacientes con cáncer de mama aumenta como consecuencia de la terapia neoadyuvante.....</i>	<i>133</i>
4.3.4	<i>La terapia neoadyuvante modula la defensa antioxidante plasmática</i>	<i>134</i>
4.3.5	<i>La quimioterapia neoadyuvante sobreexpresa los niveles plasmáticos de Sfrp4</i>	<i>139</i>
4.3.6	<i>El tratamiento antitumoral modifica los parámetros bioquímicos de las pacientes con una terapia antitumoral neoadyuvante</i>	<i>142</i>
CONCLUSIONES.....		158
ANEXOS		162
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		169

ABREVIATURAS

A:

ABTS: 2,2'-azino-di-(sulfonato de 3-etilbenzotiazolina)

ADME: Procesos de Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AECC: Asociación Española Contra el Cáncer

AGE: Productos finales de glicosilación avanzada

AKT: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog (Proteína Quinasa B)

AO: Aceite oliva

AOPP: Productos finales de oxidación proteica

AP-1: Proteína activadora 1

APC: Adenomatous polyposis coli

ARE: Antioxidant responsive element

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosin trifosfato

B:

BAG: Biopsia con aguja gruesa

Bcl-2: B-cell CLL/lymphoma 2

bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico

BHE: Barrera hematoencefálica

BQ: Biopsia quirúrgica

BRCA: Gen supresor de tumores (Breast Cancer)

BSA: Bovine serum albumin

C:

c-AMP: Adenosin monofosfato cíclico

CAT: Catalasa

CDIS: Carcinoma ductal in situ

c-GMP: Guanosin monofosfato cíclico

CI: Consentimiento informado

CK: Citoqueratina

CLIS: Carcinoma lobulillar in situ

CoA: Coenzima A

COMT: Catecol-orto-metil transferasa

COX: Ciclooxygenasa

Cu: Cobre

D:

DAB: 3,3'-diaminobencidina tetrahidrocloruro

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMBA: 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

DO: Densidad óptica

DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxifenilacético

E:

EC: Ensayo clínico

EFSA: Agencia europea de seguridad alimentaria

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

ERK: Extracellular regulated MAP kinase

EROs: Especies reactivas de oxígeno

F:

FAS: Ácido graso sintasa

FoxO: Proteína forkhead box O

G:

GATA: Proteínas de unión a secuencia de Guanina, Adenina y Timina

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos

GGT: Gamma-glutamil transferasa

GOT: Transaminasa glutámico oxalacética

GPT: Transaminasa glutámico pirúvica

GPx: Glutación reductasa

GR: Glutation reductasa

GSH: Glutación reducido

H:

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

Her2: Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano

HIF: Factor inducible por hipoxia

HO*·: Radical Hidroxilo

HPLC: High performance liquid chromatography

HRP: Horseradish peroxidase

HT: Hidroxitirosol

I:

i.m.: Intramuscular

i.v.: Intravenoso

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1

IL: Interleucina

IMC: Índice de masa corporal

Inos: Óxido nítrico sintasa inducible

Ire1: Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease inositol-requiring enzyme 1

IRF-1: Factor 1 regulador de interferón

J:

JNK: c-Jun N-terminal protein kinases

L:

LDH: Lactato deshidrogenasa

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LOX: Lipooxigenasa

LT: Leucotrieno

M:

MAPK: Mitogen activated protein

MDA: Malondialdehido

MLG: Modelo lineal general de medidas repetidas

MMPs: Metaloproteinasas de la matriz

N:

NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato forma oxidada

NADPH: Nicotinamida adenina ainucleótido fosfato forma reducida

NCI: Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos

NEFA: Ácidos grasos no esterificados

NF- κ B: Factor nuclear κ B

nm: Nanómetros

NOX: NADPH oxidasa

Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

O:

O₂: Oxígeno molecular

O₂^{*-}: Anión Superóxido

OMS: Organización Mundial de la Salud

OTM: Olive tail moment

P:

PBS: Tampón fosfato salino

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PGE2: Prostaglandina E2

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa

Pin1: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase

PKC: Proteína quinasa C

PL: Peroxidación lipídica

PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor

Q:

QT: Quimioterapia

R:

RAGE: Receptores de unión a AGE

RAS: Ras oncogene

RE: Receptores de estrógeno

RLs: Radicales libres

RP: Receptores de progesterona

S:

SDS: Dodecilsulfato sódico

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica

SERDs: Receptores selectivos de estrógeno

Sfrp4: Secreted Frizzled-Related Protein 4

SH: Grupo sulfhidrilo

SIRT: Sirtuínas

SOD: Superóxido dismutasa

SPE: Extracción en fase sólida

SQSTM1: Sequestosome 1

STAT: Signal transducer and activator of transcription

T:

T1: Punto temporal basal del ensayo

T2: Final tratamiento epirrubicina y ciclofosfamida en el ensayo

T3: Final tratamiento con taxanos en el ensayo

T6: Final de la terapia antitumoral del ensayo

TBARS: Sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico

TEP: Tomografía por emisión de positrones

TGF: Factor de crecimiento transformante angiogénico

TNF: Factor de necrosis tumoral

TROLOX: Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico

TxA2: Tromboxano A2

TxB2: Tromboxano B2

Ty: Tiroso

U:

U: Unidades de actividad

UCP2: Proteína desacoplante-2

UGC: Unidad de gestión clínica

UI: Unidades internacionales

UPLC-MS/MS: Ultra-performance liquid-chromatography tandem mass spectrometry

UV: Ultravioleta

V:

VCAM1: Vascular cell adhesion molecule 1

VEGF: Factor de crecimiento endotelio-vascular

W:

Wnt: Wntless pathway

X:

XO: Xantina Oxidasa

4-HNE: 4-Hidroxinonenal

8OH: 8-Hidroxi-2-deoxiguanosina

RESUMEN

Introducción

El cáncer de mama puede definirse como una proliferación acelerada e incontrolada de células del epitelio glandular, aumentando su capacidad reproductiva. Su clasificación puede variar en función del origen del mismo, de la localización, de la invasividad que presente, grado de diferenciación, estadificación o en función de las distintas proteínas que expresen en la superficie de sus células y su respuesta hormonal.

Hoy en día, el cáncer de mama presenta una incidencia y mortalidad crecientes, de tal forma que se ha convertido en las causas de muerte más frecuente en mujeres. De la misma forma, a nivel mundial es una de las 10 causas más frecuentes de muerte en mujeres mayores de 60 años. En España, la Red Española de Registros del Cáncer estimó para 2014 un total de 26354 casos nuevos de cáncer de mama, produciéndose un incremento sustancial respecto a años anteriores. En España, la mortalidad en este tipo de tumores no tan elevada respecto a la gran incidencia que presenta, principalmente debido a los programas de screening y protocolos de prevención llevados a cabo en los últimos años. Comparados con otros países europeos, España se sitúa a la cola en incidencia y mortalidad. Este hecho tan llamativo ha sido objeto de múltiples estudios, que finalmente han comprobado un efecto de distintos elementos de la dieta sobre esta y otras patologías, como por ejemplo el Hidroxitirosol: Un polifenol presente en el aceite de oliva virgen extra.

Existe un modelo carcinogénico establecido en tres fases: Iniciación, promoción y progresión. Estas tres fases se han relacionado con un desequilibrio redox que promueve la actuación de las denominadas especies reactivas de oxígeno y radicales libres sobre las células, incidiendo sobre procesos de apoptosis, proliferación y control de los mismos, así como los distintos sistemas de reparación y compensación de este desequilibrio.

Una de las características principales de los quimioterápicos más empleados en el tratamiento del cáncer de mama, es que cursan, en la mayoría de los casos, bien produciendo por sí mismos distintas especies reactivas de oxígeno como mecanismo de acción, o bien desencadenando de forma indirecta un desequilibrio del estado redox que derive finalmente en una incapacidad de compensación de moléculas prooxidantes por parte del organismo, derivando finalmente hacia un estrés oxidativo que desencadena múltiples efectos adversos sobre las pacientes y sobre su recuperación.

El Hidroxitirosol se caracteriza por ser un polifenol presente, entre otros lugares, en el aceite de oliva virgen extra, un alimento altamente consumido en la cuenca mediterránea y entre estos países, España. Este compuesto ha demostrado ampliamente en la literatura un carácter antioxidante, que le ha servido para obtener el reconocimiento de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria como compuesto cardioprotector a dosis entre 2 y 15 mg diarios, debido a su capacidad de impedir la oxidación de lipoproteínas LDL. Además, múltiples estudios han establecido una potente actividad antitumoral, principalmente sobre células tumorales sensibles a hormonas, aunque también sobre animales de experimentación con receptores hormonales positivos, donde demostró una

capacidad antitumoral equiparable a otros fármacos del grupo de antraciclinas, ampliamente utilizados en el tratamiento convencional del cáncer de mama.

Objetivos

El **objetivo principal** de este estudio fue conocer si el Hidroxitirosol ejercía algún efecto quimiomodulador de la terapia antitumoral basada en epirrubicina y ciclofosfamida, seguida de taxanos, y si el Hidroxitirosol presentaba la capacidad de mejorar la respuesta antitumoral general de las pacientes, disminuyendo el estrés oxidativo asociado a la propia patología y al tratamiento antineoplásico.

Como consecuencia del complejo diseño del ensayo clínico llevado a cabo, este objetivo principal se complementó a través de una serie objetivos secundarios:

- Establecer un posible mecanismo de acción llevado a cabo por el Hidroxitirosol a nivel sistémico. Para ello, se determinaron distintas variables de estrés oxidativo plasmático que valorasen las alteraciones de oxidación de macromoléculas como proteínas, lípidos, hidratos de carbono o ácidos nucleicos.
- Conocer si el Hidroxitirosol alteraba parámetros histopatológicos y bioquímicos que evaluaran la respuesta antitumoral de las pacientes y la funcionabilidad renal, hepática y cardíaca, respectivamente.
- Establecer si el Hidroxitirosol modulaba la expresión de proteínas relacionadas con rutas de proliferación y apoptosis celular, como la proteína Secreted Frizzled-Related Protein 4.
- Describir nuevas alteraciones que no han sido previamente expuestas en la literatura científica, como modificaciones bioquímicas, clínicas, moleculares y patológicas asociadas al tratamiento combinado de epirrubicina y ciclofosfamida, seguido de taxanos, utilizado en el ensayo clínico como quimioterapia neoadyuvante.

Material y Métodos

Se llevó a cabo un ensayo clínico aleatorizado con grupos paralelos (tratado con Hidroxitirosol y placebo) a triple ciego. El criterio de inclusión del ensayo fue el diagnóstico de cáncer de mama (cualquier subtipo) con expresión de receptores hormonales (receptores de estrógenos y/o receptores de progesterona), sin amplificación del gen HER-2 (fenotipos Luminal A y B) que recibían tratamiento quimioterápico antes de la cirugía según las recomendaciones definidas en la guía de Práctica Clínica elaborada por el Subcomité Multidisciplinario de Mama del Complejo Hospitalario de Jaén. Con estas mujeres se establecieron dos grupos: el intervenido al que se le administró una suplementación dietética con HT a una dosis única de 15 mg/día en forma de cápsulas duras y el grupo control con suplementación dietética de placebo administrado en una única dosis diaria en forma de cápsulas duras, tras la firma del consentimiento informado.

Cada grupo (Hidroxitirosol o placebo) participante en estudio (T1-basal) se sometió a una quimioterapia neoadyuvante consistente en epirrubicina y ciclofosfamida (T2-final

tratamiento), seguida de taxanos (T3-final de terapia), constituyendo los tres puntos temporales de nuestro estudio. Finalmente, el último punto temporal del estudio fue transcurrido un mes desde la intervención quirúrgica de la terapia neoadyuvante (T6), tras la valoración del estado de salud de las pacientes participantes el día de la cirugía (T4) y a la semana de la intervención quirúrgica (T5). Estos dos puntos temporales (T4 y T5) no se contemplaron para esta tesis doctoral.

En cada punto, se tomaron muestras de sangre, de las que se obtuvo suero, plasma y linfocitos aislados. Con estas muestras, se determinaron distintas variables de daño oxidativo a proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, así como el balance del sistema antioxidante y variables bioquímicas e histopatológicas (del tumor pre y post cirugía).

Los datos recogidos sobre las variables dependientes e independientes en este estudio se registraron en una base de datos anonimizada, construida para tal fin y procesadas estadísticamente mediante el programa estadístico SPSS v21.

En primer lugar se realizó un análisis estadístico descriptivo de cada una de las variables de la base de datos. Para ello en el caso de las variables cualitativas se obtuvo una tabla de frecuencias (número de casos y porcentaje) y como representación gráfica el gráfico de sectores. Para el caso de las variables cuantitativas se obtuvo para cada una de ellas: media, mediana, desviación típica, mínimo y máximo y como representación gráfica el histograma. Para determinar si existían diferencias en los marcadores a lo largo del tiempo y entre los dos grupos de tratamiento se calculó el Modelo lineal General de Medidas Repetidas teniendo en cuenta el factor intra-sujetos el tiempo y como factor inter-sujetos el Grupo de tratamiento. Para aplicar los test se ha asumido la normalidad de los datos, a pesar del escaso tamaño de muestra. En cada test se estudió la esfericidad de la matriz de varianzas-covarianzas y se tuvo en cuenta los resultados de los test correspondientes, según esta comprobación. Para todos los análisis se consideró significativo un valor $\alpha=0.05$.

Resultados y discusión

La gran mayoría de los resultados, sólo obtuvieron diferencias significativas a lo largo del tiempo y pocas diferencias por grupo o en la interacción tiempo x grupo (tratado o no con Hidroxitirosol), lo que hizo postular un nuevo enfoque del estudio, contemplándose un único grupo, independientemente de que estuviesen tratados o no con Hidroxitirosol. Este nuevo enfoque trataba de establecer cómo distintas variables asociadas al estrés oxidativo en pacientes con cáncer de mama se modificaban a lo largo del tiempo tras el tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida, seguido de taxanos, en una terapia neoadyuvante.

En la valoración del daño oxidativo a lípidos e hidratos de carbono, se obtuvieron diferencias exclusivamente asociadas al tratamiento quimioterápico en la concentración de isoprostanos y lípidos totales plasmáticos. Igualmente, se detectaron diferencias significativas entre el estado inicial y final de las pacientes (asociadas a la terapia

antitumoral completa) en los valores de ácidos grasos no esterificados y Productos Finales de Glicosilación Avanzada.

Dentro de las variables determinadas para cuantificar el daño oxidativo a proteínas, se encontraron diferencias significativas en los niveles de los productos finales de oxidación proteica como consecuencia de la terapia antitumoral completa, sin diferencias significativas asociadas a los quimioterápicos de forma aislada.

En referencia al daño oxidativo asociado a ácidos nucleicos, a pesar de que no se hallaron diferencias en el daño oxidativo en el ADN de linfocitos aislados, sí se detectó un incremento en los valores plasmáticos de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina como consecuencia de la terapia antitumoral neoadyuvante en su conjunto, sin detectarse diferencias asociadas a un fármaco o grupo de fármacos concreto.

La evaluación del sistema de defensa antioxidante durante el tratamiento quimioterápico concluyó con resultados significativos en la capacidad antioxidante total del plasma y en la concentración de vitamina E, presentando comportamientos opuestos a lo largo del tratamiento con los distintos fármacos. Así mismo, tras la valoración de la terapia antitumoral completa (desde el inicio hasta un mes tras la intervención quirúrgica), se observaron diferencias significativas en cuanto a la actividad de superóxido dismutasa y catalasa, con un descenso en la actividad de ambas enzimas.

Los valores de concentración plasmática de la proteína Secreted Frizzled-Related-Protein 4 se vieron estadísticamente modificados sólo tras el tratamiento quimioterápico con epirrubicina y ciclofosfamida, que inducía su expresión. Los taxanos disminuyeron la concentración de esta proteína sin lograr que alcanzara los niveles basales, manteniéndola en una concentración plasmática elevada. Se interpretó como un factor positivo el hecho de que los quimioterápicos fuesen capaces de elevar una proteína capaz de actuar inhibiendo los receptores Frizzled y la ruta Wnt, relacionados con la carcinogénesis en varios tipos de tumores.

En referencia a las variables bioquímicas determinadas, pese a haberse obtenido diferencias estadísticamente significativas, no todas las variables proporcionan información clínicamente relevante respecto a las alteraciones que sufren las pacientes a lo largo del tratamiento, pues en la mayoría de los casos, aunque las variables se vieron modificadas, no se situaron fuera de los valores de referencia. Las principales alteraciones clínicamente importantes se hallaron a nivel de proteínas marcadoras de daño hepático como Lactato deshidrogenasa o Transaminasa glutámico pirúvica y a nivel de alteraciones del perfil lipídico como en lipoproteínas de alta y baja densidad, o colesterol total.

Conclusiones

1. A través de este estudio, se comprueba por primera vez en humanos que, en el tratamiento neoadyuvante frente al cáncer de mama, el Hidroxitirosol no ejerce efectos clínicamente relevantes durante la quimioterapia basada en epirrubicina y ciclofosfamida, seguida de taxanos, ni a lo largo del tratamiento antitumoral completo. La terapia antitumoral en sí misma no produce daño oxidativo a ácidos nucleicos, por lo que el Hidroxitirosol no ejerce ningún efecto beneficioso sobre el

daño oxidativo en ADN de linfocitos aislados. Así mismo, el Hidroxitirosol no interfiere en el metabolismo de las purinas ni del colesterol y no modifica significativamente los electrolitos plasmáticos ni las enzimas asociadas al daño hepático y muscular. De la misma forma, aunque el Hidroxitirosol produce un aumento global de la defensa antioxidante asociada a Superóxido dismutasa, éste carece de interés clínico al no poder asociarse a un punto temporal concreto.

2. Una terapia combinada con epirrubicina puede inducir un mecanismo de respuesta del sistema antioxidante plasmático, como sucede con la capacidad antioxidante total del plasma tras la administración de epirrubicina y ciclofosfamida, de forma tiempo dependiente, y con el objetivo de contrarrestar el efecto prooxidante que generan este grupo de fármacos a nivel sistémico. Este mecanismo de compensación antioxidante, asociado a dicha combinación, es el causante indirecto de una disminución de los niveles de isoprostanos plasmáticos durante la quimioterapia neoadyuvante.
3. Los niveles de ácidos grasos no esterificados y los productos finales de glicosilación avanzada mantienen una relación con el cáncer de mama, descrita por primera vez gracias a la puesta en marcha de este estudio. Dicha asociación, se debe, bien a la propia producción tumoral o bien como consecuencia de un desequilibrio previo que derive finalmente en el desarrollo de la patología, pues a la llegada de las pacientes al estudio, los niveles de ambas variables fueron estadísticamente superiores a los alcanzados una vez libre de la enfermedad, relacionándose así directamente con la erradicación del tumor en su conjunto y no con la quimioterapia o la intervención quirúrgica de forma aislada. Contrariamente, los productos finales de oxidación proteica y 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, mantienen una relación inversa con el cáncer de mama y con el progreso de la terapia antitumoral neoadyuvante, aumentando a medida que se erradica el tumor.
4. La terapia antitumoral neoadyuvante altera el sistema de defensa antioxidante a distintos niveles. Algunas de estas modificaciones se deben al efecto prooxidante de los quimioterápicos, como el descenso de vitamina E producido por su papel neutralizador de radicales libres, o el incremento de la capacidad antioxidante total del plasma como mecanismo de compensación a un desequilibrio redox. Otras modificaciones, sin embargo, no se ven afectadas por el efecto quimioterapia, sino al efecto de la terapia antitumoral en su conjunto, como el descenso de actividad propiciado en Superóxido dismutasa y Catalasa como consecuencia indirecta del restablecimiento del equilibrio redox al eliminar el tumor.
5. Este estudio describe por primera vez en pacientes con cáncer de mama que la quimioterapia neoadyuvante empleada promueve un aumento en los niveles plasmáticos de la proteína Secreted Frizzled-Related Protein 4, asociada con un descenso en la proliferación de células tumorales y un incremento en su apoptosis. La combinación de epirrubicina y ciclofosfamida, seguida de taxanos, se presenta

como una terapia óptima que mejora significativamente la respuesta antitumoral a través del incremento en esta proteína, sentando las bases sobre futuras combinaciones con esta proteína o con fármacos que promuevan su síntesis y potencien sus efectos antitumorales.

6. La terapia antitumoral neoadyuvante no produce alteraciones plasmáticas clínicamente relevantes en los parámetros bioquímicos generales ni en los relacionados con la funcionalidad renal y hepática. Sin embargo, en lo referente al perfil lipídico, la terapia antitumoral altera el metabolismo del colesterol, siendo importante su valoración y normalización con el objetivo de disminuir alteraciones metabólicas severas y recidivas. En lo referente al daño cardiaco, la terapia antitumoral propicia un daño leve o moderado, asociado tanto a la quimioterapia como al tratamiento completo, de carácter reversible, demostrando las notables ventajas de la terapia combinada escogida en este estudio en cuanto a términos de seguridad y eficacia.

SUMMARY

Introduction

Breast cancer can be defined as an accelerated and uncontrolled proliferation of glandular epithelium cells, increasing their reproductive capacity. The classification of breast cancer varies depending on the origin of the tumour, location, invasiveness, degree of differentiation, staging or based on different proteins expressed on the surface of its cells and its hormonal response.

Nowadays, breast cancer has an increasing incidence and mortality, so that it has become one of most common causes of death in women. Likewise, breast cancer is one of the 10 most prevalent causes of death in women over 60 years around the world. In Spain, the Spanish Network of Cancer Registries estimated for 2014 a total of 26,354 new cases of breast cancer, resulting in a substantial increase over previous years. In Spain, the mortality associated to breast cancer is not so high if it is compared to its raised incidence, mainly due to screening programs and prevention protocols carried out in recent years. Compared with other European countries, Spain is at the bottom of incidence and mortality. This striking fact has been the main issue of many studies, which have finally found some beneficial effects on cancer and many other pathologies associated to different dietary elements such as hydroxytyrosol: A polyphenol present in extra virgin olive oil.

There is a well-established carcinogenic model that elapses in three stages: initiation, promotion and progression. These three phases have been linked to a redox imbalance which promotes the action of so-called reactive oxygen species and free radicals over the cells. These molecules impinge on processes of apoptosis, proliferation and control thereof, as well as different defence systems of repairing and compensation of this imbalance.

One of the main features of chemotherapeutic drugs mainly used in the treatment of breast cancer, is that act, in many cases, producing different reactive oxygen species as mechanism of action or triggering indirectly to an imbalance of redox status, which finally turns in the inability to compensate the action of pro-oxidant molecules. This pathways finally lead to oxidative stress that triggers multiple adverse effects on patients and their recovery.

Hydroxytyrosol is a polyphenol present, among others, in the extra virgin olive oil, a foodstuff highly consumed in the Mediterranean basin. This compound has widely demonstrated its antioxidant character, a fact that has helped to get the recognition from the European Food Safety Agency as cardioprotective compound at doses between 2 and 15 mg per day, due to its ability of preventing the oxidation of LDL. In addition, multiple studies have demonstrated a potent antitumor activity of this compound, mainly performed on tumour cells sensitive to hormones, but also on animals with positive hormone receptors. In this sense, Hydroxytyrosol has showed a comparable antitumor capacity to other drugs pertaining to the anthracyclines group, widely used in conventional treatment breast cancer.

Objectives

The main objective of this study was elucidate whether Hydroxytyrosol exerted any chemo modulator effects over the antitumor therapy based on epirubicin plus cyclophosphamide, followed by taxanes. In addition, this study tried to determine if the Hydroxytyrosol had any ability to improve the global antitumor response of the patients by decreasing the oxidative stress associated to the breast cancer itself and also to the antineoplastic treatment. Due to the great difficulty of the clinical trial performed, the main objective was complimented through different secondary aims:

- To establish a mechanism of action performed by the Hydroxytyrosol at systemic level. To complete this objective, several oxidative stress variables were measured in plasma to evaluate the oxidation of different macromolecules such as proteins, lipids, carbohydrates or nucleic acids.
- To know if the hydroxytyrosol alter histopathologic parameters that evaluated the antitumor response of patients as well as biochemical variables related to renal, liver and heart functionalities.
- To establish whether the Hydroxytyrosol could modulate the expression of proteins related to cell proliferation and apoptosis pathways, such as the Secreted Frizzled-Related Protein 4.
- To describe new alterations that have not been previously exposed in the scientific literature, such as pathological, biochemical, clinical and molecular changes, associated with the combined treatment of epirubicin and cyclophosphamide followed by taxanes, used in this clinical trial as neoadjuvant chemotherapy.

Material and methods

A randomized clinical trial was conducted with parallel groups (treated with placebo and hydroxytyrosol) at triple blind. Inclusion criteria of the study was the diagnosis of breast cancer (any subtype) with expression of hormone (oestrogen and/or progesterone) receptors, with no HER-2 gene amplification (phenotypes luminal A and B) receiving chemotherapy before surgery as recommended the Clinical Practice Guidelines developed by the Multidisciplinary Subcommittee of Mama from the Hospital Complex of Jaen. Two groups were established: One with the supplementation of a dietary hard capsules of HT, a single dose of 15 mg per day. The other group (control group) received a dietary supplementation of placebo, also administered in a single daily dose. These two groups were constituted after signing the informed consent.

Each group (Hydroxytyrosol or placebo) participating in the study (T1-basal) underwent neoadjuvant chemotherapy based on epirubicin and cyclophosphamide (T2-end of treatment), followed by taxanes (T3-end of the therapy), constituting the three time points of our study. Finally, a last time point of the study was one month after surgery (T6). Previously to the last time point, the state of health of patients was assessed on the day of surgery (T4) and weekly surgery (T5), but these two time points (T4 and T5) were not contemplated for this thesis.

On each time point, blood samples were collected, from which serum, plasma and isolated lymphocytes were obtained. With these samples, different parameters of oxidative damage to proteins, lipids, carbohydrates and nucleic acids, as well as the balance of the antioxidant system and biochemical and histopathological variables (pre- and post-surgery) were determined.

Data collected on the dependent and independent variables were recorded in anonymized data base, built for this purpose and processed statistically using SPSS v21.

First, a descriptive statistical analysis of each variable was performed. To do this, in the case of qualitative variables, a frequency table (number of cases and percentage) and a pie chart as a graph were obtained. In the case of quantitative variables it was obtained: mean, median, standard deviation, minimum and maximum as well as a histogram graph. To determine whether there were differences in the markers over time and between the two treatment groups, the Repeated Measures General Linear Model was calculated, taking into account as intra-subject factor the time and as inter-subjects factor the group treatment. To apply the test the normality of the data was assumed, despite the small sample size. In each test, the sphericity of the variance-covariance matrix was studied and the results of the corresponding test was taken into account, according to this test. For all analyses it was considered significant a value of $\alpha = 0.05$.

Results and discussion

The vast majority of results presented significant differences over time, with few differences by group or by interaction time/group (treated or not with Hydroxytyrosol). This fact made postulating a new scope of the study, contemplating all as a single group, regardless that they were treated or not with Hydroxytyrosol. This new approach tried to establish how different variables associated with oxidative stress in patients with breast cancer were modified over time after treatment with epirubicin and cyclophosphamide followed by taxanes, in a neoadjuvant therapy.

In the assessment of oxidative damage to lipids and carbohydrates, statistical differences associated to chemotherapy exclusively in plasma isoprostanes and total lipids were obtained. Similarly, significant differences between the initial and final state of the patients (associated to full antitumor therapy) were detected in the values of non-esterified fatty acids and advanced glycosylation end products.

Among the variables measured to quantify oxidative damage to proteins, significant differences were found in the levels of advanced oxidation protein products as a result of the complete antitumor therapy, with no significant differences associated to chemotherapeutic.

Referring to oxidative damage associated with nucleic acids, although no differences in oxidative DNA damage in isolated lymphocytes were found, an increase in the plasma levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine was detected as result of whole antitumor neoadjuvant therapy. No differences associated to a concrete drug or group of drugs were found.

The evaluation of the antioxidant defence system during chemotherapy concluded with significant results in the total antioxidant capacity of plasma and serum vitamin E. Both variables presented opposite behaviours along the treatment with different drugs. Likewise, after the evaluation of the complete antitumor therapy (from start up to a month after surgery), significant differences were observed in terms of the activity of superoxide dismutase and catalase, with a decrease in both enzyme's activities.

The plasma concentration of Secreted Frizzled-Related Protein 4 showed a statistical difference after treatment with epirubicin and cyclophosphamide, which induced its expression. Taxanes decreased the concentration of this protein without approaching baseline levels, keeping it in a high plasma concentration. This was interpreted as a positive behaviour due to that chemotherapeutic were able to raise a protein capable of inhibiting the Frizzled receptors and the Wnt pathway, related to carcinogenesis in several tumour types.

Referring to certain biochemical variables, despite obtaining statistically significant differences, not all of them provide relevant clinical information about changes experienced by patients during treatment. In most cases, although the variables were modified, they were not placed outside the reference values for healthy individuals. The major clinically important changes were found at the level of liver damage marker proteins such as lactate dehydrogenase or glutamic pyruvic transaminase levels and disorders of lipid profile as high and low density lipoproteins or total cholesterol.

Conclusions

1. Through this study, it is found for the first time in humans that, in neoadjuvant therapy against breast cancer, Hydroxytyrosol not exert clinically relevant effects during chemotherapy based on epirubicin and cyclophosphamide, followed by taxanes, or along the complete antitumor treatment. Antineoplastic therapy itself produces no alterations of oxidative damage to nucleic acids, so that hydroxytyrosol exerts no beneficial effect on oxidative damage in DNA of isolated lymphocytes. Likewise, the Hydroxytyrosol not interfere with purine metabolism or cholesterol and does not significantly change plasma electrolytes and liver enzymes and associated muscle damage. In the same way, although the Hydroxytyrosol produces an overall increase in the antioxidant defence associated with Superoxide dismutase, this increase has no clinical interest because it cannot be associated with a particular time point.
2. Combination therapy with epirubicin may induce a compensation mechanism of the plasma antioxidant system, as happen with the total antioxidant capacity of plasma after administration of epirubicin and cyclophosphamide, in a time-dependent form, in order to counteract the prooxidant effect generated by this group of drugs. This antioxidant compensation mechanism, associated with the combination described, is the indirect causative of reduced plasma isoprostanes levels during neoadjuvant chemotherapy.

3. The levels of free fatty acids and advanced glycation end products have a direct relationship with breast cancer, firstly described by the implementation of this study. This association can be due to a tumour production or to a previous imbalance which finally leads to the development of the disease, because when patients started the study, levels of both variables were statistically higher than those achieved once free of disease. It is thus directly related to the eradication of the tumour after the whole antitumor therapy and not with chemotherapy or surgery. Conversely, the advanced oxidation protein products and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, have an inverse relationship with breast cancer and with the progress of neoadjuvant antitumor therapy, increasing when the tumour is eradicated.
4. Neoadjuvant antitumor therapy disrupts/impairs the antioxidant defence system at different levels. Some of these changes are due to the prooxidant effect of chemotherapeutic agents, as happen with vitamin E which decreases its levels as result of its role as scavenger of free radicals, or as happen with the increase in total antioxidant capacity of plasma as a compensation mechanism to a redox imbalance. However, other modifications are not affected by the chemotherapy, but they are caused by the whole antitumor therapy, as the decline in Superoxide dismutase and catalase activities as an indirect consequence of the restore of redox balance when the tumour is removed.
5. This study describes for the first time, in patients with breast cancer, that the neoadjuvant chemotherapy combination employed causes an increase in plasma levels of Secreted Frizzled-Related Protein 4, associated with a decrease in tumour cell proliferation and increased apoptosis. The combination of epirubicin and cyclophosphamide followed by taxanes, is presented as an optimal therapy that significantly enhances the antitumor response of patients through the increase in this protein, opening new research possibilities for future combinations with this protein or drugs that promote its synthesis and enhance their antitumor effects.
6. Neoadjuvant antitumor therapy does not produce clinically relevant plasma biochemical alterations in the general parameters and those related to kidney and liver function. However, regarding lipid profile, antitumor therapy alters cholesterol metabolism, being therefore very important its valuation and standardization, with the aim of reducing severe metabolic disturbances and recurrences. With respect to heart damage, antitumor therapy favours a mild or moderate reversible damage, associated with both chemotherapy and full treatment, showing the remarkable benefits of combined therapy chosen in this study as to terms of safety and effectiveness.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

El cáncer de mama es una patología cuya incidencia y mortalidad ha ido incrementándose a lo largo de los años. Es una de las causas de muerte más importante en mujeres, suponiendo más de medio millón de muertes al año a nivel mundial. Este dato implica por sí mismo una imperiosa necesidad de establecer cualquier mecanismo de prevención o tratamiento para frenar tanto el incremento en su incidencia como en su mortalidad, así como mejorar la calidad de vida de todas las pacientes, incluso aquellas que, aun superando el cáncer de mama, quedan sometidas a tratamientos de periodos muy largos y a secuelas de distinta índole, tanto físicas como psicológicas. En Europa, el incremento en su mortalidad ha ido en paralelo a su incidencia, a excepción de algunos países de la Cuenca Mediterránea, donde se ha podido comprobar que a pesar de producirse un aumento en el número de casos diagnosticados anualmente, se ha disminuido a su vez la mortalidad asociada a esta patología. Este descenso localizado en determinados tipos de países se ha asociado con la dieta mediterránea.

Uno de los componentes principales de esa dieta es el aceite de oliva virgen extra, cuyo consumo elevado ha sido asociado a un menor riesgo de enfermedades cardiovasculares, de carácter crónico o cáncer. Dentro de los componentes del aceite de oliva, responsables de estos efectos, se encuentra el polifenol Hidroxitirosol. Esta molécula ha demostrado ampliamente sus propiedades antioxidantes, y gracias a éstas, se ha postulado como un compuesto cardioprotector, siendo recomendado su consumo a dosis de 5 a 15 mg por día, por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Además de estas propiedades, el Hidroxitirosol ha demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo* un potente efecto antitumoral de igual potencia que otros fármacos empleados en la terapia antitumoral, como la Adriamicina, con la peculiaridad de no mostrar sus efectos adversos y presentar una toxicidad nula.

El único estudio llevado a cabo en animales de experimentación ha sido realizado por nuestro grupo de investigación. En este estudio, se pretendía conocer qué efecto tendría el Hidroxitirosol sobre ratas con cáncer de mama inducido por DMBA, bien como tratamiento sólo o bien como terapia combinada con otros fármacos para evaluar si dicha combinación restaba efecto, lo potenciaba o no influenciaba. Además, se trató de establecer si la terapia combinada de Hidroxitirosol con distintos fármacos antitumorales eliminaba aquellos efectos secundarios asociados a los quimioterápicos, como el incremento del estrés oxidativo, consecuencia de sus propios mecanismos de acción. Así mismo, se evaluó si el Hidroxitirosol restaba capacidad de efecto antitumoral a los quimioterápicos ensayados en dicho estudio, o si por el contrario, los potenciaba. Los resultados de ese estudio marcaron un punto de inflexión sobre esta molécula, pues se demostró que el Hidroxitirosol por sí mismo era capaz de ejercer un potente efecto antitumoral y promover a su vez la expresión de determinados genes implicados en la proliferación celular y apoptosis. Como consecuencia de este estudio, se puso en marcha un ensayo clínico para evaluar qué sucedía en pacientes con cáncer de mama sometidas a una terapia antitumoral neoadyuvante cuando se les administraba Hidroxitirosol a una

dosis establecida de 15 mg diarios. A través de este trabajo en humanos, se pretendía por tanto conocer, a nivel de ensayo clínico, si el Hidroxitirosol tenía la capacidad de potenciar la capacidad antitumoral de aquellos quimioterápicos empleados en el estudio, sin restarles efecto antineoplásico, y eliminar los efectos secundarios producidos por los mismos a través del restablecimiento del equilibrio oxidativo.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones previas, el **objetivo principal** de este trabajo ha sido conocer si el Hidroxitirosol ejercía algún efecto quimiomodulador de la terapia antitumoral basada en epirrubicina y ciclofosfamida, seguida de taxanos, y si el Hidroxitirosol presenta la capacidad de mejorar la respuesta antitumoral general de las pacientes, disminuyendo el estrés oxidativo asociado a la propia patología y al tratamiento antineoplásico.

Como consecuencia del complejo diseño del ensayo clínico llevado a cabo, este objetivo principal se ha complementado a través de una serie objetivos secundarios:

- Establecer un posible mecanismo de acción llevado a cabo por el Hidroxitirosol a nivel sistémico. Para ello, se han determinado distintas variables de estrés oxidativo plasmático que valoran las alteraciones de oxidación de macromoléculas como proteínas, lípidos, hidratos de carbono o ácidos nucleicos.
- Conocer si el Hidroxitirosol altera parámetros histopatológicos y bioquímicos que evalúan la respuesta antitumoral de las pacientes y la funcionabilidad renal, hepática y cardíaca, respectivamente.
- Establecer si el Hidroxitirosol modula la expresión de proteínas relacionadas con rutas de proliferación y apoptosis celular, como la proteína Secreted Frizzled-Related Protein 4.
- Describir nuevas alteraciones que no han sido previamente expuestas en la literatura científica, como modificaciones bioquímicas, clínicas, moleculares y patológicas asociadas al tratamiento combinado de epirrubicina y ciclofosfamida, seguido de taxanos, utilizado en el ensayo clínico como quimioterapia neoadyuvante.

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

1.1 *Qué es el cáncer de mama:*

Actualmente, está plenamente aceptado que en el proceso fisiológico normal, las células crecen, se desarrollan y mueren. Estos procesos, además, se realizan de forma equilibrada y perfectamente controlada por el propio organismo, algo que va a condicionar la supervivencia del mismo. De forma general, cada célula va a desarrollar una función determinada, para lo cual es imprescindible un proceso de diferenciación y maduración. A medida renovación de dichas células es necesaria, se generan nuevas células hijas que renueven a las envejecidas.

Por otro lado, cada una de las células va a presentar un tiempo de vida determinado, tras el cual se va a producir, de forma general, la activación de múltiples vías que van a desencadenar inexorablemente la muerte celular. Cuando estos fenómenos se ven alterados por diversas circunstancias, se produce una pérdida del control en el proceso que va a propiciar una división celular constante, sin que se produzca la muerte de la misma, formándose así una masa de crecimiento anómalo que se conoce con el nombre de **tumor**. Hay que destacar que en algunos casos, no va formarse una estructura sólida de crecimiento, como es el caso por ejemplo de las leucemias. Evidentemente, cuando este crecimiento anómalo se da en la mama, va a conocerse genéricamente como “cáncer de mama”.

El tumor, que en un principio aparece localizado, puede tener la capacidad de desplazarse a otras zonas del organismo, gracias a que dichas células pueden difundir a través de los vasos sanguíneos y/o linfáticos, produciéndose así la diseminación de las mismas. Este proceso de diseminación es conocido como **metástasis**. Los vasos linfáticos van a jugar un papel muy importante en cuanto a tratamiento del cáncer de mama, pues dichos vasos parten desde la mama hasta la axila, zona a través de la cual se van a liberar productos de desecho (contenido de la linfa junto con linfocitos) y por tanto puede ser una zona altamente predispuesta a la mencionada metástasis.

Según el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI) (National Cancer Institute, 2016), el concepto cáncer se define como “el nombre que se da a un conjunto de enfermedades relacionadas donde, algunas de las células del cuerpo empiezan a dividirse sin detenerse y se diseminan a los tejidos adyacentes”. Este está también aceptado por otras instituciones de como la Organización Mundial de la Salud (OMS) o la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). De acuerdo con la SEOM, puede definirse el cáncer de mama como una proliferación acelerada e incontrolada de células del epitelio glandular, aumentado su capacidad reproductiva.

1.2 *¿Cuántos tipos de cáncer de mama existen?*

Para poder comprender los tipos existentes y tratar de establecer una clasificación, es necesario conocer de forma esquemática la estructura interna de las glándulas mamarias humanas (figura 1), pues según la zona de afectación, encontraremos un tipo de tumor u otro.

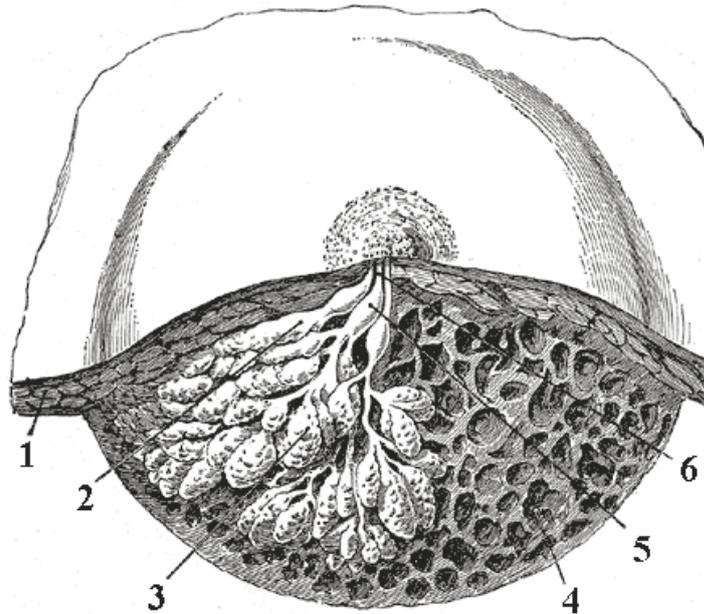


Figura 1. Estructura interna de glándula mamaria humana. 1: Tejido adiposo; 2: Ducto o lóbulo lactífero; 3: Lóbulo, constituido a su vez de lobulillos; 4: Tejido conectivo; 5: Seno del ducto lactífero; 6: Ducto lactífero.

Según la clasificación dada por el NCI estadounidense y SEOM española, existen principalmente **dos tipos** de cáncer de mama de acuerdo al lugar de origen de la tumoración o tipo histológico (establecidos por su frecuencia de distribución):

- *Carcinoma ductal*: Comienza en los conductos que llevan leche desde la mama hasta el pezón. Este tipo representaría la gran mayoría de los casos, llegando al 80% de los mismos.
- *Carcinoma lobulillar*: Comienza en los lobulillos o estructuras productoras de leche.

Una subclasificación de los anteriores, de acuerdo a la **capacidad invasiva** sería:

- Invasivo: Si se ha propagado desde el conducto galactóforo o lobulillo a otros tejidos en la mama.
- No invasivo: Si aún no ha invadido otro tejido mamario. Este tipo se denomina *in situ*.
 - El carcinoma ductal *in situ* (CDIS), o carcinoma intraductal, se localiza en el revestimiento de los conductos galactóforos que todavía no ha invadido tejidos cercanos. Sin tratamiento, puede progresar a cáncer invasivo.
 - El carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS) es un marcador del aumento del riesgo de cáncer invasivo en la misma o ambas mamas.

Además de los anteriormente citados (los más frecuentes en distribución), pueden aparecer otros tipos de cáncer infrecuentes. La tabla 1 muestra una clasificación

relativamente sencilla de los distintos tipos de cáncer de mama, basada en estudios epidemiológicos (Bleiweiss, 2013; Engstrom et al., 2013).

Tabla 1. Clasificación de tumores mamarios y su frecuencia

Tipo	Subtipo	Frecuencia
Carcinoma invasivo	Ductal infiltrante	76%
	Lobulillar infiltrante	8%
	Medular	2%
	Mucinoso o coloide	2%
	Papilar infiltrante	1%
	Tubular	2%
Fibroadenoma		7-12%
Carcinoma ductal in situ		<5%
Tumor filoide		0.5-2%
Tumores epiteliales	Papiloma intraductal	0,40%
	Adenoma del pezón	Raro
	Papilomatosis	Raro
Sarcoma	Angiosarcoma	<0,1%
	Rabdomiosarcoma	Raro
	Leiomiomasarcoma	Raro
	Condrosarcoma	Raro
	Osteosarcoma	Raro

Se puede establecer a su vez una clasificación en función del **grado histológico o grado Nottingham** (llamado también modificación de Elston-Ellis del sistema de gradación de Scarff-Bloom-Richardson), basado en el grado de diferenciación que presentan las células tumorales. Es una categorización de tipo anatomopatológica donde se analizan las células al microscopio y se determina el grado de diferenciación que presentan dichas células respecto al tejido donde se localizan. En este caso, esta clasificación nos da idea de la rapidez teórica con la que se propagará y evolucionará el tumor. Cuanto más similares son las células tumorales a las tisulares, más diferenciado se dice que está. Estos, de forma general, crecerán más lentamente que los tumores poco o nada diferenciados.

En el caso del cáncer de mama, la gradación se establece en tres categorías (Washington, 2010):

- G1 (bien diferenciado)
- G2 (moderadamente diferenciado)
- G3 (escasamente diferenciado)

Esta gradación (Gradación Nottingham) se obtiene de la suma de una serie de valores anatomopatológicos como:

- Grado nuclear: Según tamaño y forma del núcleo de las células cancerosas.

- Formación tubular: Cantidad de tejido tumoral con estructura de conducto lactífero normal.
- Rango mitótico: Cuántas células hay en división.

En cuanto a la **estadificación** del cáncer, de acuerdo con lo propuesto por la SEOM, podemos establecer una clasificación en función del grado de diseminación que presenta el tumor dentro del organismo, de tal forma que a un mayor grado de movilización en el cuerpo, mayor valor de estadificación, con todas sus categorías recogidas en la tabla 2, que muestra las zonas de afectación y las características de cada una de las categorías establecidas.

Tabla 2. Estadificación en cáncer de mama

Estadio 0	
Ductal y lobulillar in situ	Sin diseminación
Estadio I	
Tumor < 2cm	No hay diseminación
Estadio II	
Tumor < 2cm	Afectación ganglionar
Tumor 2-5 cm	Diseminación ganglionar o no
Tumor > 5cm	Sin afectación ganglionar
Estadio III	
IIIA: Tumor < 5cm. Diseminación ganglionar palpable	
IIIA: Tumor > 5cm. Diseminación ganglionar	
IIIB: Tumor con afectación a pared del tórax o piel de la mama	
IIIC: Tumor con más de 10 ganglios axilares afectados	
IIIC: Tumor con ganglios axilares y tras esternón afectados	
IIIC: Tumor con ganglios sub y supra claviculares afectados	
Estadio IV	
Metástasis por otras zonas corporales	

Además de las categorías anteriores, dada la creciente capacidad de las nuevas técnicas analíticas en los hospitales y laboratorios (más exactas y precisas) y por la elevada complejidad de clasificación con los sistemas anteriormente descritos, se han podido establecer nuevas categorías de clasificación de tumores en función de las características moleculares de los mismos, que establecen un mejor control sobre el estado de la patología, así como su pronóstico (Lam, Jimenez, & Boven, 2014; Viale, 2012). Entre estas, podemos encontrar:

- *Receptores hormonales positivos (RE+ y RP+)*: Son una serie de tumores sensibles a los estrógenos y progestágenos. Esto se debe a la presencia de receptores hormonales en las células afectadas que va a propiciar un crecimiento del tumor cuando interacciona hormona-receptor. El tratamiento más habitual consiste en terapia hormonal y el pronóstico suele ser mejor que para otros tipos de cáncer de mama.
- *HER2+*: HER2 es un gen que promueve la división, el crecimiento y la autorreparación celular. El exceso de copias para este gen, así como una sobreexpresión de la proteína correspondiente (Her2), propicia generalmente un tumor más agresivo y con mayor capacidad de recurrencia. La terapia utilizada en

este tipo de tumores es la administración de medicamentos dirigidos al bloqueo de dicha proteína (anticuerpos monoclonales).

- *Luminal A y B:* Ambos son RE+. Son los tumores con mejor pronóstico y se caracterizan aparte de por ser RE+, por expresar genes LIV1 y ciclina D1 y queratinas de bajo peso molecular (CK7, CK8 o CK18 entre otras), de forma similar al patrón de expresión de las células del epitelio luminal de los conductos mamarios (lumen). Los cánceres luminal A son de bajo grado, suelen crecer con bastante lentitud, y tienen el mejor pronóstico. Los cánceres luminal B generalmente crecen más rápido que los luminal A, y el pronóstico no es tan favorable. La principal diferencia entre luminal A y B radica en el hecho de presentar un Ki67 inferior o superior al 14%. Siendo los de expresión Ki67<14% los denominados luminales A y los de mayor expresión, luminales B.
- *Basal like o triples negativos:* Se caracterizan por la sobreexpresión de citoqueratinas características CK5/6 y CK17, así como por la expresión de genes relacionados con la proliferación celular. Además, suelen presentar mutaciones en el gen p53 (gen supresor de tumores), sobreexpresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y HER2- RE-. Estos tipos de tumores, se asocian a la mutación BRCA1 y generalmente suponen un comportamiento más agresivo, pero con una elevada sensibilidad a los quimioterápicos (Irigoyen et al., 2011).

Las tres últimas clasificaciones se engloban dentro de las denominadas clasificaciones del cáncer de mama relacionadas con la expresión génica. La tabla 3 muestra su frecuencia de distribución en función de la expresión de receptores hormonales, expresión génica y niveles de ki67, de acuerdo con Bleiweiss et al. y Engstrom et al. (Bleiweiss, 2013; Engstrom et al., 2013):

Tabla 3. Frecuencia de tumores mamarios en función de expresión génica, receptores hormonales y ki67

Subtipo	Características frecuentes	Frecuencia
Luminal A	RE+ y/o RP+, HER2-, bajo Ki67	40%
Luminal B	RE+ y/o RP+, HER2+ (o HER2-, elevado Ki67)	20%
Basal like	RE-, RP-, HER2-	15-20%
HER2/neu	RE-, RP-, HER2+	10-15%

RE: Receptores de estrógenos
 RP: Receptores de progesterona
 Her2: Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano

1.3 Epidemiología del cáncer de mama:

El cáncer de mama es la causa de muerte más frecuente en mujeres en España, a pesar de que la mortalidad se ha ido reduciendo paulatinamente con los años, gracias a los protocolos de prevención y screening llevados a cabo por las autoridades sanitarias, así como por un aumento en el conocimiento sobre dicha patología en la población global. En España, en 2012, de acuerdo con los datos proporcionados por GLOBOCAN (IARC)

y expuestos a su vez por la SEOM, un total de **6075** mujeres fallecieron a consecuencia de este tipo de cáncer, ascendiendo a nivel mundial a **522000** casos (figura 2). El cáncer de mama es la causa más frecuente de muerte en mujeres españolas y con una supervivencia global a los 5 años del 89.2%, así como el de mayor incidencia (suponiendo un 29% de todos los cánceres en mujeres, con un total de **25215** casos diagnosticados en ese año y **1.7 millones** a nivel mundial) (figura 3).

▲ Estimated Breast Cancer Mortality Worldwide in 2012

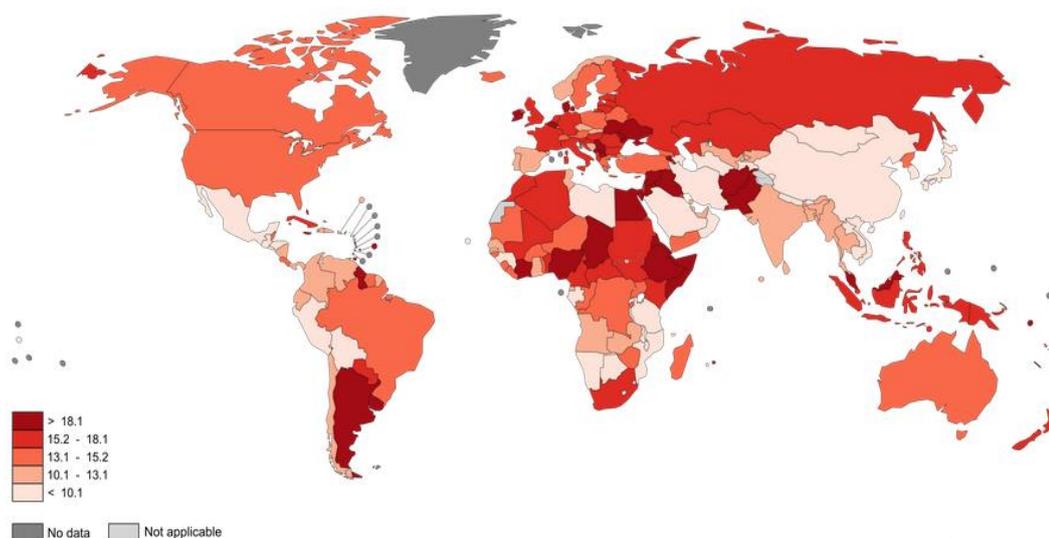


Figura 2. Frecuencia de mortalidad estimada en cáncer de mama a nivel mundial. GLOBOCAN (IARC) para el año 2012

▲ Estimated Breast Cancer Incidence Worldwide in 2012

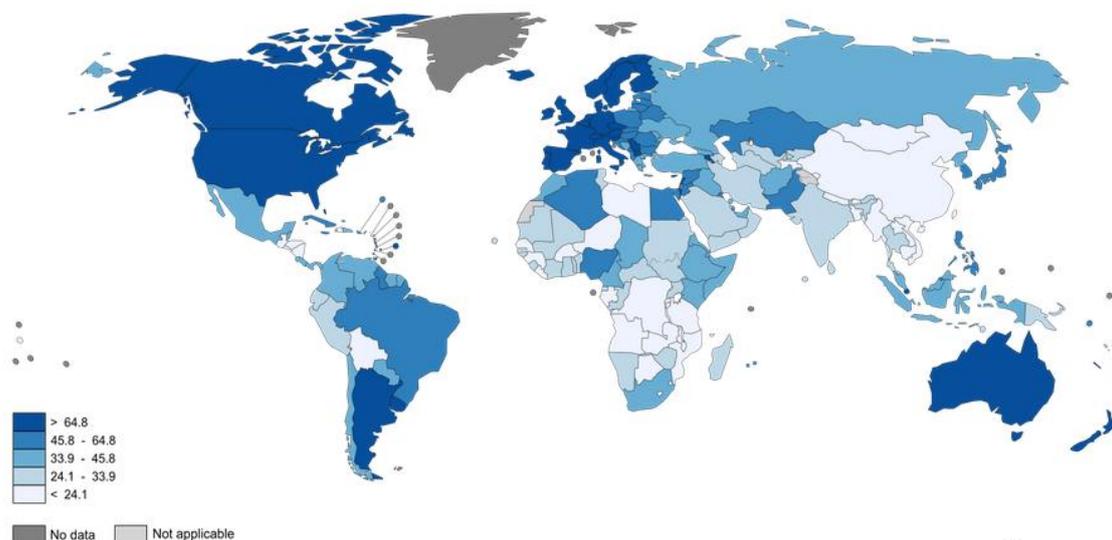


Figura 3. Incidencia estimada de cáncer de mama a nivel mundial para el año 2012. GLOBOCAN (IARC) 2012

Según datos de la *Fundación para la Educación Pública y la Formación en Cáncer (FEFOC)*, el cáncer de mama es poco frecuente en mujeres de menos de 40 años (aunque se diagnostican el 10% de los casos) y esta frecuencia es aún menor por debajo de los 30 años (sólo el 0,8% de cáncer de mama se presentan en mujeres de menos de 30

años y alrededor del 6,5% en mujeres entre 30 y 40 años). Según esta afirmación, y dado que aún no se conocen completamente todas las causas asociadas al cáncer de mama, se puede concluir que uno de los factores de riesgo más importantes (o el más relevante sin duda) que va a presentar esta patología es la edad. Probablemente a consecuencia de los niveles de estrógenos producidos y la edad de inicio de la menopausia, así como los antecedentes reproductivos que modulan la exposición hormonal durante la vida.

Algunos estudios han revelado que la posibilidad actual de que una mujer española desarrolle un cáncer de mama antes de cumplir 75 años se aproxima a un 5% y en Europa un 8% (Olier Gárate, 2009).

Observando las figuras 2 y 3, se puede comprobar cómo, a pesar de que la incidencia es muy elevada en España y en Europa, la mortalidad e incidencia en España es inferior a los de la media europea. Respecto a la incidencia, España tiende a aumentar en los últimos años (figura 4A). No obstante, la mortalidad en España tiene una pendiente negativa, disminuyendo progresivamente con el tiempo (figura 4B).

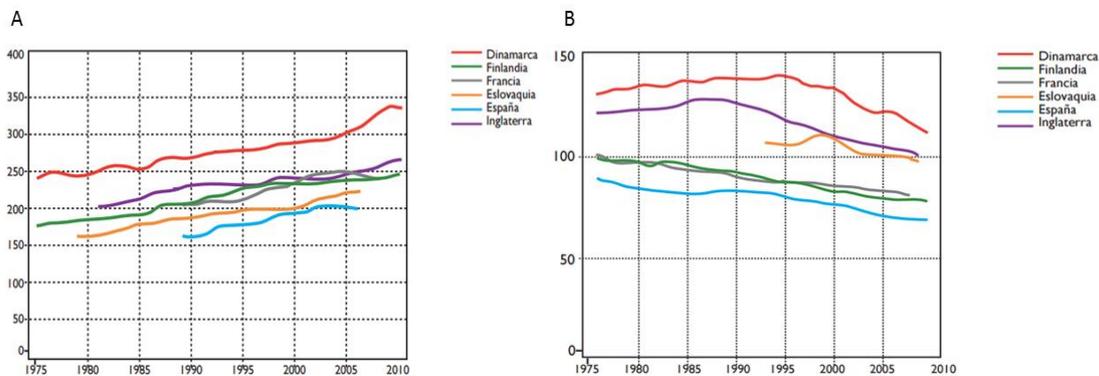


Figura 4. Incidencia (figura 4A) y mortalidad (figura 4B) del cáncer de mama en España desde el año 1975 a 2010 estandarizada por número de habitantes GLOBOCAN 2012 (IARC)

En España, la incidencia y mortalidad asociadas a distintos tipos de cáncer varía en función del género. En la figura 5 se puede observar la incidencia y mortalidad de los distintos tipos de tumores en España para el año 2012, de acuerdo con las cifras establecidas por GLOBOCAN (IARC). Según la figura 5, se puede observar que, en mujeres, la mayor incidencia se dio en cáncer de mama, seguido del cáncer colorrectal. En varones, la incidencia más elevada se observó en cáncer de próstata, seguido del cáncer de pulmón. En mujeres, a pesar de la gran diferencia observada en la incidencia de los dos tumores más frecuentes, la mortalidad se posicionó al mismo nivel, debido a la tendencia observada en la figura 4B para el cáncer de mama.

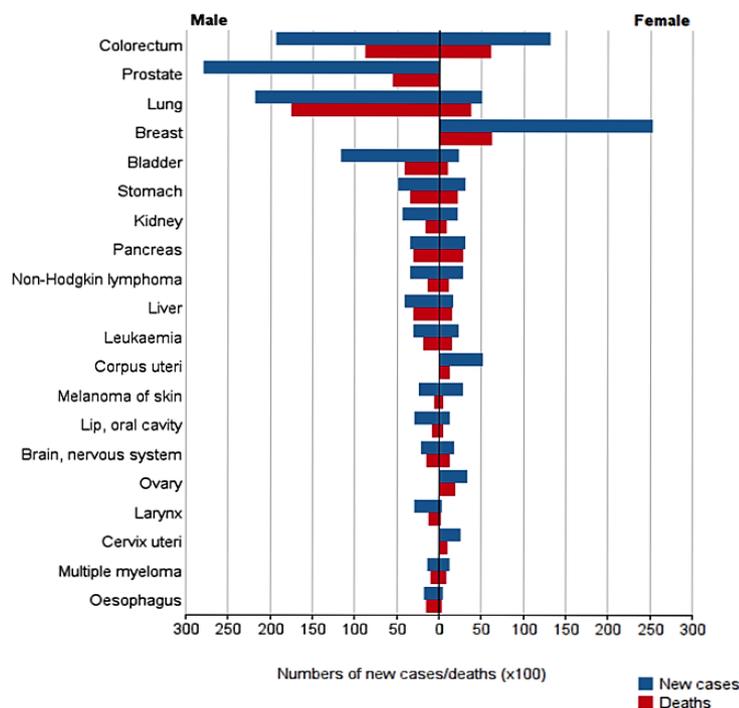


Figura 5. Incidencia y mortalidad del cáncer en España según género. GLOBOCAN 2012 (IARC)

De acuerdo con lo establecido por la Red Española de Registros del Cáncer (REDECAN), en un estudio llevado a cabo en 2014 (Galceran, 2014), estimó que, en 2014, en España se diagnosticaron un total de 26354 nuevos casos de cáncer de mama. Este mismo estudio, analizó el perfil de incidencia del cáncer de mama según las distintas provincias españolas, encontrando un claro gradiente norte-sur, con una tasa de incidencia ajustada por población de 69,6 por 100.000 en Navarra, 68,8 por 100.000 en Tarragona y 67,8 por 100.000 en Gerona. Estas tres provincias se situaron a la cabeza española en cuanto a la incidencia ajustada. Las provincias con menor tasa de incidencia, fueron Cuenca, con 50,6 por 100.000; Ciudad Real, con 51,6 por 100.000 y Granada, 54,8 por 100.000.

Existen una serie de factores de riesgos asociados al cáncer de mama, a través de los cuales se intenta dar explicación del aumento global de incidencia y mortalidad de este tipo de cáncer. Estos **factores de riesgo** ampliamente reconocidos por organizaciones de referencia mundial como OMS, NCI, Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) o SEOM son:

- Edad y género. El riesgo de padecer cáncer de mama aumenta con la edad. Las mujeres presentan 100 veces más probabilidades de sufrir cáncer de mama que los hombres (1% de incidencia).
- Antecedentes familiares de cáncer de mama. Un familiar de primer grado que haya padecido cáncer de mama incrementa en un 50% el riesgo de padecerlo. Aproximadamente, un 10% de las mujeres con cáncer de mama tienen antecedentes familiares de esta patología (Fontham, 2008).
- Genética. Determinadas personas poseen genes que los hacen más propensos a desarrollar cáncer de mama. Los defectos en genes más comunes se encuentran en

BRCA1 y BRCA2. Estos genes desembocan en proteínas protectoras, por lo que una alteración génica transmitida a la descendencia generará un mayor riesgo de presentar cáncer de mama. Mujeres con esta alteración tienen en torno a un 60% de probabilidades de padecer cáncer de mama en algún momento de su vida (S. Chen & Parmigiani, 2007).

- Ciclo menstrual. Existe mayor riesgo en mujeres con menarquia temprana (antes de los 12 años) o menopausia tardía (después de los 55) (Reeves et al., 2009).
- Parto. Mujeres nulíparas o con parto después de los 30 años presentan un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama. Mayor edad al primer embarazo incrementa el riesgo en un 20%. En multíparas y/o con embarazos a temprana edad se reduce el riesgo de padecer este tipo de cáncer.
- Densidad mamaria.
- Hormonoterapia. El empleo de un tratamiento hormonal sustitutivo durante años aumenta el riesgo de cáncer de mama (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1996).
- Obesidad. Existe controversia al respecto. La teoría general es que las mujeres obesas producen más cantidad de estrógeno, que puede estimular la aparición del cáncer de mama estrógeno dependiente (Wiseman, 2008).
- Consumo de alcohol.
- Radiación. Cuanto más joven se recibe la radiación, mayor es el riesgo de cáncer de mama.

Existe una herramienta online elaborada por el NCI para calcular el riesgo de cáncer de mama. www.cancer.gov/bcrisktool.

1.4 *Métodos de diagnóstico:*

Las pruebas diagnósticas más importantes para la detección del cáncer de mama son:

- **Mamografía:** Según la AECC, es una técnica para detectar cáncer de mama o ayudar a identificar la tumoración o protuberancia mamaria. Esta es la más aceptada como diagnóstico precoz, pues permite detectar lesiones en la mama hasta dos años antes de ser palpable. Esta técnica permite detectar hasta el 90% de los tumores de mamas, frente al 50% que supone la propia exploración física, aunque no es menos cierto que su mayor inconveniente es la generación de falsos positivos y negativos. Son recomendadas a partir de los 50 años y no hay evidencias para usar un método alternativo. Esta prueba utiliza dosis muy bajas de radiación, lo que la hace, junto con lo comentado anteriormente y con el hecho de ser una técnica no dolorosa, una técnica de elección (figura 6).



Figura 6. Imágenes obtenidas por un mamógrafo de un seno mediante rayos X

Sólo en el caso de encontrar anomalías en las imágenes obtenidas, se podrán solicitar el resto de pruebas:

- **Resonancia magnética.** Se emplea un campo magnético como forma de obtención de imágenes. Es una técnica de diagnóstico complementaria a otras.
- **Ecografía de las mamas.** Se puede mostrar si la tumoración es sólida o llena de líquido a través del empleo de ultrasonidos. Puede combinarse con la mamografía e incluso puede emplearse para dilucidar el estado de los ganglios linfáticos.
- **Biopsia de mama.** Consiste en la extracción de una pequeña porción del tumor o tejido. Se utilizan métodos como biopsia aspirativa (empleando distinto tamaño de aguja según el volumen requerido), guiada por ecografía, estereotáctica o abierta.
- **Tomografía computarizada** para ver si el cáncer se ha diseminado.
- **Tomografía por emisión de positrones (TEP).** Empleada para detectar zonas de alta concentración de glucosa, que indicará de forma general la presencia de células tumorales.
- **Biopsia de ganglio centinela.** Esta técnica permite observar si el cáncer se ha diseminado. Se realiza la inyección de una tinción marcadora en el pezón. Mediante el drenaje hacia la mama, se verá un primer ganglio (ganglio centinela) marcado con la coloración de dicha tinción, localizándose así el primer ganglio y procediendo a su extirpación y posterior análisis.

1.5 *Tratamientos convencionales*

Existen una serie de tratamientos denominados “tratamientos estándar” del cáncer de mama. La elección del tratamiento no va a seguir una única vía, sino que va a depender de múltiples factores tales como el tamaño del tumor, la localización, si existe diseminación o no, estado de salud general del paciente... es decir, un “protocolo de actuación”. Dichos protocolos se basan en la experiencia de los diversos tratamientos utilizados en función de una serie de variables que recoge la AECC:

- Edad del paciente.
- Estado general.
- Estado hormonal (premenopausia, menopausia).
- Localización del tumor.

- Fase o estadio en la que se encuentra la enfermedad (TNM).
- Receptores hormonales del tumor.
- Grado de las células.
- Positividad para algunos factores biológicos (por ejemplo Her2)
- La presencia de mutaciones conocidas en genes heredados de cáncer de mama (BRCA1 o BRCA2).

Los tipos de tratamientos estándar se pueden dividir en 4 tipos, según diversas guías de manejo del cáncer de mama:

1. Quirúrgico.
2. Radioterápico.
3. Quimioterápico.
4. Hormonoterápico.

Según la AECC se pueden clasificar en:

- Tratamiento Local. Dirigido al tumor en su lugar de origen o en alguna localización determinada. Ejemplo: Cirugía y Radioterapia.
- Tratamiento Sistémico. Se refiere al tratamiento que afecta a todo el organismo. Ejemplo: Quimio y Hormonoterapias.
- Tratamiento Adyuvante. Tratamiento sistémico administrado tras uno local sin que exista evidencia de enfermedad. Su objetivo es destruir células tumorales dispersas.
- Tratamiento Neoadyuvante. Administración de un tratamiento sistémico antes de uno local, con el objetivo de reducir el tamaño del tumor previamente a una intervención quirúrgica, con asociación o no de radioterapia concomitante. Este tipo de terapia va a jugar un papel clave en el diseño de nuestro estudio y es al que van a someterse las pacientes participantes en el ensayo clínico del que ha derivado este trabajo de investigación.

1.5.1 Tratamiento quirúrgico:

Hasta hace unas décadas, este tipo de tratamiento era la única solución existente para el cáncer, excluyéndose así cualquier otra expectativa que no contemplase la cirugía. Gracias a la evolución relativamente reciente, no sólo de este modelo de tratamiento, sino del resto, se ha generado un amplio abanico de posibilidades que permiten incluso una combinación entre sí, mejorando la expectativa de vida del paciente e incluso su calidad.

1.5.2 Tratamiento por Radioterapia:

Es un tratamiento que consiste en la aplicación de rayos X de alta potencia para eliminar las células cancerosas existentes mediante la mutación de su DNA. Dicha radiación por tanto, afecta a las células que presentan mayor tasa de multiplicación, que es este caso son las tumorales, aunque también afectará a células de gran capacidad de división sanas, lo que generará los efectos adversos característicos. Actualmente se

combina con la tumorectomía, con el fin de matar posibles células no eliminadas con la cirugía. Se pudo comprobar, que la tasa de recurrencia era del 30% en casos donde no se aplicaba radioterapia tras la cirugía, frente a un 10% que se da cuando sí se aplica según la Guía del Cáncer de Mama.

1.5.3 Quimioterapia:

La quimioterapia (QT) se caracteriza por ser un tratamiento basado en la administración de fármacos por vías sistémicas. Dichos fármacos van a ejercer un efecto destructivo en las células cancerosas, favoreciendo la disminución del tamaño del tumor, o su eliminación total. Suele ser administrada por vía i.v. aunque ocasionalmente se puede administrar vía oral, o incluso a través de un catéter, durante una serie de ciclos que tienen una duración determinada, seguido de periodos de descanso donde no se aplicará nada. El catéter está especialmente indicado en casos en que el ciclo sea muy duradero.

Los fármacos o combinaciones más comunes que pueden utilizarse, según informa la Guía del Cáncer de Mama, son:

- Ciclofosfamida
- Metotrexato
- Fluorouracilo
- Doxorrubicina
- Epirubicina
- Paclitaxel
- Docetaxel
- CMF (ciclofosfamida, metotrexato y 5-FU)
- CAF (ciclofosfamida, doxorrubicina y 5-FU)
- CEF (ciclofosfamida, epirubicina y 5-FU)
- EC (epirubicina y ciclofosfamida)
- AC (doxorrubicina y ciclofosfamida)
- TAC (docetaxel, doxorrubicina y ciclofosfamida)
- AC seguida de T (doxorrubicina y ciclofosfamida, seguida de paclitaxel)
- TC (docetaxel y ciclofosfamida)

El trastuzumab (Herceptina) es una terapia dirigida a HER2. Puede ser suministrada también con quimioterapia como un tratamiento adyuvante en cáncer de mama HER2-positivo.

Aparte de los fármacos y las combinaciones de fármacos mencionados arriba, los siguientes pueden ser usados para tratar cáncer de mama **metastático recurrente**, ya sea individualmente o en combinación:

- Vinorelbina
- Capecitabina
- Paclitaxel fijado a proteínas
- Doxorrubicina liposomal pegilada

- Gemcitabina
- Carboplatino
- Cisplatino
- Ixabepilona

Trastuzumab y lapatinib son terapias dirigidas a HER2 que pueden ser suministradas con quimioterapia en cáncer de mama metastásico HER2-positivo. Bevacizumab, un fármaco bloqueante de los vasos sanguíneos (antiangiogénico) es otra terapia dirigida aprobada en combinación con quimioterapia en el tratamiento de cáncer de mama metastásico, aunque hay que recordar que en algunos casos, un tumor no necesita necesariamente una angiogénesis para continuar creciendo.

El estudio que se presenta en esta tesis doctoral, tiene como muestra poblacional a pacientes que reciben una quimioterapia neoadyuvante combinada de epirrubicina y ciclofosfamida, seguida de taxanos como paclitaxel, Nab-paclitaxel o docetaxel, de tal forma que vamos a profundizar un poco más en las acciones y mecanismos de acción de los mismos.

1.5.3.1 Antraciclinas:

Se caracterizan por ser fármacos antibióticos, con mecanismos de acción muy diversos de acuerdo a la estructura que presente cada fármaco. Estos mecanismos varían desde ser capaces de intercalarse en las hebras de ADN, inhibir las topoisomerasas hasta la alteración de las membranas celulares.

El primer fármaco que se descubre en este grupo es la daunorubicina, obtenida de *Streptomyces peucetius*. Posteriores modificaciones en su estructura han dado lugar a fármacos más potentes o con mayor capacidad de penetración, como son la doxorubicina o idarubicina. En general, su estructura responde a un compuesto tetracíclico unido por enlace glucosídico a al aminoazúcar daunosamina. Modificaciones en los grupos moleculares de la estructura general (figura 7) van a dar lugar fármacos diferentes y a grandes modificaciones en las propiedades farmacológicas con espectro de acción diferentes (Beledo, Simón, & Martínez, 2013).

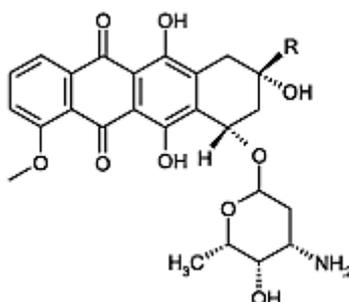


Figura 7. Estructura general tetracíclica de antraciclinas

Se sabe que son capaces de intercalarse entre la bases del ADN y ARN, alterando así su estabilidad y disminuyendo la capacidad de proliferación (Rabbani, Finn, & Ausio,

2005). Además, tienen la capacidad de producir una inhibición de la topoisomerasa II por unión al complejo binario ADN-topoisomerasa II, generando así un complejo más grande y estable que deriva finalmente en la rotura irreversible de las cadenas simples y dobles del ADN (Khasraw, Bell, & Dang, 2012). Además, algunos estudios han comprobado que las antraciclinas son capaces de inducir una respuesta inmunológica que puede facilitar la erradicación del tumor (Galluzzi, Senovilla, Zitvogel, & Kroemer, 2012) e incluso promover una translocación de la calprotectina intracelular a la superficie celular, que actúa como una señal de muerte celular inmunogénica (Z. Zhang, Yu, Wang, Wu, & Huang, 2015). Aunque no está completamente dilucidado, se sabe que las antraciclinas son capaces de generar radicales libres semiquinónicos por reducción enzimática que pueden afectar a la estabilidad del propio ADN, contemplándose así como un posible mecanismo de acción de las mismas, aunque más relacionado con la **cardiotoxicidad** asociada a éstas. Dicha cardiotoxicidad es un efecto secundario dosis dependiente en antraciclinas (Xie et al., 2015), y es el principal responsable de la supresión del tratamiento, comprometiendo en determinadas ocasiones el beneficio-riesgo (Pai & Nahata, 2000). El tratamiento con antraciclinas promueve un riesgo 5 veces mayor de fallo cardíaco y de alteraciones en la eyección del ventrículo izquierdo, y lo hacen no sólo de forma dependiente de dosis, sino dependiendo del tiempo de exposición a la misma (Yamaguchi et al., 2015). Al parecer, estos efectos cardiotoxicos asociados al tratamiento con antraciclinas podrían revertirse a través de la terapia farmacológica normal empleada frente a cardiopatías y mediante la realización de ejercicio físico moderado (Xie et al., 2015).

Finalmente, las antraciclinas van a poder desestabilizar las membranas celulares, inhibir polimerasas, helicasas y otras enzimas de reparación del ADN.

Estos fármacos de amplio espectro son utilizados como primera línea en el tratamiento del cáncer de mama y el más frecuente es la doxorubicina, aunque pueden aparecer resistencias derivadas principalmente de mutaciones a nivel de la topoisomerasa II (Beledo et al., 2013).

La epirubicina o epirubicina, es un epímero 4' de la doxorubicina. Es uno de los fármacos empleados en el trabajo llevado a cabo con esta tesis doctoral. Esta molécula pertenece al grupo de antibióticos antraciclinas y se caracteriza porque su mecanismo de acción es la intercalación entre los pares de bases de las cadenas de ADN y ARN, desestabilizando a las células e impidiendo su proliferación. Al igual que el resto de fármacos de este grupo, presenta las mismas propiedades en cuanto a mecanismos de acción y efectos secundarios (Bonadonna et al., 1993), aunque la cardiotoxicidad asociada a esta molécula es mucho menor que la encontrada para doxorubicina, con idéntica eficacia antitumoral (Hortobagyi et al., 1989). En un estudio de meta análisis realizado por Yamaguchi, N. y col. (Yamaguchi et al., 2015) para determinar la cardiotoxicidad asociada distintas antraciclinas durante el tratamiento frente al cáncer de mama, se comprobó que no existían diferencias entre epirubicina y otros fármacos del grupo en lo referente al efecto cardiotoxico en estas pacientes. A pesar de todo, se han llevado a cabo numerosos estudios que avalan que la epirubicina puede utilizarse a dosis elevadas antes de que derivar en efectos cardiotoxicos (Findlay et al., 2007; Khasraw et al., 2012). Según Khasraw, M. y col. 2012, este aumento de dosis es directamente proporcional a un mayor

efecto antitumoral. Algunos autores han revisado y comparado los efectos secundarios de doxorubicina y epirubicina descritos en la literatura, a dosis equimoleculares para ambos fármacos, observando que la epirubicina, en comparación con doxorubicina, genera menos náuseas, vómitos, neutropenia y cardiotoxicidad (Khasraw et al., 2012). De acuerdo con Chan, S. y col. (Chan et al., 2004) la neutropenia secundaria asociada al tratamiento con estos fármacos fue menor en pacientes tratadas con epirubicina que cuando recibían una terapia con doxorubicina en sus formulaciones pegiladas o liposomales (formas menos tóxicas de la doxorubicina). De acuerdo con todo lo anterior, la epirubicina se está posicionando actualmente como un fármaco de elección en la terapia antitumoral combinada. Este se debe principalmente a la menor cardiotoxicidad hallada para esta molécula (incluso a dosis elevadas), sus menores efectos secundarios derivados y su gran eficacia como antitumoral para estadios iniciales y avanzados del cáncer de mama.

1.5.3.2 Ciclofosfamida:

Es un agente citostático de efecto alquilante y amplio espectro antineoplásico. Se denomina también “mostaza” debido a su naturaleza (mostazas nitrogenadas). Es un profármaco que una vez absorbido es metabolizado por un sistema de oxidasas mixtas CYP2B y es transformada en productos alquilantes, que son los que ejercen la actividad. En el caso de la ciclofosfamida, se transforma en 4-hidroxíciclofosfamida y aldofosfamida, que genera espontáneamente acroleína y mostaza fosforamida, un agente de elevada capacidad alquilante. Además, la aldofosfamida puede generar carboxifosfamida y mostaza nornitrógeno, aunque las principales actividades de la ciclofosfamida se han asociado a la 4-hidroxíciclofosfamida y a la mostaza fosforamida. Los agentes alquilantes producen citotoxicidad como consecuencia de la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y distintas moléculas nucleofílicas de las células (ADN, ARN, proteínas y membranas), afectando principalmente a las bases nitrogenadas, a pesar de que los grupos fosfato puedan interaccionar con estos agentes alquilantes. Dentro de estas, el nitrógeno en posición 7 de la guanina es una de las dianas de estas moléculas. Su alquilación produce cambios importantes en las propiedades químicas de la molécula que la hacen más propensa a unirse a la timina que a la citosina. Este hecho puede favorecer la hidrólisis y dar lugar a la despurinización, desestabilizando el ADN y promoviendo la escisión de la cadena (Beledo et al., 2013; J. Y. Wang, Prorok, & Vaughan, 1993). Aunque aún no se conocen completamente los mecanismos de estos agentes alquilantes, se cree que la alteración provocada al ADN puede desencadenar un inicio de apoptosis (Crook, Souhami, & McLean, 1986), pudiendo afectar a cualquier fase del ciclo celular (Osawa, Davies, & Hartley, 2011).

Los principales efectos adversos de carácter agudo asociados a este fármaco son náuseas, vómitos, visión borrosa y confusión. Los efectos diferidos se caracterizan por depresión de médula ósea, disminución de secreción de hormona antidiurética, infertilidad temporal, teratogenia e incluso cáncer de vejiga si su administración se prolonga en el tiempo (Beledo et al., 2013). La ciclofosfamida a dosis elevadas genera

una serie de alteraciones en pulmón y vejiga que pueden llegar a comprometer la vida del paciente. A pesar de la citotoxicidad a través de lesiones en el ADN, asociada a la acroleína a dosis elevadas, se han relacionado estas alteraciones en vejiga y pulmón con un descenso en los niveles de glutatión reducido (GSH). La acroleína puede formar un complejo intracelular con el GSH que impide su acción antioxidante, desencadenando un aumento en la apoptosis. Una regeneración de este GSH con fármacos precursores como la N-acetilcisteína revierte estos daños colaterales en pulmón y vejiga (Horton, Mamiya, & Kehrer, 1997; Tanel & Averill-Bates, 2007).

La ciclofosfamida es especialmente útil cuando se administra como fármaco antineoplásico, debido principalmente al amplio espectro tanto de actividad como de dosis efectiva. Generalmente se emplea de forma combinada con otros fármacos y con pautas de dosis muy variables (Beledo et al., 2013). Las dosis empleadas en el tratamiento antitumoral suelen ser dosis muy bajas que se extienden en el tiempo (Administración metronómica). En el cáncer de mama se suele emplear una administración metronómica en estadios avanzados de la enfermedad (Bojko, Schimmel, Bosse, & Abenhardt, 2012; Ge et al., 2012), consiguiendo un efecto citotóxico asociado a una actividad inmunomoduladora (Madondo, Quinn, & Plebanski, 2016; Munzone & Colleoni, 2015).

1.5.3.3 Taxanos:

Estos compuestos se caracterizan por ser derivados naturales de estructura terpénica muy compleja (figura 8), obtenidos inicialmente del tejo, donde se comprobó sus propiedades antineoplásicas, aunque de forma general se encuentran en todas las plantas del género *Taxus*, del que derivó genéricamente su nombre como taxol. Actualmente se recurre a la síntesis de muchos de estos fármacos; los más empleados en la actualidad son docetaxel y paclitaxel, este último, localizado inicialmente en el tejo del pacífico (Beledo et al., 2013), se sintetiza actualmente como derivado semisintético (Rowinsky & Donehower, 1995). Para llevar a cabo el ensayo clínico que refleja esta memoria de tesis, tras la administración de epirrubicina y ciclofosfamida, se emplearon paclitaxel, nab-paclitaxel o docetaxel en diferentes ciclos, de acuerdo con las características de la paciente y según las necesidades detectadas por el facultativo. El fármaco nab-paclitaxel surgió tras la necesidad de elaborar formas farmacéuticas más hidrosolubles que facilitasen la preparación de estos compuestos antineoplásicos y restar así efectos alérgicos producidos por los solventes empleados en la elaboración (ten Tije, Verweij, Loos, & Sparreboom, 2003). Este fármaco se generó tras la unión de paclitaxel a albúmina (Loong, Chan, & Wong, 2016). Además de conseguir una mejora en la elaboración, se produjo un incremento en la biodisponibilidad, que hizo al fármaco más efectivo y tolerable que a su predecesor (Desai et al., 2006). Este incremento en tolerabilidad, eficacia y biodisponibilidad le permite emplearse como terapia monofarmacológica frente a cáncer de mama en estadios avanzados resistente a otros quimioterápicos (Loong et al., 2016).

El mecanismo de acción general de los taxanos se basa en su unión al extremo N-terminal de la subunidad beta de la tubulina de los microtúbulos generando un complejo

estable que altera la flexibilidad de los filamentos e impide así la correcta división celular. Aunque su mecanismo de acción parecer diferir ligeramente entre un fármaco u otro, no se han detectado diferencias significativas en cuanto a la elección de un taxano u otro (Gherzi et al., 2015). A diferencia de las antraciclinas, estos fármacos son considerados como letales para la célula por impedir funciones vitales para la misma y degenerando directamente en la muerte celular. Además, son considerados seguros a nivel cardíaco, a diferencia de las antraciclinas (Khasraw et al., 2012), aunque pueden generar alteraciones en el ritmo cardíaco (Gherzi et al., 2015). Uno de los efectos secundarios más limitantes en el uso de estos fármacos es la aparición de neutropenia y leucopenia. Estos fármacos además presentan una elevada tendencia a producir reacciones severas de hipersensibilidad, por lo que en muchos casos se trata prevenir con la administración de corticoides o antihistamínicos conjuntamente. Al igual que sucede tras la administración de otros fármacos antineoplásicos, su administración genera de forma habitual náuseas y vómitos. Los taxanos además pueden generar neuropatías periféricas, bradicardias (principalmente asociadas a paclitaxel), edemas (asociados a docetaxel), prurito (Beledo et al., 2013) y alteraciones dermatológicas, principalmente producidas por docetaxel (Biganzoli, Aapro, Loibl, Wildiers, & Brain, 2016). Algunos autores observaron que los efectos neuropáticos eran mayores tras la administración de nab-paclitaxel que tras una terapia convencional de paclitaxel (Gradishar et al., 2005), aunque su resolución a un estado más leve de la enfermedad era más corto que con paclitaxel convencional (Biganzoli et al., 2016; Gradishar et al., 2005).

Los taxanos se van a unir fuertemente a proteínas plasmáticas, siendo imprescindible para su metabolización su paso a nivel hepático. Es por esto por lo que su eliminación es mucho más prolongada en aquellos pacientes con niveles de transaminasas y fosfatasa alcalina elevados (Beledo et al., 2013).

Son fármacos empleados muy frecuentemente en el tratamiento del cáncer de mama, generalmente combinados con otros grupos de fármacos que aumentan su espectro de acción, aunque también incrementan su toxicidad. Los taxanos han sido ampliamente estudiados y han demostrado importantes ventajas como antitumorales en pacientes con cáncer de mama metastásico y resistentes a otros quimioterápicos (Sachdev & Jahanzeb, 2016).

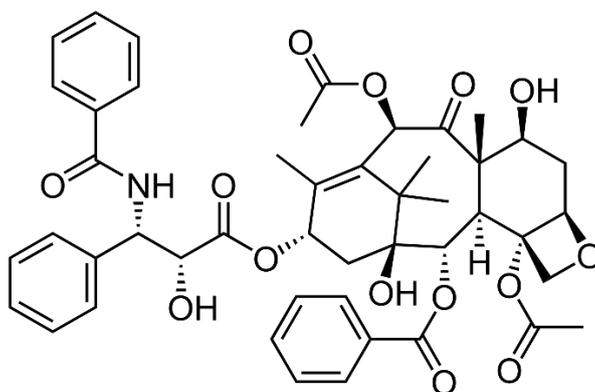


Figura 8. Estructura terpénica del Paclitaxel

1.5.4 Hormonoterapia:

Esta terapia es útil en los casos en que el tumor sea dependiente de estrógenos o progestágenos. Si se ha determinado un tumor RE+ o RP+ se podrá recurrir a esta terapia. Entre los ejemplos de terapia hormonal utilizada como terapia adyuvante tenemos el tamoxifeno, anastrozol, letrozol y exemestano.

El tamoxifeno es un fármaco de estructura similar a los estrógenos (figura 9), por lo que va a unirse a los receptores celulares de los mismos y va a impedir la unión de la molécula original, generando así una no actuación estrogénica sobre las células tumorales. Este fármaco es, por tanto, un inhibidor competitivo estrogénico. Reduce el riesgo de recurrencia en la mama, el riesgo de desarrollar cáncer en la otra mama, y el riesgo de recurrencia distante. Es útil en quimioprevención del cáncer de mama en mujeres con alto riesgo de desarrollar la enfermedad.

La investigación actual muestra que la duración óptima de tamoxifeno adyuvante es de cinco años. Se toma diariamente vía oral, lo que lo hace relativamente cómodo. Algunos efectos secundarios del tamoxifeno son tromboembolismo venoso, hemorragia vaginal, prurito, cambios endometriales, intolerancia gastrointestinal, alopecia, calambres musculares en extremidades inferiores, sofocos, sequedad vaginal, pequeño aumento del riesgo de cáncer de útero (endometrial) y sarcoma uterino. El tamoxifeno actualmente tiene efectos favorables en el hueso y los niveles de colesterol, disminuyendo la osteoporosis y propiciando niveles de colesterol menores. Este fármaco puede ser efectivo para las mujeres tanto premenopáusicas como posmenopáusicas, según la Guía del Cáncer de Mama.

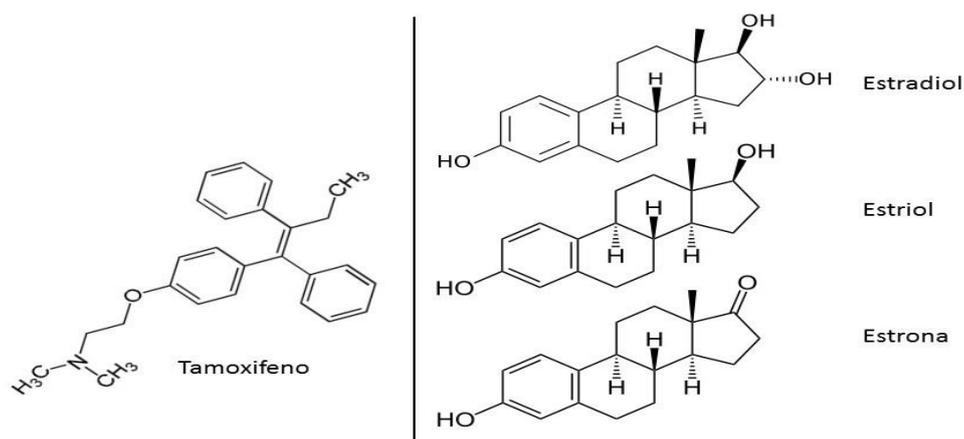


Figura 9. Estructura molecular del tamoxifeno y hormonas estrogénicas. Muestra la similitud estructural necesaria para su mecanismo de acción

Existen inhibidores de la enzima aromatasa, que se encarga de producir el estrógeno. Entre estos medicamentos se incluyen el anastrozol, el letrozol y el exemestano.

Al igual que el anterior, también son utilizadas vía oral y de forma diaria. Los efectos secundarios de los inhibidores de la aromatasas son similares. Estos fármacos no son apropiados para mujeres menopáusicas, precisamente por el efecto protector que presentan los estrógenos en la mujer. El tamoxifeno y el inhibidor de la aromatasas son también usados comúnmente para tratar recurrencias metastásicas, aunque estos dos fármacos no han demostrado que su uso conjunto mejore la efectividad.

Fulvestrant es una terapia hormonal aprobada para pacientes con cáncer metastásico. Actúa sobre unos receptores selectivos de estrógeno (SERDs). Administrado vía i.m. Sus efectos secundarios son debidos a que es un completo bloqueador de estrógeno, e incluye síntomas menopáusicos tales como sofocos y sequedad vaginal.

Actualmente existe el concepto de terapia dirigida, que se basa en focalizar la acción sobre genes y/o proteínas con el fin de evitar el desarrollo del cáncer.

Dirigida HER2: Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal aprobado para el tratamiento de cáncer de mama avanzado y como terapia adyuvante para el cáncer de mama de estadio temprano en tumores HER2 positivos. En estos momentos, se recomienda un año del fármaco para cáncer de mama inicial. La combinación de lapatinib (inhibidor de tirosin kinasa) y capecitabina está aprobada para el tratamiento de mujeres con cáncer de mama HER2 positivo, avanzado o metastásico, previamente tratadas con quimioterapia y trastuzumab, y que no han respondido.

Dirigida antiangiogénica: Se evita la formación de nuevos vasos sanguíneos y se disminuye así tanto la posibilidad de metástasis tumoral, como el tamaño del mismo. Bevacizumab es un fármaco antiangiogénico, que suele usarse en tumores metastásicos o recurrentes.

1.6 *Estrés oxidativo:*

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la capacidad del sistema biológico de reparar el daño resultante. Desequilibrios en este estado redox normal (ambiente reducido intracelular) pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de radicales libres (RLs) y peróxidos que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Todo esto va a venir condicionado por la capacidad del organismo de producir una respuesta efectiva contra un incremento exacerbado de moléculas oxidantes.

1.6.1 *Oxidación/reducción:*

Según Elejalde y col. (Elejalde Guerra, 2001), es un proceso bioquímico que implica bien una pérdida de electrones, bien una ganancia de oxígeno o bien un proceso de deshidrogenación o donación de hidrógeno. Este proceso se acompaña siempre de otro inverso denominado reducción, constituyendo ambos las denominadas reacciones redox.

1.6.2 *Radicales libres:*

Son moléculas o fracciones de las mismas que presentan al menos un electrón desapareado en su orbital más externo y que por tanto son extremadamente reactivos, de escasa concentración y vida media muy corta (lo que dificulta su determinación) y capaces de reaccionar formando enlaces con otras moléculas y átomos (Elejalde Guerra, 2001; Halliwell B, 2006).

Los RLs van a poder ser eléctricamente neutros o estar cargados, bien con carga positiva como negativa. Éstos actúan como catalizadores para generar cambios y reacciones químicas intermoleculares. Cuando dos RLs reaccionan, sus electrones desapareados forman un enlace covalente, estabilizando así a ambas moléculas, como ocurre por ejemplo con el óxido nítrico y el radical superóxido.

Sin embargo, los RLs reaccionan con una molécula no radicalaria, se da una reacción en cadena que concluye con la generación de nuevos radicales hasta encontrar un compuesto estable o un antioxidante, como la vitamina E que lo estabilice (Javier Arias, 1999; Morillas-Ruiz, 2010).

Estos RLs pueden provenir de procesos en los que interviene el oxígeno, generándose así los denominados “radicales libres de oxígeno”.

Los RLs en exceso van a producir alteraciones en lípidos, proteínas y otros elementos presentes en las células, generando así una alteración del equilibrio normal, que puede generarse por un aumento en la producción de los RLs o por una descompensación en los sistemas de defensa. En muchos casos, la producción de los RLs es muy superior a estos mecanismos y se produce el estrés oxidativo.

1.6.3 Especies Reactivas de Oxígeno (EROs):

Son un conjunto de moléculas que poseen electrones desapareados que les dotan de una muy elevada reactividad. Éstas son generadas en aquellos procesos metabólicos en los que interviene el oxígeno. Dentro de estas EROs, se encuentran los iones de oxígeno, los radicales libres y los peróxidos. Como explica Elejalde Guerra (Elejalde Guerra, 2001) las EROs se producen fisiológica y principalmente en situaciones de isquemia, hiperoxia, exceso de ejercicio físico.... Los más importantes son el oxígeno molecular (O_2), el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (HO^{\cdot}) y su precursor peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Además, según Ray y col, 2012 (Ray, Huang, & Tsuji, 2012), estas son generados endógenamente debido a la fosforilación oxidativa que se da en la mitocondria o debido a interacciones con componentes exógenos denominados compuestos xenobióticos.

No obstante, las especies reactivas (tanto de oxígeno como de nitrógeno), pueden generarse en muchos casos como algo beneficioso. Este hecho, según explica Valko y col, 2007 (Marian Valko et al., 2007), se da a concentraciones bajas y moderadas, como ocurre en la formación de radicales superóxido y óxido de nitrógeno, que se sintetizan y liberan a concentraciones moderadas cuando se produce una infección por un patógeno. Se generan por tanto como señales moleculares cuando son sintetizadas a bajas concentraciones. De acuerdo con Dhalla y col. 2000 (Dhalla, Temsah, & Netticadan, 2000), las EROs pueden clasificarse en dos categorías: Radicales y no radicales, que se describirán posteriormente.

Homeostasis redox:

Comúnmente se habla de que la célula presenta un “estado redox”, que consiste en un equilibrio entre las moléculas intracelulares en estado oxidado y las que están en estado reducido. Dicho equilibrio es capaz de mantenerse por los distintos sistemas biológicos de forma similar a la regulación del pH.

Así, tanto la oscilación del estado redox, como la estabilidad de los sistemas de regulación del mismo, van a influir en la funcionalidad celular, pudiendo generarse diversas patologías a consecuencia de la descompensación de los niveles del ratio de moléculas reducidas/oxidadas (estrés oxidativo). De forma general se puede decir que la homeostasis redox, que no es más que el mantenimiento adecuado del estado redox o “ambiente redox”, se debe mayoritariamente a la actuación del glutatión reducido y a la tiorredoxina (dos sistemas más importantes de regulación), según estudios de Valko y col, 2007 (Marian Valko et al., 2007).

Aunque los dos anteriores sean los dos de los sistemas más importantes, hemos de destacar que el equilibrio redox o “estado estacionario” no se alcanza únicamente gracias a estos. Hay que tener en cuenta que la concentración de las EROs, así como de sus moléculas derivadas, va a venir determinada por el balance existente entre la producción y eliminación de dichas EROs gracias a múltiples sistemas, como por ejemplo enzimas (Superóxido Dismutasa [SOD], Glutathion Peroxidasa [GPx] o catalasa [CAT]), sistemas no enzimáticos como α -tocoferol (vitamina E), glutatión, beta caroteno o ascorbato (vitamina C). Estos sistemas actúan en la célula a bajas concentraciones.

Para poder llevar a cabo la homeostasis redox, muchos organismos, incluidas las propias bacterias, son capaces de poner en marcha mecanismos compensatorios destinados a restablecer el equilibrio redox. Este mecanismo, ampliamente estudiado por Dröge, 2002 (Droge, 2002) se conoce como “señalización redox”. Se induce una respuesta protectora contra el daño oxidativo y regenera así el estadio inicial redox (homeostasis redox), tras una exposición temporal a los radicales libres.

Así mismo, las propias proteínas oxidadas van a poder actuar como sustratos de los sistemas proteolíticos, que van a contribuir al mantenimiento del estado redox.

Esto se debe a que las proteínas mal estructuradas van a ser objetivo de los sistemas de degradación (proteasomas), que van a permitir la eliminación de dichas proteínas, evitando así la propagación del daño oxidativo cuando las concentraciones de los RLs sean relativamente altas, algo que no ocurre cuando las concentraciones son bajas/moderadas, debido principalmente a la propia situación de estrés que se genera. Al eliminar los medios elementos oxidados, radicales o moléculas propensas a transformarse en radicales, disminuimos la capacidad de propagación y reestructuramos el equilibrio redox.

Este mecanismo de compensación podría inducir a pensar en que basta con sistemas similares para compensar todos los caos, pero el hecho es que puede darse la otra cara de la moneda y promover la acumulación de las proteínas dañadas a nivel celular (todo dependiente de la concentración), como muestran Dröge, 2002 y Grune y col, 1997 (Droge, 2002; Grune, Reinheckel, & Davies, 1997).

En muchos casos, los propios RLs van a poder ejercer un efecto retroactivo, de tal forma que cuando su concentración es muy elevada, se produce una estimulación o inhibición de diversos enzimas relacionados con su producción.

En otros casos, los RLs van a generar una respuesta a nivel de cascada de señales en aquellas vías sensibles a la actuación de dichos radicales, que va a promover la expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes o transportadores de cistina en determinadas células (algo que favorece la producción de glutatión), lo que va a permitir una retirada de los mismos del medio celular. Este fenómeno, va a depender de las concentraciones de los RLs y su perduración en el tiempo (Ballester, 1996; Droge, 2002). Cuanto más prolongada sea su exposición, más factible será que se generen cambios en la expresión proteica de forma permanente que lleve a una situación patológica.

1.7 *Marcadores de estrés oxidativo:*

Para poder establecer una medida sobre el equilibrio redox dentro de un organismo, ya sea a nivel celular, a nivel de órgano o tejido, necesitamos utilizar diversas formas de cuantificar y calificar el mismo, dado la complejidad de sistemas y moléculas que están implicadas en cada uno de los procesos. La forma más elemental sería la de medir directamente el nivel de toda aquellas moléculas que conocemos que están relacionadas con el balance redox y establecer un nivel de estrés oxidativo en un organismo. A pesar de la evidencia que resulta de este sistema, en todos los casos no se puede medir de forma directa estas moléculas, bien porque su tiempo de actuación es ínfimo, bien porque una descompensación en sus niveles no implica inherentemente un daño en macromoléculas o alteración del estado redox o simplemente por la elevada complejidad que representa (Pryor, 2000). Es por este motivo por lo que podemos medir directamente aquellos elementos que intervienen produciendo la lesión, por ejemplo los radicales libres o determinadas EROs, midiendo los niveles y actividades de los sistemas antioxidantes que intervienen en la eliminación de dichas EROs, como por ejemplo superóxido dismutasa (cantidad y actividad), midiendo los productos derivados de la oxidación, como proteínas carboniladas o estableciendo una ratio entre los niveles de distintas moléculas como el glutatión oxidado y reducido (Morillas-Ruiz, 2010).

1.7.1 *Daño a nivel lipídico e hidratos de carbono*

La peroxidación lipídica (PL) es la consecuencia de la actuación de los radicales libres sobre los lípidos: bien los constituyentes de las membranas biológicas como los presentes en las lipoproteínas plasmáticas. La oxidación de los lípidos va a depender del grado de insaturación, de tal forma que aquellos lípidos provenientes de ácidos grasos con un mayor número de dobles enlaces van a ser mucho más susceptibles de transformarse en productos oxidados afuncionales o con naturaleza radicalaria (peroxilo), formándose los denominados hidroperóxidos como el malondialdehído (MDA) de elevado carácter mutagénico y otros subproductos como el aducto 4-Hidroxinonanal (4-HNE) de menor capacidad carcinogénica, pero capaz de interferir en la transducción de señales intracelulares (Marnett, 1999). Los elementos que son utilizados frecuentemente

como marcadores de la oxidación lipídica van a ser LDL oxidadas y sus receptores, F-isoprostanos (principalmente F₂), sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), dienos conjugados, 4HNE e hidrocarburos gaseosos exhalados (Morillas-Ruiz, 2010).

La determinación y erradicación de esta afectación lipídica tiene una función primordial, pues el entorno rico en lípidos que rodea a la mama propicia la formación de varios de estos metabolitos derivados de la peroxidación, que tienen un papel aun poco establecido en la prevención y promoción de la tumorigénesis, pero de vital importancia en el desarrollo del mismo (Mencalha, Victorino, Cecchini, & Panis, 2014). La mayor complejidad de la determinación de la PL radica en la breve existencia que tienen estas moléculas en el organismo, pues rápidamente son degradadas por enzimas, además de ser moléculas muy inestables que desaparecen con suma facilidad, por lo que la recolección de la muestra y su rápido procesamiento van a jugar un papel decisivo en la obtención de resultados.

Los compuestos derivados de la PL han sido ampliamente estudiados y relacionados con el cáncer de mama, de tal forma que, el 4-HNE por ejemplo, es capaz de promover la angiogénesis e invasividad de las células tumorales a través del eje denominado SIRT3-HIF-1 α -VEGF (Li et al., 2014).

Los isoprostanos son un grupo de moléculas generadas a partir de la peroxidación lipídica provocada por los radicales libres sobre ácidos grasos esenciales como ácido araquidónico. En su caso, existe cierta controversia. Algunos estudios muestran una disminución en los niveles de isoprostanos libres en plasma en estadios iniciales del tumor (Panis, Victorino, et al., 2012), mientras que otros autores afirman que un mayor nivel de estas moléculas se asocia a un mayor riesgo de cáncer de mama, aunque este riesgo es dependiente del índice de masa corporal (IMC), siendo mayor a mayor nivel de IMC (Dai & Zhu, 2009). Algunos estudios incluso sugieren que no existe una relación entre una los niveles de isoprostanos plasmáticos y el cáncer de mama (Victorino et al., 2014). A pesar de lo anterior, la gran mayoría de los experimentos encuentran niveles de isoprostanos incrementados en orina y plasma, relacionándolos con el riesgo de padecer cáncer de mama (Il'yasova et al., 2010; Rossner et al., 2007). Algunos autores han relacionado los niveles de isoprostanos con la transformación neoplásica (Hristozov, Gadjeva, Vlaykova, & Dimitrov, 2001) y con la resistencia a determinados quimioterápicos (Conklin, 2004). Así mismo, la peroxidación lipídica en cáncer de mama se ha postulado como consecuencia de un mecanismo adaptativo de la respuesta antioxidante de estos pacientes, viéndose incrementada de forma notable y pudiendo dirigirse nuevas terapias a contrarrestar dichos efectos (C. Wang, Yu, Wang, Zhang, & Wu, 2014). Cuando los lípidos que sufren la oxidación forman parte de las membranas mitocondriales, se pueden generar alteraciones conformacionales que afecten de forma directa a la producción de energía por alteración en la fosforilación oxidativa (Halliwell B, 2006).

Existen a su vez una serie de moléculas que se han relacionado con el riesgo de padecer cáncer de mama y con la progresión de la patología. Dichas moléculas aún no se han postulado como elementos indispensables en la determinación del daño oxidativo a lípidos e hidratos de carbono, pero la creciente evidencia de su relación con el cáncer, concretamente con el cáncer de mama, hace que se posicionen como moléculas de gran

interés para el estudio del cáncer de mama. Dentro de este grupo podemos encontrar los ácidos grasos no esterificados (NEFA) y los productos finales de glicosilación avanzada (AGE). Los NEFA son aquellos ácidos grasos que circulan en plasmas libres o unidos a la albúmina. Son moléculas altamente energéticas cuya función principal es su reutilización a nivel hepático para sintetizar nuevos triglicéridos o para sufrir procesos de oxidación y obtención de energía. Al igual que sucede con los isoprostanos, la relación de los NEFA con el cáncer de mama es controvertida. Algunos estudios han encontrado una asociación inversa entre el cáncer de mama y la concentración de estas moléculas en plasma (Y. Zhang, Song, Liu, He, & Li, 2014). Otros estudios, sin embargo, demuestran que el cáncer de mama cursa con una mayor concentración de NEFA (Kleinfeld & Okada, 2005). Finalmente, algunos estudios *in vitro* han demostrado una asociación entre la concentración de NEFA y una mayor capacidad de promoción tumoral (Byon et al., 2009).

Los AGE son aductos proteicos y lipídicos que han sufrido una glicosilación no enzimática y una correspondiente oxidación tras el contacto con azúcares (R. Singh, Barden, Mori, & Beilin, 2001). La unión de estos compuestos a sus receptores específicos promueve una respuesta inflamatoria y un incremento en los niveles de estrés oxidativo. Debido a esto, estas moléculas han sido ampliamente estudiadas en patologías de carácter crónico que, por su etiología, se han relacionado con un desequilibrio redox (van Heijst, Niessen, Hoekman, & Schalkwijk, 2005). Los AGE han sido estudiados en distintos tipos de tumores, relacionándose tanto con el riesgo de sufrir la patología como con el proceso carcinogénico (Abe & Yamagishi, 2008; Grote et al., 2012), aunque se ha descrito poco sobre estos compuestos y su relación con el cáncer de mama.

1.7.2 Daño a nivel proteico

Estas macromoléculas van a ser también objetivo de las EROs, infundiéndoles un daño que va a desencadenar en muchos casos la fragmentación, agregación y susceptibilidad a la degradación proteolítica, así como una alteración conformacional de la proteína y con éstas, la pérdida de funcionalidad de la misma o su acumulación por no ser reconocida por los sistemas de degradación proteica (Droge, 2002). Estos hechos son sumamente relevantes en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas (Head et al., 2002), osteoporosis (Wu et al., 2015) o cáncer (Mehrabi, Partridge, Seffens, Yao, & Aikhionbare, 2014). En muchos casos, determinados hidratos de carbono como la glucosa van a poder sufrir procesos de autooxidación, que van a desencadenar finalmente en una serie de reacciones que van a permitir la glicosilación independiente de enzimas de determinadas proteínas, además de inducir la formación de peróxido de hidrógeno, lo que contribuye aún más a incrementar el posible daño oxidativo (Roy, Sen, & Chakraborti, 2004).

La oxidación de las proteínas es un daño difícil de cuantificar y en muchos casos se van a generar productos estables con gran capacidad de propagación de dicha alteración en el organismo, como es el caso de los radicales alcoxilos al reaccionar con determinados metales (Morillas-Ruiz, 2010). Dicha oxidación, puede conllevar la formación de hidroperóxidos, hidroxilación de grupos aromáticos y de aminoácidos alifáticos de

cadena lateral, oxidación de grupos sulfhidrilos, sulfoxidación de la metionina, cloración de grupos aromáticos y aminos primarios, carbonilación, ruptura de la cadena, nitración de residuos de aminoácidos aromáticos y formación de puentes cruzados de las cadenas peptídicas (Camps, 2010). Una de las técnicas más empleadas para la determinación del daño oxidativo asociado a las proteínas es la determinación de las proteínas carbonilo. Este tipo de proteínas han sufrido modificaciones irreparables que van a conllevar un aumento progresivo con la edad y en aquellas patologías donde ha sido asociado un componente de estrés oxidativo (Vieira et al., 2011).

Además de las proteínas carbonilo, actualmente se están posicionando nuevas técnicas de detección del daño en las proteínas, como la determinación de productos finales de oxidación proteica o AOPP. Estos AOPP son toxinas urémicas derivadas de proteínas plasmáticas que han interactuado con oxidantes clorados. Son excelentes marcadores de estrés oxidativo en patologías que cursan o son causadas como consecuencia del mismo (Capeillere-Blandin, Gausson, Descamps-Latscha, & Witko-Sarsat, 2004; Kaneda, Taguchi, Ogasawara, Aizawa, & Ohno, 2002), como por ejemplo el cáncer de mama en sus distintos estadios (Kilic, Yavuz Taslipinar, Guney, Tekin, & Onuk, 2014; Tesarova et al., 2007).

1.7.3 Daño a nivel génico:

Al igual que sucede con las macromoléculas anteriormente citadas, las EROs van a tener la capacidad, cuando se produce un desequilibrio redox continuado, de atacar al material genético celular. Generalmente, estos sistemas están bien regulados y presentan múltiples vías de reparación, que en el caso de ser insuficientes van a conllevar alteraciones graves para la célula y el organismo en general. Este daño a poder generarse de una forma directa, actuando las EROs directamente sobre el material genético mediante oxidación, metilación, desaminación y despurinización o de forma indirecta, actuando sobre otras macromoléculas que estabilizan y componen tanto al ADN como a las enzimas reparadores del mismo, mediante oxidación de sus restos catalíticos, lo que impide la escisión correcta de las secuencias de ADN afectadas (Halliwell B, 2006). De esta manera, las EROs van a poder atacar a desoxiazúcares constituyentes de las bases del ADN, generando fragmentos con capacidad mutagénica y de inactivación de enzimas como ADN polimerasas y ligasas (Hwang & Bowen, 2007). Uno de los marcadores más relevantes empleados en la valoración del daño oxidativo en ácidos nucleicos es la 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8OH). Esta molécula es un marcador de daño oxidativo producido a ácidos nucleicos plenamente aceptado y estudiado (Farhangkhoe et al., 2003; Morita, Ikeda, Haramaki, Eguchi, & Imaizumi, 2005; Rivera et al., 2006). Esta molécula se genera tras la activación de distintos mecanismos reparadores de la oxidación de bases del ADN (Kinoshita et al., 2002) y se ha podido comprobar una relación positiva entre su concentración y el cáncer de mama (Malins, Holmes, Polissar, & Gunselman, 1993; Matsui et al., 2000; Musarrat, Arezina-Wilson, & Wani, 1996; Pande et al., 2012).

1.7.3.1 Efectos mitocondriales de estrés oxidativo:

Debemos recordar que la mitocondria es uno de los orgánulos más relevantes en la producción de EROs asociadas de forma natural a un organismo, teniendo en cuenta o no efectos ambientales. De forma fisiológica es donde van a darse la mayoría de las reacciones de formación de energía y es además donde vamos a encontrar una formación de EROs muy elevada, debido a la gran influencia que el oxígeno presenta en este orgánulo. La mitocondria se caracteriza por presentar su propio genoma, localizado en la matriz mitocondrial. El hecho de estar localizado muy cerca de la membrana interna, donde tiene lugar la fosforilación oxidativa y por tanto una elevada producción de EROs le va a dotar de un complejo sistema de reparación, pero que comparado con los sistemas de reparación nuclear podría considerarse “incompleto”. Este hecho, lo hace muy susceptible al ataque de los radicales producidos por el propio funcionamiento mitocondrial.

Actualmente, está constatado que la mayoría de las células tumorales sufren una transformación metabólica para promover su supervivencia. Una de estas es conocida como "efecto Warburg" (Cairns, Harris, McCracken, & Mak, 2011), que postula que dichas células obtienen energía a través de la glucólisis y no por fosforilación oxidativa, que resultaría más eficiente. El efecto Warburg también está mediado por la proteína desacoplante-2 (UCP2). Esta proteína está sobreexpresada en tumores mamarios y una expresión ectópica de la misma desencadena una disminución del potencial de membrana mitocondrial y un aumento de las propiedades tumorigénicas (Ayyasamy et al., 2011).

Hoy en día se conoce que las células tumorales (incluidas las células tumorales de cáncer de mama) presentan las mencionadas alteraciones metabólicas, así como una serie de mutaciones en el ADN mitocondrial (Modica-Napolitano & Singh, 2004; Ramanujan, 2014). Dichas mutaciones pueden desencadenar en disfunciones mitocondriales que derivan en que las células tumorales produzcan energía por la vía glucolítica, generando intermediarios metabólicos, ATP, un estado descontrolado de crecimiento en la célula y una protección frente a la apoptosis. A esto, debemos sumarle la elevada necesidad metabólica que tienen las células tumorales, lo que conlleva de forma inherente a un aumento en las necesidades de producción energética. Dicho aumento se traduce en una mayor producción de EROs, que surgen como un subproducto de la fosforilación oxidativa mitocondrial, el metabolismo del oxígeno, y la actividad de NADPH / NADPH-oxidasa, que va a promover que la cadena de formación de radicales libres se intensifique y genere un mayor daño oxidativo que finalmente promueva la transformación celular y en última instancia a la iniciación del tumor, promoción y progresión (Yadav & Chandra, 2013).

1.7.3.2 Efectos del estrés oxidativo en el material genético nuclear:

Las EROs y principalmente los radicales libres, van a poder tener un efecto directo e indirecto sobre el ADN. Los directos se caracterizan por lesión directa del ADN (por ejemplo por actuación de radiación ionizante), mientras que el efecto indirecto se asocia a sub-productos generados por los factores de estrés (por ejemplo radicales nucleófilos de elevada afinidad por el ADN).

En un principio, las anomalías cromosómicas fueron las primeras en asociarse a estrés oxidativo, descubriéndose que los cromosomas podían verse afectados a través de roturas, deleciones y translocaciones, generando diversas patologías con distintos grados de severidad. Posteriormente, se pudo observar cómo estos radicales eran capaces de afectar no sólo a la estructura más compleja del ADN, sino que podían infligir daño a nivel de la propia molécula, induciendo alteraciones puntuales de ADN, en su mayoría transversión, translesión y roturas de cadena (Ziech, Franco, Pappa, & Panayiotidis, 2011).

Las principales alteraciones que los radicales libres pueden llevar a cabo en el ADN directamente se basan en la modificación de las bases nitrogenadas que componen su estructura. Básicamente podrían diferenciarse cuatro niveles (Lord & Ashworth, 2012; Milanowska et al., 2011):

- Oxidación: Promueve la generación de uno de los marcadores de oxidación del ADN más importantes: la 8-Oxo-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG). Además, se generan otras moléculas de oxidación como 5-hidroxicitosina, glicol de timidina. Este nivel de alteraciones del ADN son generadas principalmente por el radical hidroxilo. Éste es capaz de intercalarse entre los dobles enlaces de las bases, promoviendo la formación de radicales altamente inestables capaces de reaccionar con otros componentes del ADN. Debemos destacar aquellas alteraciones conformacionales que pueden generar estos compuestos. La 8-oxo-dG, produciendo la separación de las dos hebras del ADN y afectando así a los procesos normales de replicación y transcripción. Así mismo, los residuos de glicol de timidina interfieren en la replicación un nucleótido antes y uno después del lugar donde se produce el daño.
- Alquilación: Da lugar a la formación de 3-metiladenina y 7-metilguanina.
- Desaminación: Induce la formación de hipoxantina a partir de la adenina y timina a partir 5-metilcitosina. Se pueden además generar moléculas de uracilo en la molécula de ADN por desaminación de citosina, correlacionándose este con deleciones de longitudes intermedia y elevada.

Existen a su vez múltiples sistemas de reparación de estos daños. En muchos casos, los propios sistemas se inician una vez es detectada la lesión, por lo que se ponen en marcha diversos mecanismos que permitan la corrección del mismo en función del tipo y gravedad del error cometido o el daño generado. Estos sistemas tienen la capacidad de interaccionar con el ciclo celular, pudiendo incluso detenerlo para llevar a cabo una adecuada corrección del ADN. Cuando un daño oxidativo permanece en el tiempo y la capacidad de estos sistemas no es suficiente para su completa reparación, se puede generar la activación o paralización de la transcripción y rutas de señalización intracelular, así como fallos en la replicación que finalmente conducen a una inestabilidad génica, considerada como uno de los marcadores de desarrollo tumoral (Douglas Hanahan & Weinberg, 2011; James E. Klaunig & Kamendulis, 2004; M. Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic, & Mazur, 2006). Generalmente, cuando hay una elevada tasa de daño en el ADN, la célula inicia la activación de determinados mecanismos que finalmente cursen con la muerte celular, impidiendo así la propagación de dicho daño y manteniendo la

supervivencia del organismo. En muchos casos, estos sistemas, debido a una acumulación de errores y mutaciones en el ADN, no son capaces de llevarse a cabo, generando patologías como el cáncer. Como ejemplo para el cáncer de mama, existen mutaciones y polimorfismos en genes específicos, como los oncogenes BRCA1, BRCA2 (implicados principalmente en la reparación del ADN y mantenimiento del genoma) y PIF1 en cáncer de mama (Lord & Ashworth, 2012), aunque la gran mayoría ocurren de forma completamente esporádica y acompañados de factores epigenéticos como los descritos al inicio de estos antecedentes.

El hecho real es que se ha demostrado que el estrés oxidativo es capaz de generar alteraciones tanto en cromosomas como las moléculas de ADN, algo que lo ha convertido en objeto de estudio para tratar de erradicar o prevenir dichas consecuencias.

1.8 *Estrés oxidativo y cáncer de mama*

El cáncer de mama, al igual que otros tipos de carcinogénesis, se caracteriza por ser un fenómeno que requiere múltiples pasos capaces de generar la transformación de una única célula sana en células malignas. Este complejo proceso requiere de la acción de uno o más agentes capaces de causar alteraciones genéticas, moleculares y del estado celular normal. Entre estos causantes, podemos incluir contaminantes ambientales, dieta, estado físico de la persona...o las ya mencionadas EROs (Guyton & Kensler, 1993), que a su vez pueden depender de todos los factores anteriormente citados. El desarrollo de la carcinogénesis puede categorizarse en al menos tres grandes etapas (figura 10) denominadas iniciación, promoción y progresión (James E. Klaunig, Kamendulis, & Hocevar, 2010; Sander, Chang, Hamm, Elsner, & Thiele, 2004).

Es en la década de los 80 donde aparecen los primeros estudios que demuestran una relación existente entre las EROs y la aparición de tumores o su relación con las mismas (Bartoli, Giannattasio, Palozza, & Cittadini, 1988; Pavri, Gupta, Baxi, & Advani, 1983; Zimmerman & Cerutti, 1984), de tal forma que es a partir de este momento es donde se genera un punto de inflexión en el enfoque y estudio de las posibles causas de aparición del cáncer y su tratamiento, derivando finalmente en la batalla actual de la investigación que nos ha llevado al estudio de múltiples rutas celulares, moléculas implicadas o compuestos capaces de prevenir y tratar dichas patologías o sus consecuencias a través de la modulación del estrés oxidativo.

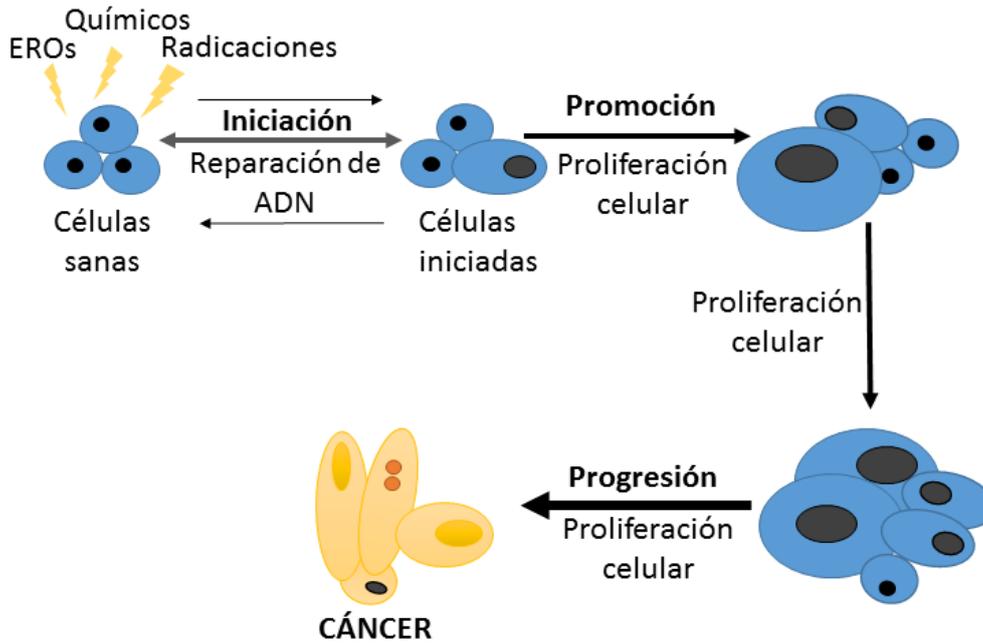


Figura 10. Teoría de la transformación celular: desde una célula sana hasta la derivación final en cáncer

Por todo lo descrito anteriormente, muchos estudios llevados a cabo tanto en células como en animales han tratado de elucidar a través de qué mecanismos el estrés oxidativo es capaz de modular la respuesta de una célula sana hasta su transformación final como célula tumoral, obteniendo en su mayoría una teoría compleja que se inclina positivamente hacia el reconocimiento de que tanto por desequilibrios en la respuesta antioxidante como por un aumento exacerbado de las EROs, las células son capaces de transformarse en células iniciadas y malignas que finalmente terminan progresando hasta la aparición de cáncer (Chu et al., 2004; Hwang & Bowen, 2007; Ishii et al., 1996; Neumann et al., 2003; Nourazarian, Kangari, & Salmaninejad, 2014; Sentman et al., 2006), a través de alteraciones e inestabilidades genéticas a través de intermediarios en señales mitogénicas y de supervivencia, receptores de factores de crecimiento y moléculas de adhesión, promoción de la movilidad celular e inducción de angiogénesis en torno al tumor (Rios-Arrabal et al., 2013).

1.8.1 Iniciación

En esta fase se acumulan en la célula sana mutaciones no letales. Aquí, los radicales libres, entre otras causas, intervienen generando daño en el ADN directa o indirectamente y aberraciones cromosómicas, lo que lleva a una transformación celular, bien a través de la producción de RLs o a través de sus efectos sobre otras macromoléculas (Jackson & Loeb, 2001). Incluso, estas alteraciones pueden darse por inducción de una respuesta inflamatoria crónica capaz a su vez de incrementar la secreción de factores de crecimiento y proteasas que actúen directa o indirectamente la división celular (Valdespino-Gómez & Valdespino-Castillo, 2011). Por tanto, los radicales libres contribuyen a la mutagénesis necesaria para la iniciación del proceso oncogénico, generando la inestabilidad genómica

requerida para la transformación celular. Estas pequeñas mutaciones no letales son capaces de transformar un proto-oncogén en oncogén (Tabin et al., 1982), lo que puede llevar finalmente a la alteración en la regulación de determinadas vías de señalización intracelular asociadas al control de la proliferación celular, la interrupción de la comunicación intercelular, desarrollo y diferenciación (Devi, 2004). Así mismo, existe una serie de genes denominados genes supresores de tumores cuya principal función es antagonista de los oncogenes. Mutaciones en oncogenes y genes supresores desencadenan efectos finales similares promoviendo la proliferación celular y por tanto el desarrollo tumoral (D. Hanahan & Weinberg, 2000; Douglas Hanahan & Weinberg, 2011).

1.8.2 Promoción

En esta fase tiene lugar la expansión clonal de las células iniciadas a través de la inducción de la proliferación celular y/o inhibición de la apoptosis. El resultado es una lesión identificable que forma el tumor primario. Para que este proceso tenga lugar, pueden ser necesarias una o varias etapas de exposición repetidas y prolongadas de la célula a aquellos estímulos que la promueven, tanto de carácter interno como externo (Devi, 2004). En este punto, al igual que sucede con la fase de iniciación, las EROs van a desempeñar una función relevante para la continuación de esta fase, de forma que una continuación repetida y prolongada del efecto de los mismos sobre las células ya iniciadas promueve finalmente a un aumento potencial de crecimiento celular y en el desacoplamiento de los procesos de comunicación intercelular que limitan la autonomía de la célula (J. Trosko, Chang, Madhukar, & Dupont, 1995). Las EROs pueden además interaccionar modificando los sistemas de segundos mensajeros o actuando como tal, propiciando un aumento en la proliferación celular o una disminución en la apoptosis de la población celular iniciada (J. E. Klaunig, Wang, Pu, & Zhou, 2011), así como interaccionar con ciertas rutas de señalización, contribuyendo al desarrollo de tumores a través de la regulación de la proliferación celular, la angiogénesis y la metástasis (Storz, 2005). Algunas de las vías de señalización más importantes que pueden verse modificadas por estas EROs son las vías de la proteína quinasa mitógeno activada (MAPK)/AP-1 (proteína activadora 1) y el Factor Nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) (Muller, Cahill, Rupec, Baeuerle, & Nordheim, 1997; Marian Valko et al., 2007), así como p53 o el factor HIF 1 (factor inducible por hipoxia 1), relacionado con la vascularización del tumor, activación de la transcripción de proto-oncogenes, enzimas glicolíticas y metástasis (Chandel et al., 2000; Gorlach, 2009; Reuter, Gupta, Chaturvedi, & Aggarwal, 2010).

Así mismo, se ha podido observar cómo pequeñas concentraciones de peróxido de hidrógeno eran capaces de estimular la proliferación celular cuando se empleaba a dosis de 1 μ M por actuar como segundo mensajero en diversos tipos de líneas celulares (Stone & Yang, 2006), pudiendo corroborarse su relación con una estimulación directa o indirecta de vías relacionadas con el crecimiento celular tales como MAPK p38, p70S6K y p90Rsk, fosfolipasa D, JAK/STAT, y JNK y ERK (Hecht et al., 2016).

AP-1 (compuesta por c-Fos y c-Jun) ha sido asociada con la estimulación de la proliferación celular y por tanto con el proceso oncogénico. Su activación a través de estas EROs se debe principalmente a la activación de las rutas donde intervienen las

quinasas JNK (Hsu, Young, Cmarik, & Colburn, 2000) y p38 (a través de ASK1) (Nagai, Noguchi, Takeda, & Ichijo, 2007). Además, actúa como regulador de la ciclina D1 e inhibidor de p21 (promoviendo la proliferación celular) (J. E. Klaunig et al., 2011).

NF- κ B se une a las zonas κ B del ADN, activando la expresión múltiples genes implicados en diferenciación y proliferación celular entre otros, como ciclina D1, Bcl-2 o VEGF, promoviendo la vascularización tumoral y ejerciendo un efecto antiapoptótico (Marian Valko et al., 2007).

Como se puede comprobar, son muchas las vías a través de las cuales, las EROs son capaces de influir en esta etapa de promoción del cáncer. Tal es así, que Shacter et al. (Shacter, Williams, Hinson, Senturker, & Lee, 2000) propusieron que otro de los puntos críticos relacionado con la apoptosis sobre el que dichas moléculas y sus derivados pueden actuar es a nivel de caspasas, donde presentan la capacidad de unirse fuertemente a residuos de cisteína del centro activo de estas y a CD95/Fas inhibiendo así la apoptosis.

1.8.2.1 Receptores de factores de crecimiento y citoquinas

Entre los componentes de este grupo destacan el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Cada una de estas moléculas tiene la capacidad de unirse a sus receptores con actividad tirosín-quinasa, generando tras la interacción ligando-receptor un aumento en la producción de determinadas EROs como por ejemplo peróxido de hidrógeno o radical superóxido, gracias a la actuación de NADPH oxidasa mediada por Rac1. Esto promueve la autofosforilación del receptor y la activación de la cascada de señalización intracelular.

Como se ha comentado en apartados anteriores, la promoción del proceso carcinogénico necesita la intervención de una serie de factores capaces de mantener la hiper proliferación de las células ya iniciadas. Son muchos los factores de crecimiento y citoquinas que presentan dicho potencial a través de su unión a receptores transmembrana, promoviendo la producción de EROs y ampliando así su acción estimulante del proceso carcinogénico tanto extra como intracelularmente (Droge, 2002; Marian Valko et al., 2007).

Además, otras citoquinas e interferones como TNF- α , la IL-1 o Interferón- γ , van a promover la formación de EROs a través de modulación de determinadas vías de señalización intracelular, una vez éstos se hayan unido a determinados receptores transmembrana. Dröge, 2002 y Valko y col, 2007, demostraron la existencia de numerosos factores de crecimiento y citoquinas que activan la producción de RLs en la célula y sugieren una relación cooperativa entre sus receptores para amplificar la señal intracelular como el receptor de la angiotensina II y el receptor de EGF, pues la unión de la angiotensina II a su receptor da lugar a la transactivación mediada por ERO del receptor de EGF (Droge, 2002; Marian Valko et al., 2007).

En muchos casos, se ha descrito que una exposición a peróxido de hidrógeno a concentraciones superiores a 1mM va a tener como consecuencia la fosforilación de numerosas proteínas intervinientes en la cascada de fosforilación intracelular. Entre estas, encontramos algunos ejemplos con tirosin-fosfatasa, cuya fosforilación conduce de

forma inexorable a la inactivación de dicha proteína y por tanto a una inhibición de su función antagonista de las tirosin-quinazas descritas anteriormente, aunque está descrito que este efecto depende mucho de la concentración de RLs intracelulares (Droge, 2002). Este fenómeno resultaría finalmente como una activación de los receptores anteriormente citados puesto que las tirosin-fosfatasas una vez inactivas no van a devolverle la conformación original al receptor, suponiendo esto efectos similares sobre el proceso carcinogénico (M. Valko et al., 2006).

1.8.2.2 Proteínas quinazas citoplasmáticas

Las proteínas quinazas citoplasmáticas forman parte de las cascadas moleculares de transducción de la información hacia el núcleo. Algunas de las proteínas pertenecientes a esta familia ya han sido descritas previamente en distintos procesos y mecanismos involucrados con la promoción tumoral como pueden ser las proteínas Src, JAK o MAPK. Éstas se activan a través de fosforilación de residuos tirosina, serina o treonina de su centro activo en respuesta a la activación de receptores de factores de crecimiento, citoquinas y proteínas G heterodiméricas. La activación de dichos receptores va a permitir la traslocación de la información hasta el núcleo gracias a la actuación de las tirosina-quinazas, que producen fosforilaciones seriadas hasta alcanzar a factores de transcripción que alcanzan al núcleo y activan la expresión de genes implicados en la proliferación, diferenciación celular y apoptosis. Diversos estudios muestran cómo los RLs van a potenciar la actividad catalítica de estas enzimas de forma similar a la descrita previamente sobre las tirosina-fosfatasas, debiendo así reseñar la activación de las 3 rutas de señalización intracelular en las que intervienen MAPKs mediada por EROs: ERKs, JNK y p38. Los estudios de activación de las MAPKs llevados a cabo por Dröge, 2002 y Laurent y col. en 2005 (Droge, 2002; Laurent et al., 2005) muestran que tal efecto es dependiente del tipo y origen del que provenga el estímulo, pues pudo demostrarse cómo el peróxido de hidrógeno endógeno es capaz de promover un incremento de actividad de ERK, mientras que el aportado exógenamente incrementa la actividad de p38.

Además de la activación de quinazas a través de la inhibición de tirosina-fosfatasas, se ha comprobado como un gran incremento en las EROs van movilizar los depósitos de calcio intracelular, hecho que desencadena y promueve la activación de quinazas como PKC (*protein kinase C*), esencial para el desarrollo carcinogénico (M. Valko et al., 2006).

1.8.3 *Progresión*

Esta etapa se considera la última en este modelo carcinogénico. Se caracteriza por una serie de cambios celulares y moleculares irreversibles que dotan a las células de un fenotipo transformado, íntimamente ligado a un desarrollo tumoral maligno. Durante este proceso, las células neoplásicas desarrollan la capacidad de inducir angiogénesis, proceso imprescindible para el crecimiento tumoral. En aquellos tumores donde el crecimiento ha sido muy extenso, se ha observado un aumento muy importante en la proliferación celular. Ese crecimiento exacerbado lleva a una hipoxia en el núcleo de la masa tumoral, hecho que conlleva una liberación local de factores proangiogénicos que activan progenitores y células endoteliales vasculares a incrementar su proliferación, promoviendo la

neovascularización (Hecht et al., 2016). A partir de la generación de estos nuevos capilares, la masa tumoral, ampliamente formada, es capaz de incorporar una mayor tasa de oxígeno y nutrientes a las células conformantes, permitiéndole así el crecimiento tumoral (Douglas Hanahan & Weinberg, 2011). Durante todo este proceso, las EROs van a jugar un papel fundamental a distintos niveles en la consecución de esta fase.

La angiogénesis es un proceso multifásico que comprende la degradación de la membrana basal del endotelio vascular, la migración de células endoteliales al estroma perivascular y la formación de nuevos capilares. A través de este proceso, las células tumorales localizadas en fases avanzadas del proceso carcinogénico van a adquirir una capacidad migratoria, pudiendo colonizar y comenzar de nuevo su expansión en tejidos tanto periféricos como diseminados del organismo a través de su salida al torrente sanguíneo y linfático. Para que se produzca una propagación metastásica del tumor es sumamente importante que se dé un crecimiento en la red vascular que envuelve a dicho tumor. A los procesos por los cuales se generan nuevos vasos sanguíneos y linfáticos se les denomina como angiogénesis y linfangiogénesis, respectivamente. Ambos procesos van a presentar un papel esencial en la generación de la nueva red vascular empleada por el propio tumor para el suministro de nutrientes, oxígeno, células inmunitarias y para eliminar productos de desecho (Folkman, 1971).

Cambios en la adhesión celular, la migración, y la degradación de proteínas de matriz extracelular son críticas en el proceso de invasión tumoral (Hecht et al., 2016). Durante ésta, las células transformadas interactúan con las células estromales adyacentes rompiendo la estructura estromal compuesta por polisacáridos y proteínas, permitiendo la migración celular. Las células endoteliales comienzan a dividirse a medida que migran a los tejidos circundantes y se organizan rápidamente en forma de cilindros huecos que evolucionan gradualmente en una red madura de vasos sanguíneos con la ayuda de un factor de adhesión, tales como integrina α o β (Mizejewski, 1999; Nelson, Fingleton, Rothenberg, & Matrisian, 2000). Este fenómeno se encuentra catalizado por enzimas denominadas metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Estas enzimas no sólo van a promover la degradación de dicha matriz, sino que interfieren en la liberación de determinados compuestos proangiogénicos, muchos de los cuales se verán a continuación. Dichos compuestos, tras la unión a sus receptores en las células endoteliales promoverán la proliferación celular, la expresión de moléculas de adhesión, la secreción de MMPs, la migración y la invasión progresión (Marian Valko et al., 2007).

Determinados estudios han comprobado cómo NOX-1, derivado de las EROs, es capaz de promover una regulación positiva de VEGF y sus receptores, y un incremento en la actividad de las MMPs, favoreciendo la migración celular y promoviendo el denominado cambio angiogénico en fibroblastos (Arbiser et al., 2002).

En estudios llevados a cabo sobre la asociación entre las MMPs y el cáncer de mama se puede observar una asociación positiva entre pronóstico de metástasis y expresión de la MMP2. En el estudio llevado a cabo por Brown y Bicknell en 2001 (Brown & Bicknell, 2001), se pudo observar como las EROs activaban a MMP-2 y se asociaba con una posible reacción con los grupos -SH del centro activo.

Trosko y col (J. E. Trosko, Chang, Upham, & Tai, 2005), proponen que las células neoplásicas tienen además la capacidad de inhibir unas estructuras denominadas GAP, caracterizadas por ser unos hexámeros de conexina que unen células adyacentes y permiten el intercambio de diferentes compuestos como iones y moléculas inferiores a 1000 Daltons. Éste fenómeno lo llevan a cabo a través de la destrucción de las conexiones GAP por efecto de RLs liberados por las células neoplásicas sobre el gen que codifica dichas proteínas, inhibiendo su formación, hecho que limita la acción de los reguladores de la proliferación y crea un microambiente en el que las células transformadas escapan a la homeostasis celular y favorecen su expansión.

Además de lo descrito anteriormente, en esta fase se ha podido observar que determinadas proteínas implicadas en las vías de proliferación, tales como RAS, AKT y ERK, también están involucradas en la remodelación del citoesqueleto y la capacidad migratoria y, como se ha reseñado en apartados anteriores, éstas vías son moduladas por el estado redox de la célula, lo que dota a las EROs de un papel fundamental en el desarrollo y promoción de esta fase (Sosa et al., 2013).

En los últimos años se ha fijado el punto de mira sobre más de una docena de moléculas implicadas en el desarrollo de este proceso tales como VEGF (a través de la estabilización de HIF1- α y EROs derivadas de NOX-1), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento transformante angiogénico (TGF)- α , TGF- β , TNF- α , factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PDGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento placentario, IL-8, factor de crecimiento de hepatocitos o el factor de crecimiento epidérmico (Arbiser et al., 2002; Hecht et al., 2016; Nishida, Yano, Nishida, Kamura, & Kojiro, 2006). Gracias a estas asociaciones, se han propuesto como dianas terapéuticas la estimulación de determinadas moléculas implicadas en la inhibición de la angiogénesis o el uso de determinados fármacos capaces de actuar como inhibidores de la angiogénesis, que permitan por ende la reducción de la morbimortalidad.

En conjunto, estos datos indicarían que el efecto neto de los radicales libres dependerá de la cantidad en que son producidas o están presentes, así como de la actividad de los distintos sistemas y moléculas antioxidantes, la eficiencia de los sistemas de reparación del ADN y la influencia de estas sustancias en las rutas de señalización intracelular. Por tanto, la aparente inconsistencia entre la actividad pro-carcinogénica de los radicales libres y sus efectos promotores de la apoptosis indicarían que es un fenómeno multifactorial y dosis-dependiente cuyo resultado no deriva simplemente de su capacidad de inducir directamente modificaciones químicas en el ADN, tanto en el compartimento nuclear como en el mitocondrial, sino que afectan a otros procesos celulares que contribuyen a la expresión del fenotipo transformado (Halliwell, 2007).

En general, existen suficientes datos para afirmar que las células tumorales favorecen la producción de radicales libres y que el aumento de su concentración activa tanto las defensas antioxidantes como los sistemas de reparación del ADN, aunque no en un orden de magnitud suficiente para contrarrestar dicho exceso. Sin embargo, el desplazamiento del balance oxidativo hacia el estado oxidado en las lesiones tumorales no es descontrolado, pues un exceso de radicales libres inhibiría el crecimiento celular y activaría la muerte celular por apoptosis o necrosis.

1.9 *Hidroxitirosol:*

El hidroxitirosol (HT) es la molécula utilizada en este ensayo clínico como suplemento a la terapia neoadyuvante que reciben las pacientes del estudio.

1.9.1 *¿Qué es y de dónde proviene el HT?*

El HT es un polifenol de estructura fenetil alcoholica, también denominado 3,4 dihidroxifeniletanol (figura 11). Éste forma parte de la fracción minoritaria del aceite de oliva virgen extra. Debido a la naturaleza de este elemento, se han realizado numerosos estudios con HT aislado y con diferentes aceites de oliva (AO) enriquecidos. Éstos han demostrado su actividad como antioxidante, anti-inflamatorio y antiaterogénico, así como su papel en la prevención y modulación de diferentes enfermedades como el cáncer y su relación con la expresión de proteínas específicas implicadas en dichas patologías (Bernini, Merendino, Romani, & Velotti, 2013; S. Granados-Principal et al., 2014; Ramirez-Tortose MC, 2014; Rodriguez-Morato et al., 2015). Otros estudios se han centrado en sus actividades antimicrobianas y dermatológicas. Todos estos hallazgos han permitido postular su papel como nutracéutico en la prevención y el tratamiento de algunas patologías reseñadas.

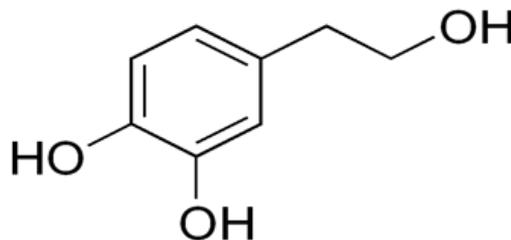


Figura 11. Estructura del Hidroxitirosol

HT proviene de la hidrólisis de la oleuropeína y tiene lugar durante la maduración de las aceitunas, almacenamiento del aceite y la elaboración de aceitunas de mesa (Charoenprasert & Mitchell, 2012). Durante el procesamiento del aceite, se obtienen diferentes compuestos como el orujo, alpechín y el propio aceite de oliva. Todas estas fracciones son ricas en componentes fenólicos; incluyendo HT, que se va a localizar en la fracción soluble del AO. Este compuesto tiene un carácter anfipático y por lo tanto, se puede identificar en cualquiera de las fracciones anteriormente comentadas en su forma libre, como derivados de acetato o como una parte de los compuestos más complejos como oleacein, verbascosida y oleuropeína (Boskou, 2008) (figura 12).

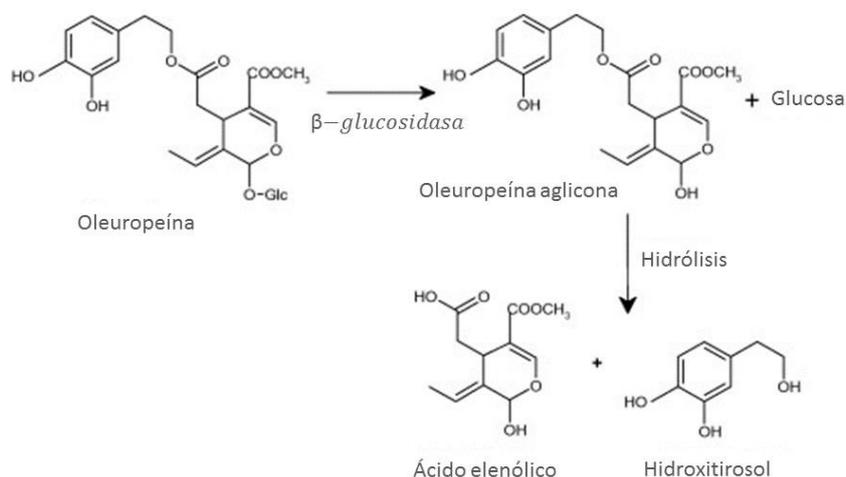


Figura 12. Formación de Hidroxitirosol

Desde hace una década, se ha comprobado que el HT está presente en el vino; tanto tinto como blanco, pero a una concentración mucho mayor en el primero (Fernández-Mar, Mateos, García-Parrilla, Puertas, & Cantos-Villar, 2012; M^a del Carmen Ramirez-Tortose, 2014; Minuti, Pellegrino, & Tesei, 2006), más aun cuando el vino ha sido envejecido. Las concentraciones promedio establecidas en la bibliografía (Fernández-Mar et al., 2012; Godoy-Caballero, Acedo-Valenzuela, & Galeano-Diaz, 2012; Granados-Principal, Quiles, Ramirez-Tortosa, Sanchez-Rovira, & Ramirez-Tortosa, 2010; Minuti et al., 2006; Quirantes-Pine et al., 2013; Warleta et al., 2011) para los distintos tipos de vinos, aceite oliva virgen y hojas del olivo quedan recogidas en la tabla 4.

Tabla 4. Concentración de Hidroxitirosol en vino, aceite y hoja de olivo

Producto	Contenido en hidroxitirosol
Vino blanco	1,50 a 2,70 mg/l
Vino tinto	2 a 3,9 mg/l
Vino tinto envejecido	25 mg/l
Aceite oliva virgen	9 a 21 mg/Kg
Hojas de olivo	10 a 17 g/Kg

Desde hace algunos años se está tratando de descubrir nuevas formas de HT para mejorar sus características relacionadas con los procesos ADME, mejorando así su estabilidad y potenciando sus efectos. Esta modulación, producida a nivel molecular, se debe al hecho de que el HT tiene propiedades muy relevantes para la preservación de la salud, hecho que ha llevado a la industria a buscar metabolitos más estables, bien sintetizados de nuevo o bien obtenidos a partir de derivados naturales más activos, con una mejor biodisponibilidad y una vida media mayor. Incluso se han desarrollado profármacos que liberan el compuesto una vez absorbido, potenciando así su actividad (Mateos et al., 2011). Algunas de las modificaciones llevadas a cabo sobre esta molécula han sido reformulaciones en forma de ésteres, alquil éter, tioderivados, derivados de isocromano o alteraciones en su estructura natural (Bernini, Gilardini Montani,

Merendino, Romani, & Velotti, 2015; Calderon-Montano et al., 2013; Trujillo et al., 2014).

El tirosol (Ty) es otro compuesto con actividades similares (antioxidante, antiagregante plaquetario o como antiinflamatorio), pero con menor actividad respecto al HT. La relación entre el HT y Ty en el AO es de aproximadamente el doble, aunque ésta depende del origen de AO, condiciones, área de crecimiento y del método de producción de AO (Granados-Principal et al., 2010; Owen et al., 2000). La única diferencia entre Ty y HT radica en un grupo hidroxilo que aparece en HT pero no en Ty, algo que dota al HT, con su estructura de catecol, de un potencial antioxidante muy superior al Ty (Cornwell & Ma, 2008).

1.9.2 *Procesos ADME del HT*

Los compuestos fenólicos hidrófilos de AO son absorbidos de forma dosis-dependiente (Granados-Principal et al., 2010; Rubio et al., 2012; Visioli et al., 2000) y todos ellos (HT incluido) tienen una fuerte fase de metabolismo I, donde se hidrolizan, y fase II, donde se generan sus derivados glucuronizados, metilados y sulfatados, con el fin de facilitar su absorción (Manach, Scalbert, Morand, Remesy, & Jimenez, 2004; Suarez et al., 2011).

1.9.2.1 Absorción del HT

La absorción de HT tiene lugar en el intestino delgado y el colon por difusión pasiva bidireccional con una absorción promedio de 66% con respecto a la cantidad total de ellos (Manna et al., 2000; Vissers, Zock, Roodenburg, Leenen, & Katan, 2002). Ésta absorción es rápida, alcanzando su concentración plasmática máxima a los 5-10 minutos después de la ingesta, seguido de un rápido declive.

La absorción de HT varía según el vehículo empleado, oscilando entre el 75 y 99%, siendo más baja en vehículos acuosos, aunque algunos autores han podido encontrarlo en proporciones mucho mayores en orina cuando es administrado en forma de vino tinto, quizás favorecido por el etanol y sus interacciones con vías endógenas de la dopamina (de la Torre, Covas, Pujadas, Fito, & Farre, 2006). Estudios posteriores han demostrado que cuando se administra HT con etanol, el metabolismo de la dopamina varía y se forma preferentemente HT en lugar de DOPAC (ácido 3,4-dihidroxifenilacético), aumentando por este hecho su excreción urinaria y no como consecuencia de una mayor concentración en el vino tinto (Perez-Mana et al., 2015). Su biodisponibilidad puede verse afectada, no solo por el vehículo de administración, sino por factores tales como la edad, el sexo y el estado hormonal (de Bock, Thorstensen, et al., 2013; Roowi, Mullen, Edwards, & Crozier, 2009). Finalmente, una vez absorbido, el HT se une rápidamente a lipoproteínas de alta densidad circulantes, ejerciendo su efecto antioxidante sobre estas moléculas, promoviendo así su efecto cardioprotector (Fernandez-Avila et al., 2015).

1.9.2.2 Distribución del HT en el organismo

El HT tiene una vida media plasmática de 1-2 minutos. Una vez distribuido, se puede encontrar en varios tejidos como músculo, hígado (Serra et al., 2012) o cerebro (por su capacidad de atravesar la BHE). Esta localización puede explicar su interacción con las vías dopaminérgicas y su acción neuroprotectora (Schaffer, Muller, & Eckert, 2010), que ejerce principalmente a través su actividad antioxidante a nivel cerebral (Hashimoto et al., 2004). Mayoritariamente se va a localizar en el riñón, razón por la que se puede deducir su principal vía de eliminación (D'Angelo et al., 2001). A pesar de que se han llevado a cabo muchos estudios para comprender su biodisponibilidad, no es posible obtener una evaluación completa de ésta pues existen evidencias de que es un metabolito de la dopamina, lo que dificulta el conocimiento de si son fuentes endógenas o exógenas (de la Torre, 2008; de la Torre et al., 2006). Algunos autores han sugerido, a diferencia de lo establecido anteriormente, que su máximo de concentración plasmática se alcanza entre los 30 minutos y las 2 horas (Dominguez-Perles, Aunon, Ferreres, & Gil-Izquierdo, 2015).

1.9.2.3 Metabolismo del HT

El primer paso metabólico tiene lugar en los enterocitos y posteriormente en el hígado (D'Angelo et al., 2001). En el plasma podemos localizar, HT libre, sus derivados de orto-metilo (alcohol y ácido homovanílico), derivados de glucurónidos y sus conjugados glutationil, así como derivados sulfoconjugados (Rubio et al., 2012; Tuck, Hayball, & Stupans, 2002). Todas estas modificaciones le van a dotar de la actividad propia del compuesto.

El proceso metabólico (figura 13) puede esquematizarse en tres procesos (D'Angelo et al., 2001):

- 1) Oxidación: a través de la alcohol deshidrogenasa y enzimas deshidrogenasa aldehído, dando lugar a ácido dihidroxifenilacético.
- 2) La metilación: Se realiza por la enzima catecol-o-metiltransferasa (COMT), que produce el alcohol homovanílico.
- 3) La metilación-oxidación: una reacción que ocurre para formar ácido homovanílico.

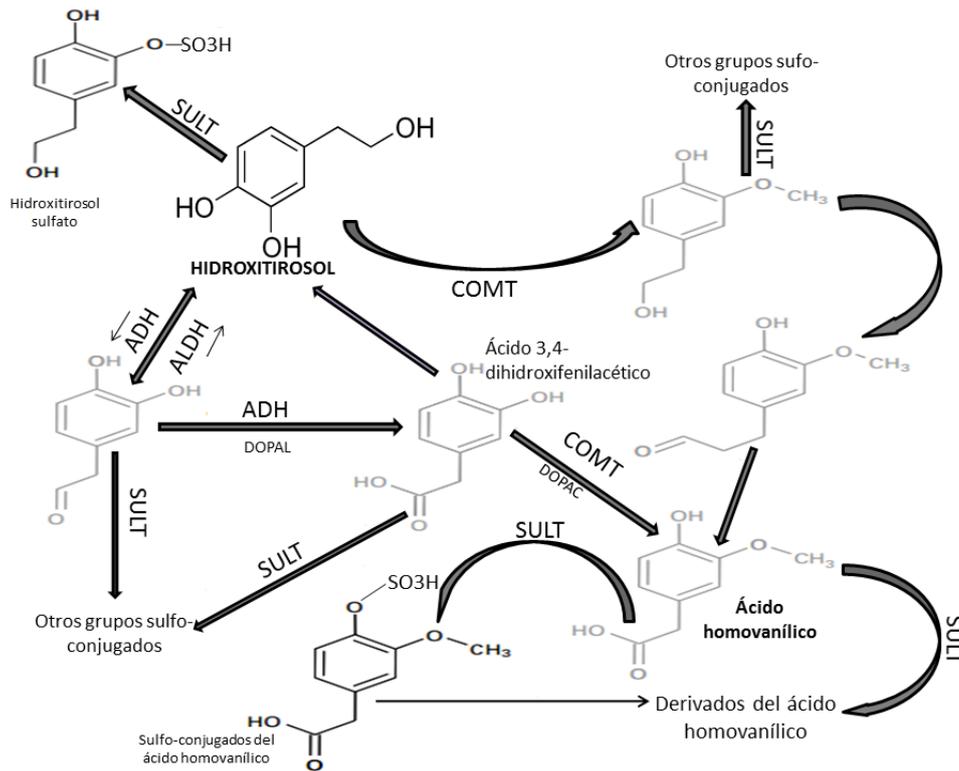


Figura 13. Procesos de transformación del Hidroxitirosol en el organismo

1.9.2.4 Eliminación del HT

Las vías de eliminación del HT son diferentes en función de su origen, las vías metabólicas que tengan lugar, si la administración es en humanos o animales o del vehículo empleado (Visioli et al., 2003). Dado que la mayor acumulación la encontramos en el riñón, es fácil deducir que su vía mayoritaria de eliminación va a ser la vía renal, de forma conjugada. El tiempo requerido para que el HT y sus metabolitos sean totalmente eliminados es aproximadamente 6 h en los seres humanos (Rubio et al., 2012; Suarez et al., 2011).

1.9.2.5 Toxicidad del HT

En términos de toxicidad y perfil de seguridad, el HT ha sido investigado como parte del AO, alpechín y extractos del mismo, midiéndose toxicidad aguda, teratogénesis, mortalidad, morbilidad o efectos mutagénicos, sin encontrar efectos tóxicos tanto *in vitro* como *in vivo*, incluso a dosis de hasta 3,5g/Kg en animales (Aunon-Calles, Canut, & Visioli, 2013; Christian et al., 2004; Soni, Burdock, Christian, Bitler, & Crea, 2006). Los últimos estudios que analizan la toxicidad asociada al HT, se llevaron a cabo en modelos animales, a los que se les administró HT a dosis crecientes, alcanzando una dosis de 500mg/kg/día sin observar efectos relevantes asociados al HT (Heilman et al., 2015; Kirkland, Edwards, Woehrle, & Beilstein, 2015). Desde 2011, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria recomienda un consumo de 5 mg de HT, en sus distintas formas

de administración posibles, para obtener un efecto cardioprotector a consecuencia de la disminución de oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Según esta institución, la dosis diaria recomendada para obtener estos efectos, de forma inocua, oscila entre los 5 y 15 mg de HT.

1.9.3 Principales actividades del HT

1.9.3.1 Actividad antimicrobiana:

Los extractos de las hojas de olivo tienen actividad antimicrobiana frente *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Kluyveromyces marxianus*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus mutans*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica* (Medina, de Castro, Romero, & Brenes, 2006), algo conocido desde hace siglos y civilizaciones como la egipcia y romana ya empleaban dichos extractos de hojas de olivo en soluciones, jabones o ungüentos. Posteriormente, la actividad antimicrobiana de las hojas del olivo se asociaron en gran medida al HT (Medina, Brenes, Romero, Garcia, & de Castro, 2007).

El HT, *in vitro*, actúa frente a agentes infecciosos de vías respiratorias y tracto gastrointestinal como *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, o *Moraxella catarrhalis*, en concentraciones incluso inferiores a las utilizadas con antibióticos tales como ampicilina (Bisignano et al., 1999). Se ha comprobado incluso efectos antiparasitarios frente a algunos tipos de *Leishmania* spp. (Kyriazis, Aligiannis, Polychronopoulos, Skaltsounis, & Dotsika, 2013). Frente a *Staphylococcus aureus*, el HT ha demostrado ejercer un papel importante en la prevención y tratamiento de infecciones nosocomiales a través de la disminución de las EROs generadas en *biofilms* adheridos a dispositivos médicos y heridas crónicas (Crisante et al., 2015).

1.9.3.2 HT como erradicador de las EROs y su implicación cardiovascular

El HT y sus metabolitos presentan una capacidad de eliminación de radicales en células de la piel a través de vías de captación de los mismos, disminuyendo así los efectos perjudiciales producidos por ejemplo por la radiación UV. Además son capaces de reducir significativamente las roturas de la cadena de ADN causadas por los rayos UVB (Zwane, Parker, Kudanga, Davids, & Burton, 2012). El HT tiene una alta capacidad intracelular de eliminación de EROs y radicales libres como superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, además de actuar como quelante de metales. Este compuesto evita la oxidación de LDL en macrófagos, previniendo su depósito en la íntima arterial, impidiendo así la formación de la placa aterosclerótica (Gonzalez-Santiago et al., 2006; Granados-Principal et al., 2012; Warleta et al., 2011), motivo por el que la EFSA ha recomendado su ingesta. Su capacidad antioxidante es compartida con otras moléculas de la misma naturaleza, aunque, se han propuesto mecanismos de actuación alternativos para el HT, por ejemplo la actuación a nivel de rutas antioxidantes como ARE, que conlleva finalmente un incremento de Nrf2 y JNK-p62/SQSTM1 (Bayram et al., 2012; Zou et al., 2012). Además, el HT tienen un efecto como estimulante de la biogénesis mitocondrial a través del incremento de PPARGC1 α , que le permite ser considerado como protector

mitocondrial, efecto de gran importancia cuando se administran fármacos que alteran la estabilidad mitocondrial y desencadenan, como consecuencia de esto, efectos cardiotóxicos, como ocurre con las antraciclinas (Zhu et al., 2010). Además de lo anterior, el HT tiene la capacidad de actuar directamente sobre el sistema antioxidantes, incrementando la actividad de SOD, GPx y GR para mantener los niveles de GSH y elevando considerablemente la actividad CAT, favoreciendo la eliminación de peróxidos del medio (Hashimoto et al., 2004), permitiendo a su vez la adquisición de cierto carácter neuroprotector (Koo, Kim, Oh, & Kim, 2006; Rodriguez-Morato et al., 2015).

Algunos extractos enriquecidos en HT también han presentado la capacidad de reducir el colesterol total y lípidos plasmáticos, así como la presión arterial (tanto en hipertensos y animales normotensos) (Khayyal et al., 2002). Por otra parte, el HT también es capaz de promover la actividad de las células inmunitarias aumentando su capacidad antioxidante (protección contra la oxidación mediada por neutrófilos por peróxido de hidrógeno) y disminuyendo el daño en el ADN en monocitos, además de aumentar los niveles citosólicos de Ca^{2+} , lo que genera la activación de linfocitos T y B (Zbidi et al., 2009). A este efecto cardioprotector se debe añadir que el HT puede ser considerado como antitrombótico (Cicerale, Conlan, Sinclair, & Keast, 2009) y antiinflamatorio, pues es capaz de inhibir la formación de las plaquetas a través de la inhibición de c-AMP y c-GMP-fosfodiesterasas (Dell'Agli et al., 2008), así como eicosanoides como el tromboxano B2 (TxB2) (de Roos et al., 2011; Leger et al., 2005) o tromboxano A2 (TXA2), medida por la reducción de su metabolito TxB2. Esta disminución se asocia principalmente a la inhibición de la actividad de la enzima ciclooxigenasa (COX) y otras quimioquinas proinflamatorias (Richard et al., 2011). Otros estudios han descrito que las propiedades antiinflamatorias de HT se deben a la supresión de la expresión de COX-2 e iNOS en monocitos (X. Zhang, Cao, & Zhong, 2009). Finalmente, el HT y sus metabolitos ejercen a su vez un efecto protector del endotelio vascular, pues disminuyen la secreción de moléculas de adhesión como E-selectina, P-selectina, ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1) y VCAM1 (molécula de adhesión vascular 1) en células endoteliales de aorta humana (Catalan et al., 2015).

1.9.3.3 Propiedades antiinflamatorias del HT

El HT es conocido por ser un polifenol con un potente efecto antioxidante y poderosas propiedades antiagregantes y antiinflamatorias (Granados-Principal et al., 2010). De la misma forma que con el HT, una ingesta elevada de aceites de oliva enriquecidos en compuestos fenólicos ha demostrado ser capaz de inhibir la expresión de varios genes proinflamatorios y proateroscleróticos (Camargo et al., 2010). Algunos estudios llevados a cabo *in vitro*, con células humanas monocíticas THP-1 que fueron tratadas con lipopolisacáridos para inducir la respuesta inflamatoria, demostraron que el HT es capaz de ejercer una acción antiinflamatoria a través de la inhibición de la formación de citoquinas proinflamatorias, la generación de óxido nítrico, la secreción de TNF- α y la expresión de iNOS y COX-2 (X. Zhang et al., 2009). Varios estudios han demostrado que el HT es capaz de modular el factor de transcripción NF-kappa B, relacionado con más de 150 genes, incluyendo citoquinas como el factor de necrosis

tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 1 (IL-1), IL-6, y IL-17, quimioquinas y moléculas de adhesión, implicadas en las respuestas inflamatorias (Carluccio et al., 2003; Killeen, Linder, Pontoniere, & Crea, 2014).

Estudios *in vivo* observaron que el HT inhibe la COX-1 y COX-2 al mismo nivel que los fármacos antiinflamatorios más relevantes del mercado, como el ibuprofeno y celecoxib (Procopio et al., 2009). Además, el HT demostró su capacidad de disminuir la IL-6 y proteína C reactiva en pacientes con enfermedad coronaria, promoviendo, además de un efecto cardioprotector, un efecto antiinflamatorio sumamente beneficioso en este tipo de pacientes (Fito et al., 2008).

Richard, N. y col. (Richard et al., 2011) describieron al HT como el polifenol del aceite de oliva con mayor potencia anti-inflamatoria. Estos autores comprobaron cómo el HT ejerció un potente efecto antiinflamatorio a través de la inhibición en la producción de NO y prostaglandina E2, así como una disminución en la secreción de citoquinas tales como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α y quimioquinas (CXCL10/IP-10, CCL2/MPC-1). De igual forma, estos autores observaron que el HT disminuyó la expresión génica de iNOS, IL-1 α , CXCL10/IP-10, MIP-1 β , MMP-9 y la prostaglandina E2 sintasa.

1.9.3.4 Actividad antitumoral del HT

En lo que respecta a las propiedades antitumorales del HT, se debe tener en cuenta que la mayor parte de los estudios realizados se han llevado a cabo en modelos celulares y animales. Además, se debe recordar la implicación de estas EROs en las fases de iniciación, promoción y progresión del proceso carcinogénico. Por esa razón, muchas de las propiedades antitumorales de HT se deben a otras actividades ya descrita como su capacidad de modular el sistema antioxidante y eliminar EROs del medio (Manna et al., 1999; P. Rosignoli, Fuccelli, Sepporta, & Fabiani, 2015). De forma general, el HT ha sido estudiado mayoritariamente por sus propiedades antioxidantes y no por las actividades como quimiomodulador, aunque recientemente se han publicado numerosos estudios llevados a cabo con el fin de demostrar dicho efecto, como sucede en la línea celular HepG2 (hepatoma humano), donde ejerce un efecto modulador de la quimioterapia a través de la disminución en la producción de EROs, de forma dosis dependiente (Xiaomei Zhang, Jiang, Geng, Yoshimura, & Zhong, 2008). Gracias a estos ensayos previos, se ha podido establecer que para que el HT comience a mostrar efectos antitumorales, es imprescindible que se presente a dosis de 10-17mg/g (Quirantes-Pine et al., 2013). Además, numerosos estudios han tratado de explicar cómo y mediante qué mecanismos, el HT ejerce sus acciones antitumorales y antiproliferativas en ciertos tipos de tumores.

El HT promueve la apoptosis e inhibe la proliferación y el crecimiento de diferentes tipos de células tumorales, como HL60 (leucemia promielocítica), HT29 clon 19A y HT29 (adenocarcinoma de colon) mediante la detención de la fase G0/G1 del ciclo celular, con la consiguiente disminución del porcentaje de células en las fases S y G2/M (R. Fabiani et al., 2002). Posteriormente, Fabiani, y col. (Roberto Fabiani, Rosignoli, De Bartolomeo, Fuccelli, & Morozzi, 2008), comprobaron un efecto del pH sobre este tipo de células y sugirieron un posible mecanismo a través el cual el HT ejercía esos efectos proapoptóticos y antiproliferativos. Según estos autores, lo realizaba a través de un

incremento en la ciclina D3, CDK p21WAF1/Cip1 y p27Kip1, y una disminución de CDK6. Estas moléculas están implicadas en la transición G1-S y el control de los procesos de diferenciación y apoptosis de las células HL60. Paralelamente, se ha establecido una posible vía por la que HT desencadena la apoptosis. Ésta tiene que ver con la activación de c-jun por quinasa NH2-terminal de c-jun, que en determinadas circunstancias provoca la muerte celular e inactiva la proteína antiapoptótica linfoma de células B de proteína 2 (Della Ragione et al., 2002; Granados-Principal et al., 2010). Otros estudios han demostrado que el HT es capaz de inhibir la proliferación de células por bloqueo de la fase G1 del ciclo celular, aumentando la proporción de células en la fase G0/G1, con una disminución correspondiente en las fases S y G2/M (Granados-Principal et al., 2010). Algunos mecanismos propuestos son los siguientes:

- 1) Bloqueo directo de quinasas dependientes de ciclina.
- 2) Inducción de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina.
- 3) El bloqueo de los mensajeros implicados en la proliferación celular, tales como ROS.

Además, HT induce apoptosis dependiente de estrés en el retículo endoplásmico. Esto conduce a la activación de la vía proapoptótica retículo endoplásmico al núcleo de señalización 1 (Ire1)/cJun NH2-terminal quinasa/c-jun/activador de la proteína-1/NADPH oxidasa 4 (Nox4) (Granados-Principal et al., 2010). Este hecho ha sido de nuevo constatado con nuevos estudios llevados a cabo en células MCF7, fibroblastos hTERT-BJ1 y su cocultivo a dosis incluso de 1mM de HT [Resultados no mostrados]

HT puede inhibir la expresión de HER2 (Factor de Crecimiento Epidérmico Humano Receptor 2) en células de cáncer de mama resistentes a trastuzumab, que sobreexpresan este oncogén (SKBR3); además, puede promover citotoxicidad en células MCF7 (células de cáncer de mama que expresan de forma natural HER2) y en MCF7/HER2 (células de cáncer de mama HER2-inducida) (Javier A. Menendez et al., 2007). Otro estudio llevado a cabo en células MCF7 propuso otro mecanismo de acción de HT en el cáncer de mama. En ese estudio, el HT administrado a dosis de 50µg/ml, inhibió la proliferación celular e indujo la apoptosis. Además, bloqueó la transición de la fase G1 a S del ciclo celular, aumentando el número de células en la fase G0/G1 (Han, Talorete, Yamada, & Isoda, 2009). Posteriormente, un estudio llevado a cabo por Bouallagui, Z. y col. (Bouallagui, Han, Isoda, & Sayadi, 2011) comprobó que las células MCF-7, sometidas a la acción de un extracto de HT, sufrieron una detención de la fase G0/G1 del ciclo celular, debido por un lado a una disminución en la expresión de Pin1 (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase), que a su vez disminuye la ciclina D1 (sobreexpresado en el 50% de los pacientes con cáncer de mama) y por otro lado, debido a la sobreexpresión de c-jun.

Estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación en animales, demostraron que el HT actúa como anti-tumoral en ratas Sprague-Dawley con tumores mamarios generados experimentales con DMBA, inhibiendo el crecimiento celular y la proliferación (asociada con una menor tinción nuclear de Ki-67) en estos tumores. Por

otra parte, el hidroxitirosol altera varios genes asociados con la proliferación celular, la apoptosis y la vía de señalización Wnt, promoviendo una elevada expresión de Sfrp4 (Secreted Frizzled-Related Protein 4) (Granados-Principal et al., 2011). Esta proteína pertenece a familia de Secreted Frizzled-Related Protein. Es un modulador soluble de la ruta molecular Wnt, que interviene en la proliferación, migración, apoptosis, morfología y migración celular. La inhibición de esta ruta la lleva a cabo a través de un antagonismo competitivo directo con el ligando natural Wnt y bloqueando a los receptores. Esto repercute directamente inhibiendo las rutas canónica y no canónica (Kawano & Kypta, 2003), que se realiza principalmente a través de la inhibición de la estabilización de β -catenina y APC (Adenomatous polyposis coli) (Karim, Tse, Putti, Scolyer, & Lee, 2004). Debido a la inhibición de esta ruta y su implicación indirecta en la inhibición de la proliferación e inducción apoptótica de células tumorales, algunos autores han calificado al gen Sfrp4 como supresor tumoral (He et al., 2005; Jacob et al., 2012). Recientes estudios *in vitro* llevados a cabo por el grupo, con células MCF7, fibroblastos hTERT-BJ1 y cocultivos de ambos [Resultados no mostrados], muestran el carácter citotóxico selectivo para las células tumorales. Al comprobar sobre qué rutas celulares puede actuar este compuesto, observamos que se cumplía su relación con la ruta Wnt, así como con otras rutas antioxidantes y relacionadas con apoptosis y muerte celular, como ARE, Nox, ISRE...

Por otro lado, el HT es un potente inhibidor de la ácido graso sintasa (FAS), una enzima clave implicada en la carcinogénesis de las células SKBR3 y MCF7, por lo que se presenta como un fuerte quimiopreventivo.

Existen muchos estudios epidemiológicos que sugieren que el HT y los derivados en el AO puede tener efectos protectores frente a múltiples tipos de tumores en páncreas, cavidad bucal, esófago, colon-recto, próstata o pulmón (Bernini et al., 2013; Rafehi et al., 2012; Vilaplana-Perez, Aunon, Garcia-Flores, & Gil-Izquierdo, 2014).

En la siguiente tabla (tabla 5) podemos encontrar un breve resumen de las distintas actividades que presenta el HT a nivel cardiovascular y como antitumoral, exponiendo además las principales moléculas implicadas y sus efectos a nivel bioquímico.

Tabla 5. Actividad del HT sobre el sistema cardiovascular y sus efectos a nivel antitumoral

Actividad del HT	Efecto Bioquímico	Efecto sobre señalización celular
	Protector cardiovascular	
Antiaterogénica	Reducción de oxidación de LDL y peroxidación lipídica	Reduce la expresión de moléculas de adhesión
	Efecto hipocolesterolemizante	Inactivación de NF- κ B, AP-1, GATA y NAD(P)H oxidasa
Antitrombótica y antiinflamatoria	Incremento de HDL, disminución de síntesis de TBXA2 y TBXB2, LTB4 y prostaciclina	Reduce la expresión de moléculas de adhesión
	Reducción de cAMP y cGMP fosfodiesterasas plaquetarias	Activación transcripcional de NF- κ B, IRF-1 y STAT-1 α

	Inhibición de 5-LOX y 12-LOX	Reducción de expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α)
Protectora del endotelio vascular	Bloquea la síntesis de COX-2 e i-NOS, disminuyendo PGE2 e incrementando óxido nítrico	Reduce la expresión de proteínas relacionadas con el envejecimiento (Sirt, FoxO y PBEF)
Antitumoral		
Antiproliferativa		Detención del ciclo celular (G0/G1, S, G2/M)
		Incrementa la expresión de p21 WAF/Cip1 y p27 Kip1
		Inhibición de CDK6
		Inhibición de la expresión del oncogén HER2
		Inhibición de la ácido graso sintasa
Proapoptótica		Liberación de citocromo c
		Activación de Caspasa-3, c-jun y Bcl2
		Activación de la ruta I κ B/NF- κ B
		Activación de la ruta I κ B/NF- κ B
		Inhibición de la ruta PI3K/Akt/NF- κ B

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

TBX: Tromboxano

LT: Leucotrieno

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico

cGMP: Guanosín monofosfato cíclico

LOX: Lipooxigenasa

COX: Ciclooxygenasa

i-NOS: Óxido nítrico sintasa inducible

PGE2: Prostaglandina E2

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

AP-1: Proteína activadora 1

GATA: Proteínas de unión a secuencia de Guanina, Adenina y Timina

NAD(P)H: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida

IRF-1: Factor 1 regulador de interferón

STAT-1 α : transductor de señal y activador de la transcripción 1 alfa

IL-1 β : Interleucina 1 beta

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

Sirt: Sirtuína

FoxO: Proteína Forkhead box O

PBEF: Visfatina

CDK6: proteína quinasa de división celular 6

HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

Bcl2: B-cell lymphoma 2

I κ B: serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease inositol-requiring enzyme 1

JNK: c-Jun N-terminal protein kinases

PI3K: fosfoinositol 3-quinasa

Akt: Gen codificador de proteína quinasa B

CAPÍTULO 2 MATERIAL Y MÉTODOS *Diseño del estudio*

El estudio consistió en conocer el efecto que la quimioterapia neoadyuvante producía sobre el sistema redox de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama y cómo la suplementación dietética de HT podía modular tanto el efecto de terapia antitumoral como el propio estado redox. De esta forma, se establecieron dos subgrupos de población: Grupo tratado con HT y su correspondiente grupo control (placebo).

El diseño se caracterizó como un ensayo clínico aleatorizado con grupos paralelos (tratado y placebo) a triple ciego. El criterio de inclusión del ensayo fue diagnóstico de cáncer de mama (cualquier subtipo) con expresión de receptores hormonales (receptores de estrógenos y/o receptores de progesterona), sin amplificación del gen HER-2 (fenotipos Luminal A y B) que recibían tratamiento quimioterápico antes de la cirugía según las recomendaciones definidas en la guía de Práctica Clínica elaborada por el Subcomité Multidisciplinario de Mama del Complejo Hospitalario de Jaén. Con estas mujeres se establecieron dos grupos: el intervenido al que se le administró una suplementación dietética con HT a una dosis única de 15 mg/día en forma de cápsulas duras y el grupo control con suplementación dietética de placebo administrado en una única dosis diaria en forma de cápsulas duras.

2.1.1 *Intervenciones del estudio*

La cronología del estudio puede verse reflejada de forma esquemática en la figura 14. Así mismo, la secuenciación temporal e intervenciones y procedimientos llevados a cabo durante todo el tratamiento antitumoral se describen detalladamente a continuación:

Primera intervención (T1):

Se realizó en la primera consulta de oncología. En esta intervención, se procedió a:

- I. Explicación del EC (Ensayo Clínico) y firma del CI (Consentimiento Informado), petición de analítica que incluía hemograma, bioquímica general con perfil hepático y lipídico, IL-6, PGE2 y muestras de sangre para obtención de suero/plasma y linfocitos aislados destinadas al EC; entrega del suplemento mediante asignación aleatoria para la ingesta diaria de 1 cápsula/día hasta 1 mes después de la cirugía.
- II. Realización de la encuesta nutricional (Valoración del Estado Nutricional de la Comunidad Autónoma de Andalucía).
- III. Extracción de sangre para determinaciones analíticas.
- IV. Recogida de suero/plasma/linfocitos aislados y conservación a -80° C.
- V. Inicio del tratamiento quimioterápico con epirubicina y ciclofosfamida.

Segunda intervención (T2):

Tuvo lugar a la mitad del tratamiento neoadyuvante (para 4 ciclos: la mañana de inicio del 3º ciclo; para 6 ciclos: la mañana de inicio del 4º; para 8 ciclos: la mañana de inicio del 5º). En ese momento, se procedió a:

- I. Petición de analítica que incluía hemograma, bioquímica general con perfil hepático y lipídico, IL-6, PGE2, muestras de sangre para obtención de suero/plasma y linfocitos aislados destinadas al EC.
- II. Extracción de sangre para determinaciones analíticas.
- III. Recogida de suero/plasma/linfocitos aislados y conservación a -80°C .
- IV. Inicio del tratamiento quimioterápico con Taxanos.

Tercera intervención (T3):

Se llevó a cabo el día anterior al ingreso para intervención quirúrgica. En ese momento, se procedió a:

- I. Petición de analítica que incluía hemograma, bioquímica general con perfil hepático y lipídico, IL-6, PGE2, muestras de sangre para obtención de suero/plasma y linfocitos aislados destinadas al EC.
- II. Extracción de sangre para determinaciones analíticas.
- III. Recogida de suero/plasma/linfocitos aislados y conservación a -80°C .

Última intervención (T6):

Se llevó a cabo transcurrido un mes desde la intervención quirúrgica. En este momento, se procedió a:

- I. Petición de analítica que incluía hemograma, bioquímica general con perfil hepático y lipídico, IL-6, PGE2, muestras de sangre para obtención de suero/plasma y linfocitos aislados destinadas al EC.
- II. Extracción de sangre para determinaciones analíticas.
- III. Recogida del suero/plasma y linfocitos aislados y conservación a -80°C .
- IV. Realización de encuesta nutricional (Valoración del Estado Nutricional de la Comunidad Autónoma de Andalucía).

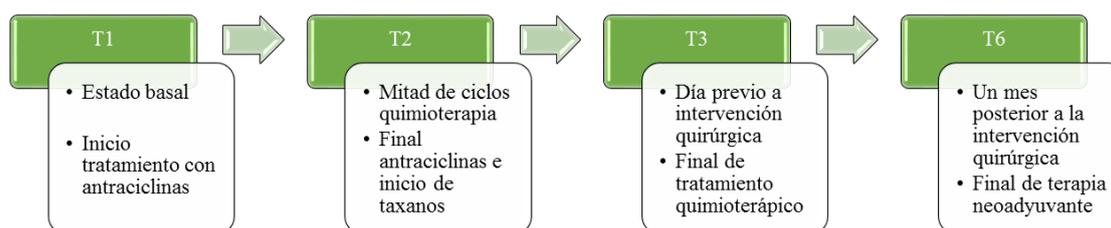


Figura 14. Esquema cronológico del estudio.

2.2 Cálculo del tamaño muestral:

2.2.1 Tamaño muestral

La muestra fue seleccionada mediante un muestreo aleatorio según el tratamiento.. El tamaño muestral global fue estimado en base a los datos obtenidos en el trabajo publicado por Vera-Ramírez L. y col. (L. Vera-Ramirez et al., 2011). La muestra fue reclutada de forma consecutiva a su identificación y de forma secuencial. La asignación al grupo control o experimental se realizó de forma aleatoria. El número final de participantes fue de 31, consiguiendo terminar completamente el ensayo en todas sus etapas un total de 27 pacientes. 4 de ellas abandonaron en ensayo en algún punto temporal del mismo.

2.2.2 *Generación de la secuencia aleatoria/asignación oculta/implementación/enmascaramiento*

La asignación de las pacientes se realizó de forma equiprobable y aleatoria según métodos de muestreo llevados a cabo por los estadísticos-metodólogos de FIBAO (Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental). Para cumplir este objetivo de la aleatorización, se utilizaron tablas de asignación aleatoria al tratamiento generadas por el programa Eptad 3.1.

La empresa que proporciona el suplemento dietético, Probelte Pharma S.A., creó un placebo con idéntica forma y color que el formato habitual del suplemento, siendo ésta la única entidad que custodió la información acerca del envasado correspondiente al suplemento y al placebo. Esta información únicamente fue revelada una vez finalizado el estudio. De esta forma, todas las pacientes incluidas en el estudio ingirieron el comprimido correspondiente a su grupo, con absoluto desconocimiento de si se trataba del suplemento con HT o del placebo. Esta información tampoco se le dio a conocer al facultativo. Todos los análisis estadísticos también se llevaron a cabo a ciego.

2.3 *Población de estudio*

La población de referencia a la que se dirigió el estudio eran pacientes de la provincia de Jaén diagnosticadas, mediante Biopsia con Aguja Gruesa, de cáncer de mama con expresión de receptores hormonales medidos mediante inmunohistoquímica y HER-2 negativo que pasaban por el Subcomité de Mama del Complejo Hospitalario de Jaén (CHJ). Así mismo, la población de estudio consistió en aquellas pacientes seleccionadas por el Comité de Mama para tratamiento neoadyuvante según los criterios recogidos en la Guía de Práctica Clínica elaborada por propio Subcomité.

Criterios de inclusión:

- Fenotipo tumoral LUMINAL (A o B). Se considera fenotipo luminal a todo tumor con expresión superior al 1% de receptores estrogénicos y/o de progesterona. Si el índice proliferativo medido mediante el Ki-67 era inferior o igual al 14% se subclasificaba como Luminal-A y si era superior al 14% como Luminal-B.
- Poseer suficiente material, tanto en la Biopsia con Aguja Gruesa (BAG) como en la Biopsia Quirúrgica (BQ).

- Recibir tratamiento neoadyuvante con quimioterapia basada en Antraciclinas y Taxanos.
- Firmar el Consentimiento Informado. El modelo empleado es el recogido en el Anexo 1.

Criterios de exclusión:

- Enfermedad metastásica al diagnóstico.
- Antecedentes de enfermedades mentales.
- Detección en la entrevista inicial de un perfil psicológico que supusiese baja capacidad de adherencia al ensayo e impidiese la toma diaria del suplemento.
- Mujeres que sólo recibiesen hormonoterapia como tratamiento neoadyuvante.
- Mujeres con alergias conocidas a alimentos o compuestos derivados del olivo.

Todas las pacientes que participaron en el estudio cumplieron una serie de criterios metodológicos para evitar sesgos en los datos y siguieron una serie de recomendaciones aportadas al inicio del estudio.

2.4 *Características de los tratamientos*

Las cápsulas empleadas en el estudio (hidroxitirosol y placebo) fueron suministradas por Probelte Pharma S.A. siguiendo todos los controles de calidad, estabilidad, conservación y etiquetado para medicamentos de uso humano. Las cápsulas eran exactamente iguales en tamaño color y forma, diferenciándose únicamente en el número de lote. Cada uno de estos lotes presentaba el etiquetado según normativa, con las condiciones de conservación y fecha de caducidad.

2.5 *Evaluación del cumplimiento y seguridad*

Siguiendo el plan de aleatorización, a cada una de las participantes se le proporcionó el tratamiento correspondiente y se registró en el apartado correspondiente del Cuaderno de Recogida de Datos. Además, se suministró a todas las participantes una Hoja-Diario donde anotaron la toma o no diaria del suplemento. Puesto que el tratamiento era ingerido por las pacientes en su domicilio, el control del cumplimiento se realizó mediante la devolución, por parte de las pacientes, de todos los envases llenos o vacíos al final del período de intervención.

Los signos y síntomas correspondientes a efectos adversos y secundarios relacionados con el consumo de las cápsulas se recogieron en el mismo momento en que las participantes lo comunicaban. Dichos efectos fueron descritos con el propósito de documentar la tolerabilidad a los mismos, conteniendo de esta forma información sobre la naturaleza, severidad, tiempo de inicio y duración de las reacciones adversas, acciones tomadas para revertirlas y probabilidad de que guardasen o no relación con el tratamiento.

2.6 *Tratamiento estadístico de las muestras:*

Los datos recogidos sobre las variables dependientes e independientes en este estudio se registraron en una base de datos anonimizada, construida para tal fin y procesadas estadísticamente mediante el programa estadístico SPSS v21.

En primer lugar se realizó un análisis estadístico descriptivo de cada una de las variables de la base de datos. Para ello en el caso de las variables cualitativas se obtuvo una tabla de frecuencias (número de casos y porcentaje) y como representación gráfica el gráfico de sectores. Para el caso de las variables cuantitativas se obtuvo para cada una de ellas: media, mediana, desviación típica, mínimo y máximo y como representación gráfica el histograma. Para determinar si existían diferencias en los marcadores a lo largo del tiempo y entre los dos grupos de tratamiento se calculó el Modelo lineal General de Medidas Repetidas teniendo en cuenta el factor intra-sujetos el tiempo y como factor inter-sujetos el Grupo de tratamiento. Para aplicar los test se ha asumido la normalidad de los datos, a pesar del escaso tamaño de muestra. En cada test se estudió la esfericidad de la matriz de varianzas-covarianzas y se tuvo en cuenta los resultados de los test correspondientes, según esta comprobación. Para todos los análisis se consideró significativo un valor $\alpha=0.05$.

2.7 *Análisis del balance oxidativo, variables bioquímicas e histopatológicas:*

2.7.1 *Análisis del balance oxidativo:*

Todas las determinaciones llevadas a cabo en las muestras plasmáticas y linfocitos aislados se realizaron por duplicado, incluyendo patrones, blancos y controles. De cada medición se obtuvieron los coeficientes de variación intra-ensayo y se descartaron todos aquellos valores que presentaban una variabilidad superior al 10%. Igualmente, se controló que los distintos experimentos efectuados para cuantificar una misma variable no tuviesen una oscilación superior al 15% inter-ensayo.

Las determinaciones empleadas para valorar el estrés oxidativo se clasificaron en 4 grandes grupos en función de las macromoléculas a las que afectase: daño oxidativo a proteínas, daño oxidativo a lípidos e hidratos de carbono, daño oxidativo asociado a ácidos nucleicos y finalmente, determinaciones relacionadas con el sistema antioxidante.

2.7.2 *Determinación del daño oxidativo asociado a proteínas:*

2.7.2.1 Concentración de proteínas totales

Fundamento:

El contenido total de proteínas plasmáticas se midió con el kit colorimétrico “Quantitative determination of total protein IVD” de la casa comercial SpinReact (SpinReact, Gerona, España) adaptado para la aplicación de lector de microplacas de acuerdo con Vera-Ramirez L. y col. (L. Vera-Ramirez et al., 2011). Este kit se basa en el método de detección proteica de Biuret y se caracteriza porque permite combinar la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} llevada a cabo por las proteínas del medio cuando son sometidas a un medio alcalino con la elevada sensibilidad y selectividad de detección colorimétrica

del catión cuproso (Cu^{1+}). Este método utiliza yoduro como antioxidante. La intensidad de coloración púrpura generada es proporcional a la concentración de proteínas en el medio.

Método:

Se añadieron 5 μl de muestra/patrón en cada pocillo correspondiente de una microplaca. A continuación, se agitó brevemente en un agitador orbital y se incubó a 37°C durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se procedió a la lectura de la densidad óptica de muestras y patrón a 540nm.

Resultados:

El cálculo de la concentración proteica del plasma se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{DO Muestra/DO Patrón} \times 7 (\text{Concentración patrón}) = \text{g/dL de proteínas totales}$$

2.7.2.2 Proteínas carbonilo plasmáticas

Fundamento:

El daño oxidativo a proteínas fue evaluado a través de la determinación de la concentración de proteínas carbonilos presentes en plasma, para lo que se empleó el kit comercial Protein Carbonyl Assay Kit de la casa comercial Cayman (Cayman Chemical Company, MI, EE.UU.) según la metodología descrita por Vera-Ramirez L. y col. (L. Vera-Ramirez et al., 2011). El ensayo se basa en la detección espectrofotométrica de la reacción entre 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) con proteínas carbonilo para formar la hidrazona proteica correspondiente, a través de una base de Schiff.

Método:

Se dispensaron 100 μl de plasma en dos tubos eppendorf. Uno de los tubos actuó de control y el tubo restante se empleó como tubo de ensayo para la determinación de la concentración de proteínas carbonilo propiamente dicha. Al tubo control se le adicionaron 400 μl de ácido clorhídrico 2,5M y al tubo de ensayo 400 μl de DNPH. Posteriormente, ambos tubos fueron incubados en oscuridad, a temperatura ambiente y agitados en intervalos de 15 minutos durante una hora. A continuación, se adicionaron 500 μl de ácido tricloroacético 20% y se agitaron los tubos vigorosamente, dejando reposar 5 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron los tubos a 10.000 x g y 4°C durante 10 minutos, obteniendo un sedimento que fue resuspendido en 500 μl de TCA al 10% e incubado de nuevo en hielo durante 5 minutos. Finalizado este tiempo, se procedió a su centrifugación durante 10 minutos a 4°C y 10000 x g. El sedimento obtenido se resuspendió en 500 μl de una mezcla de etanol-acetato de etilo (1:1) y de nuevo se centrifugó a 10.000 x g a 4°C durante 10 minutos. Este último paso fue repetido una vez

más, mezclando vigorosamente el pellet resultante con 250 µl de hidrocloreuro de guanidina. Finalmente, se hizo una última centrifugación a 10.000 x g a 4°C durante 10 minutos y se recogieron 220µl de sobrenadante que fueron transferidos a una microplaca para la posterior lectura de absorbancia a 370 nm.

Resultados:

La DO obtenida en el pocillo control fue sustraída de la DO correspondiente a la muestra. Para cuantificar el contenido de proteínas carbonilo de la muestra se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Proteínas carbonilo} = (\text{DO}/0.011 \mu\text{M}^{-1}) * (250 \mu\text{l}/100 \mu\text{l})$$

El resultado obtenido venía dado en nmol/ml de proteínas carbonilo. Para la estimación correcta de la concentración de proteínas carbonilo en plasma se normalizaron los resultados en función de los mg/ml de proteínas totales de cada muestra, quedando finalmente los resultados expresados en nmol de proteínas carbonilo por mg de proteína.

2.7.2.3 Productos proteicos de oxidación avanzada (AOPP)

Fundamento:

Los productos proteicos de oxidación avanzada (AOPP) son toxinas urémicas creadas durante situaciones de estrés oxidativo mediante la reacción de oxidantes clorados, tales como cloraminas o ácido hipocloroso, con las proteínas plasmáticas. Estas moléculas son estructuralmente similares a los AGE (Productos de Glicación Avanzada) y se encuentran elevados en pacientes con complicaciones renales, aterosclerosis, diabetes o cáncer. Aunque los mecanismos de degradación y eliminación sanguínea de AOPP aún no son bien conocidos, se cree que el hígado y el bazo son los principales responsables de su aislamiento y eliminación. Para la determinación de AOPP se empleó el kit OxiSelect™ AOPP Assay Kit de la casa comercial Cellbiolabs (Cellbiolabs Inc. CA, EE.UU), de acuerdo con lo descrito por Thurmond, Yang y col. (Thurmond, Yang, Li, Lerner, & Azadzo, 2015). Este kit se basa en la reacción de los AOPP con un compuesto iniciador de una reacción que deriva en un producto coloreado, cuya intensidad de color será proporcional a la cantidad de AOPP presente en la muestra.

Método:

El primer paso realizado fue la elaboración de una solución madre de cloramina a partir de la cual se preparó una curva patrón. A continuación, se pipetearon 200 µl de muestra, patrón y blanco en los correspondientes pocillos de una microplaca y se adicionaron 10 µl de reactivo iniciador de la reacción de cloramina. Posteriormente, se incubó la placa con agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente, produciéndose así la formación de un compuesto cromógeno. Inmediatamente después de este proceso,

se agregaron 20 µl de solución de parada y se agitó brevemente para homogenizar la coloración. Finalmente, la DO de la placa fue leída en un espectrofotómetro a 340 nm.

Resultados:

La concentración final de AOPP de las muestras se determinó incorporando los resultados de DO obtenidos en la herramienta informática online MyAssays (www.myassays.com). Con esta aplicación se trazó una curva patrón lineal y se extrapolaron los valores de DO correspondientes al plasma, obteniendo así los valores de concentración de AOPP expresados en µM de cloramina. Los resultados finales fueron expresados normalizando por concentración de proteínas totales, quedando finalmente expresados como µM Cloramina por mg de proteína.

2.7.3 *Determinación del daño oxidativo asociado a lípidos e hidratos de carbono:*

2.7.3.1 Determinación de Lípidos totales

Fundamento:

La determinación de los lípidos totales se lleva a cabo para poder establecer un método de normalización de las moléculas de naturaleza liposoluble. Para establecer si el aumento o disminución de éstas se debe a un incremento o descenso en la síntesis de las mismas, utilizamos como medida normalizadora la concentración de lípidos totales.

Los lípidos son moléculas orgánicas cuya función principal es actuar como combustible para la generación de energía, motivo por el cual presentan una elevada capacidad de acumulación en el tejido adiposo. Son indispensables en la composición de las membranas biológicas y en la síntesis de hormonas y otras moléculas de origen lipofílico. Para la determinación de los lípidos totales, se utilizó el kit Total Lipid de la casa comercial SpinReact (SpinReact, Gerona, España) adaptado a la utilización en microplacas. Este kit se basa en la interacción de los lípidos insaturados con el ácido sulfúrico en condiciones de calor para generar iones carbonio, que tras la adición de fosfovainillina, generan una coloración rosada cuya intensidad es proporcional a la concentración de lípidos totales presente en la muestra ensayada.

Método

La determinación de los lípidos totales se llevó a cabo según lo establecido en estudios previos del grupo de investigación (Díaz-Castro et al., 2015). El primer paso realizado fue la hidrólisis de las muestras con ácido sulfúrico. Para ello, se tomaron 10 µl de plasma, patrón y blanco y se llevaron a tubos con 250 µl de ácido sulfúrico, mezclando enérgicamente con ayuda de un vórtex. A continuación, se dejaron incubar durante 10 minutos en un termobloque a 100°C, generando un hidrolizado de las muestras y calibradores. Una vez enfriados, se pipetearon 10 µl de cada una de las muestras, blanco y calibrador y se llevaron a una placa de 96 pocillos. Posteriormente, se les adicionaron

200 µl de reactivo fosfovainillina 235mM, se mezcló todo enérgicamente con un agitador orbital de placas durante 15 minutos a 37°C. Finalmente, la coloración rosácea generada por el derivado sulfo-fosfovainillina se midió espectrofotométricamente a 520nm.

Resultados:

La concentración de los lípidos totales se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$(DO_{\text{muestra}}/DO_{\text{calibrador}})*750(\text{conc. calibrador})= \text{conc. lípidos totales (mg/dl)}$$

2.7.3.2 F2-isoprostanos plasmáticos:

Fundamento:

La determinación del daño oxidativo lipídico se evaluó midiendo la concentración de isoprostanos plasmáticos a través del kit comercial 8-Isoprostane EIA Kit de la casa Cayman (Cayman Chemicals, Michigan, EE.UU.). Este ensayo se basa en la competencia entre 8-isoprostano de la muestra y un conjugado de 8-isoprostano-acetilcolinesterasa (Tracer) por un número limitado de lugares de unión a un antisuero de conejo. La concentración de Tracer se mantiene constante a lo largo del ensayo, variando únicamente la concentración de 8-isoprostano de la muestra, por lo que la cantidad de Tracer capaz de unirse al antisuero de conejo era inversamente proporcional a la concentración de 8-isoprostano presente en el plasma examinado. Gracias al reactivo de Ellman (sustrato para la acetilcolinesterasa) se genera un producto de coloración amarilla que puede determinarse espectrofotométricamente a 412 nm.

Método:

En primer lugar, se procedió a la reconstitución de todos los componentes necesarios del kit de acuerdo a las condiciones establecidas por el fabricante. Posteriormente, se diluyeron las muestras de plasma con los reactivos proporcionados en el kit y se realizó el ensayo de acuerdo con los pasos fijados por el fabricante y como ha sido descrito detalladamente en la bibliografía (Vassalle, Botto, Andreassi, Berti, & Biagini, 2003). Para realizar el ensayo, se emplearon 50 µl de plasma diluido. Tras la adición de todos los reactivos, incluidos el antisuero específico y las muestras en la microplaca proporcionada, se incubó 18 horas a 4°C. Finalizado este tiempo, se agregó el reactivo de Ellman y se agitó a temperatura ambiente y oscuridad. Transcurridas todas las etapas, se llevó a cabo la lectura de DO de la placa a 412nm.

Resultados:

La concentración de isoprostanos plasmáticos se obtuvo introduciendo los valores de densidad óptica en una herramienta virtual proporcionada por la casa comercial (EIA Analysis Tools for 8-isoprostanes). Esta aplicación trazó la curva patrón correspondiente y extrapoló los valores de DO de las muestras, obteniendo así los valores de concentración de isoprostanos libres en plasma expresados en pg/ml. Estos resultados fueron a su vez estandarizados en función de la concentración de lípidos totales determinados en cada muestra, quedando finalmente expresado en pg de isoprostanos libres por mg de lípidos.

2.7.3.3 Determinación de NEFA

Fundamento:

Los ácidos grasos libres (NEFA) en plasma van unidos a la albúmina y se caracterizan por ser proveedores de energía tisular. Su concentración en plasma viene determinada por la absorción que sufren a nivel hepático y del tejido periférico y por su liberación por el tejido adiposo. Son considerados como marcadores del estado nutricional y la actividad física, así como factores predictivos de riesgo de muerte asociada a cáncer (Charles et al., 2001). Para su determinación, se empleó el kit Nefa (non-esterified fatty acids) assay de la casa comercial RANDOX (Randox Laboratories, Irlanda del Norte, Reino Unido). Este kit se basa en la transformación que sufren los NEFA por la enzima acil-CoA sintetasa hasta acil-CoA. Esta acil-CoA es convertida en 2,3-trans-enoil-CoA y peróxido de hidrógeno por acción de la acil-CoA-oxidasa. Posteriormente, en presencia de una peroxidasa y por la acción conjunta de la 3-metil-N-etil-N-(E-hidroxietilo)-anilina y la 4-aminoantipirina, se obtiene un complejo cromático azul-violeta por acoplamiento oxidativo. Esta coloración permite la medición de su absorbancia a 550 nm, siendo proporcional a la concentración plasmática de los ácidos grasos no esterificados presentes inicialmente.

Método:

El primer paso realizado fue la reconstitución de los patrones liofilizados proporcionados por el fabricante, a partir de los cual se preparó una curva estándar de 4 puntos. A continuación, se pipetearon 5 µl de muestra, patrón y blanco en los correspondientes pocillos de una microplaca y se adicionaron 100 µl del reactivo R1. Posteriormente, la placa se incubó durante 10 minutos a 37°C, tras lo cual se adicionaron 200µl del reactivo de trabajo R2. Tras este paso, se volvió a incubar 10 minutos a 37°C. Finalmente, la absorbancia fue leída en un espectrofotómetro a 550 nm.

Resultados:

La concentración final de NEFA de las muestras se determinó incorporando los resultados de DO obtenidos en la herramienta informática online MyAssays (www.myassays.com). Con esta aplicación se trazó una curva patrón lineal y se extrapolaron los valores de DO correspondientes al plasma, obteniendo así los valores de

concentración de NEFA expresados en mEq/L. Para normalizar los resultados de ácidos grasos no esterificados, se normalizaron con respecto a la concentración de lípidos totales quedando finalmente expresados como mEq de NEFA por mg de lípidos.

2.7.3.4 Productos de glicación avanzada (AGE)

Fundamento:

La reacción de Maillard consiste en una reducción no enzimática de los carbohidratos con las cadenas terminales de la lisina y grupos amino terminales de macromoléculas como proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos. Los productos de esta reacción se denominan productos de glicación avanzada (AGEs) y afectan negativamente a las propiedades funcionales de las proteínas, lípidos y ADN. La formación de AGEs es predominantemente endógena, aunque también pueden ser derivados de fuentes exógenas. Estas moléculas son capaces de interactuar con receptores celulares de superficie como los receptores de unión a AGE (RAGE), induciendo bien su endocitosis y degradación o bien una activación celular con efectos derivados pro-oxidantes y pro-inflamatorios. Su acumulación ha sido asociada en parte al sedentarismo, promoviendo un aumento en el riesgo de padecer cáncer (Foster et al., 2014). Para la determinación de estos productos, se empleó el kit OxiselectTM Advanced Glycation End Product (AGE) ELISA Kit de la casa comercial Cellbiolabs (Cellbiolabs, CA, EE.UU) de acuerdo con las condiciones indicadas por el fabricante (Cell Biolabs, 2013-2015). Este kit se basa en la detección de aductos proteicos de AGE presentes en la muestra mediante un anticuerpo policlonal anti-AGE y un anticuerpo secundario conjugado con HRP.

Método:

El primer paso realizado fue la reconstitución de una solución madre liofilizada de BSA reducido y otra de AGE-BSA, a partir de las cuales se elaboró una curva patrón. A continuación, se pipetearon 50 µl de muestra, patrón y blanco en los correspondientes pocillos de una microplaca y se dejó incubando en agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se adicionaron 50 µl de anticuerpo específico frente a AGE y se dejó la placa una hora a temperatura ambiente y agitación. A continuación, se lavó la placa con tampón de lavado para eliminar el anticuerpo sobrante no unido y se incorporaron 100 µl de anticuerpo secundario conjugado, dejando incubar durante una hora a temperatura ambiente y agitación. Una vez completado el proceso, se lavó la placa tres veces, se adicionaron 100 µl de sustrato y se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se pipetearon 100 µl de solución de parada, virando la coloración de azul intenso a amarillo. Inmediatamente, se procedió a la lectura de la placa en un espectrofotómetro a 450nm.

Resultados:

La concentración final de AGEs de las muestras se determinó incorporando los resultados de DO obtenidos en la herramienta informática online MyAssays

(www.myassays.com). Con esta aplicación se trazó una curva patrón de 4 parámetros y se extrapolaron los valores de DO correspondientes al plasma, obteniendo así los valores de concentración de AGE expresados en $\mu\text{g/ml}$. Debido a que su detección se basa en aductos proteicos, se normalizaron sus valores frente a la concentración de proteínas plasmáticas, quedando finalmente expresados como μg de AGE por mg de proteínas.

2.7.4 *Determinación del daño oxidativo asociado ácidos nucleicos:*

2.7.4.1 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) plasmática

Fundamento:

El daño oxidativo a nivel de ácidos nucleicos se genera cuando el balance redox se ha visto seriamente alterado, generando productos de oxidación como la 8-OHdG. Esta molécula es considerada uno de los biomarcadores más sensibles de estrés oxidativo asociado a diversas patologías (Shi et al., 2012). Para su cuantificación, se empleó el kit DNA/RNA Oxidative Damage EIA de la casa comercial Cayman (Cayman Chemicals, Michigan, EE.UU.). Dicho ensayo se basa en la competencia entre las especies de guanina generadas en la muestra y un conjugado 8OHdG-acetilcolinesterasa (Tracer) por un número limitado de uniones a un anticuerpo monoclonal frente a las moléculas de guanina modificada oxidativamente. La cantidad de Tracer es constante mientras que la de 8-OHdG plasmática varía, siendo por tanto la concentración de Tracer inversamente proporcional a la de 8-OHdG de la muestra. Gracias al reactivo de Ellman (sustrato para la acetilcolinesterasa), se genera un producto de coloración amarilla que puede determinarse espectrofotométricamente a 412 nm.

Método:

En primer lugar, se procedió a la reconstitución de todos los componentes necesarios del kit de acuerdo a las condiciones establecidas por el fabricante (Cayman Chemical, 2015). Posteriormente, se diluyeron las muestras de plasma con los reactivos proporcionados en el kit y se realizó el ensayo de acuerdo con el protocolo. Para realizar el ensayo, se emplearon 50 μl de plasma diluido. Tras la adición de todos los reactivos, incluidos el antisuero específico y las muestras en la microplaca proporcionada, se incubó 18 horas a 4°C. Finalizado este tiempo, se agregó el reactivo de Ellman y se agitó a temperatura ambiente y oscuridad. Transcurridas todas las etapas, se llevó a cabo la lectura de DO de la placa a 412nm.

Resultados:

La concentración de 8-OHdG plasmática se obtuvo introduciendo los valores de densidad óptica en una herramienta virtual proporcionada por la casa comercial (EIA Analysis Tools for 8-OHdG). Con esta aplicación, se trazó la curva patrón correspondiente y se extrapolaron los valores de DO de las muestras, obteniendo así los

valores de concentración de 8-OHdG en plasma expresados en pg/ml. Estos resultados fueron a su vez estandarizados en función de la concentración de proteínas totales determinadas en cada muestra, quedando finalmente expresado en pg de 8-OHdG por mg de proteínas.

2.7.4.2 Ensayo Comet alcalino (Linfocitos Sangre Periférica)

Fundamento:

El ensayo comet alcalino es un método ampliamente empleado para determinar de forma versátil y sensible el daño en ADN generado en células eucariotas por efecto de distintos tóxicos o desequilibrios en el estado redox. Gracias a las actualizaciones que ha ido sufriendo a lo largo del tiempo, hoy en día es un método útil para determinar el daño producido tanto en las cadenas simples como dobles del ADN. Se basa en la combinación de una electroforesis de células individualizadas en un micro gel con el empleo de la microscopía de fluorescencia. Cuando el ADN de las células contiene hebras rotas, éstas migran hacia el ánodo durante la electroforesis debido a la carga negativa de los extremos del ADN fraccionado. Si por el contrario el ADN estuviera intacto, estos fragmentos no tendrán la capacidad de migrar hacia dicho polo. La determinación por microscopía de fluorescencia de la fracción que ha migrado o no, aporta información sobre el nivel de rotura de las hebras que presenta dicho ADN, marcando por tanto el grado de genotoxicidad presente en el tipo de célula empleada (Olive & Banath, 2006).

Método:

La determinación del daño génico a través de este ensayo se llevó a cabo sobre linfocitos aislados de acuerdo con la metodología descrita por Vera-Ramirez, L. y col. 2012 (Laura Vera-Ramirez et al., 2012). Se realizó una extracción previa de estas células, para lo que se tomaron 10 ml de sangre y se centrifugaron 15 minutos a 3500rpm y 4°C. Tras este periodo, se retiró la fase intermedia donde se localizaban las células blancas con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico y se depositó en un tubo con PBS. Una vez diluidas las células blancas (1:1), se adicionaron 3ml de Histopaque 1077 (Sigma Aldrich, EE.UU). Este compuesto presenta una densidad similar a la de los linfocitos y ambas densidades difieren a la del PBS de tal forma que, por gradiente, se produce la migración de dichas células al Histopaque. Para facilitar el proceso, se centrifugaron los tubos a 700 x g durante 30 minutos. Finalizado el tiempo, se retiraron los linfocitos y se transfirieron a un tubo con 3ml de PBS que se sometió a otra centrifugación a 700 x g durante 15 minutos, obteniendo un sedimento con los linfocitos aislados que fueron resuspendidos en una mezcla conservadora de suero bovino fetal y DMSO (Dimetil sulfóxido) (9:1). Esta suspensión se congeló en tubos a -80°C, de forma gradual, gracias al empleo de una cámara de congelación Criobox y 2-propanol. Este alcohol facilita una congelación progresiva de 1°C por minuto hasta alcanzar los -80°C.

Una vez extraídas las células, se mantuvieron a -80°C hasta el día de su utilización en el ensayo comet. Para llevar este ensayo a cabo, se descongelaron los tubos y se homogenizaron por inversión, tomando $10\ \mu\text{l}$ de la suspensión que fueron transferidos a tubos eppendorf con PBS a 4°C . Posteriormente, se centrifugaron a $200 \times g$ durante 3 minutos a 4°C . Finalizado este tiempo, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los linfocitos en $85\ \mu\text{l}$ de una solución de agarosa de bajo punto de fusión. Esta mezcla fue pipeteada sobre un gel de agarosa de elevado punto de fusión adherida a un portaobjetos y se dejó enfriar durante 5 minutos a 4°C con un cubreobjetos, quedando finalmente los linfocitos suspendidos en un gel sólido de agarosa unido al portaobjeto. Tras este proceso, se retiraron los cubreobjetos y se lisaron las células con ayuda de un tampón de lisis durante al menos una hora. A continuación, se sometió a las células a un tratamiento alcalino durante 40 minutos en oscuridad y a 4°C . Una vez transcurrida esta fase, se realizó una electroforesis en cubeta horizontal durante 30 minutos a 39 V y un máximo de 300mA. Tras esto, se introdujeron en una solución de neutralización y finalmente fueron teñidos con DAPI y mantenidos en humedad a 4°C y oscuridad.

Resultados:

El conteo y lectura de los cometas se llevó a cabo empleando un microscopio de fluorescencia Leica y el software Kinetic Imaging Komet 5.5. Se contabilizaron un total de 100 cometas por cada gel y se determinó el porcentaje de ADN en cabeza del cometa, el porcentaje de ADN en cola y el parámetro OTM (Olive Tail Moment), que marcan el grado de daño genotóxico.

2.7.5 Determinación del sistema de defensa antioxidante plasmático:

2.7.5.1 Capacidad antioxidante total del plasma:

Fundamento:

La capacidad antioxidante total en plasma se ha postulado como un marcador de supervivencia en cáncer de mama (L. Vera-Ramirez et al., 2011), motivo por el cual se incorporó como determinación clave en este proyecto. Este ensayo se basa en el principio por el cual el ABTS (2,2'-azino-di-[sulfonato de 3-etilbenzotiazolina]), tras una incubación de 18 horas con persulfato potásico, produce un catión radical ABTS*. Éste presenta un color azul-verde intenso relativamente estable, que puede medirse a 600 nm. Los antioxidantes presentes en el plasma suprimen esta producción de color en un grado proporcional a su concentración en la muestra, debido a la interacción de dichos antioxidantes con el radical anteriormente citado, promoviendo su desaparición del medio y, por tanto, de su color característico. TROLOX (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) es un antioxidante análogo de la vitamina E que disminuye el color verde-azul asociado al ABTS*.

Método:

Este método ha sido amplia y detalladamente descrito en la bibliografía (Re et al., 1999). Para llevarlo a cabo, primeramente se elaboró la solución madre de ABTS* mezclando ABTS y persulfato potásico durante 18 horas en agitación y protegido de la luz. Este radical ABTS* se expuso a distintas concentraciones del antioxidante TROLOX y se trazó la curva patrón para establecer los equivalentes TROLOX correspondientes a la capacidad antioxidante total de la muestra. En cada pocillo de la microplaca se dispensaron 4 µl de plasma diluido o patrón y a continuación se le adicionaron 196µl de solución ABTS radicalaria. Inmediatamente después, se agitó con ayuda de un agitador de placas y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Finalizado este tiempo, se procedió a la lectura de la densidad óptica a 734nm.

Resultados:

Se introdujeron los resultados de DO de las muestras y patrones en la aplicación informática online Myassays (www.myassays.com). Esta aplicación trazó la curva estándar correspondiente a la densidad óptica de los patrones y extrapoló los valores de DO de las muestras sobre dicha curva, obteniendo finalmente los resultados de capacidad antioxidante total del plasma expresados como µmol/L TROLOX.

2.7.5.2 Vitaminas liposolubles

Fundamento:

La determinación de antioxidantes liposolubles plasmáticos se llevó a cabo empleando un tándem UPLC-MS/MS (Ultra-performance liquid-chromatography tandem mass spectrometry), de acuerdo con la metodología descrita por Ramirez-Tortosa MC. y col. (Ramirez-Tortosa et al., 2008). Para llevar a cabo la cuantificación de estos antioxidantes se realizó una extracción previa a la separación por cromatografía y su posterior determinación a través de espectrometría de masas. Estos antioxidantes liposolubles engloban a vitaminas, coenzimas y carotenoides.

Método:

Los antioxidantes liposolubles plasmáticos se cuantificaron realizando dos procedimientos seriados: extracción y análisis por UPLC-MS/MS. La primera etapa se llevó a cabo empleando 100 µl de plasma a los que se les adicionó otros 100µl de solución de SDS 2%, mezclándolos enérgicamente con ayuda de un vórtex. A continuación, se le adicionaron 400µl de una mezcla al 95% de etanol e isopropanol y se agitó durante 1 minuto, dejando reposar en hielo 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se incorporó a la mezcla 1ml de hexano y se agitó vigorosamente en vórtex durante 1 minuto, volviendo a dejar reposar en hielo otros 5 minutos. Posteriormente, se procedió a la centrifugación a 4°C durante 10 minutos y a una velocidad de 2200 x g. Concluida esta etapa, se recogió la fase superior y se llevó a un tubo de polipropileno, mientras que sobre la fase inferior se llevó a cabo una segunda extracción con las mismas condiciones a las anteriormente

descritas, obteniendo así todos los compuestos liposolubles extraídos en la fase de hexano retirada. Finalmente, el hexano fue evaporado en speed-vacuum (45 °C entre 25-30 minutos), obteniendo un extracto seco que se conservó a -80 °C. Estos extractos fueron descongelados y reconstituidos en 250µl de isopropanol el día en que se procedió a su análisis por UPLC-MS/MS.

La segunda etapa en la determinación de los antioxidantes liposolubles se llevó a cabo empleando el equipo UPLC Acquity H-Class acoplado a un detector de triple cuadrupolo Xevo TQ-S (Waters Corporation, Milford, EE.UU.). Para la separación cromatográfica se usó un gradiente isocrático con una fase móvil de metanol y ácido fórmico (0,1% (v / v) y una velocidad de flujo de 600µl/min. La columna utilizada fue Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm, 2,1x100 mm (Waters Corporation, Milford, EE.UU.). Ésta se mantuvo a 40 °C y se realizó una inyección de 10 µl. La espectrometría de masas, a su vez, operó por ionización química a presión atmosférica (IQPA) en modo de iones positivos. Para aumentar la sensibilidad y la selectividad, se hicieron varios análisis de espectrometría de masas en monitoreo de reacción múltiple (MRM). Los parámetros MS/MS se optimizaron individualmente utilizando soluciones estándar de Sigma-Aldrich (98% de pureza mínima. Grado HPLC), preparando una solución de stock de 1000 mg/L en metanol para cada uno.

Las transiciones de las moléculas seleccionadas fueron:

- Vitamina A: 269 287> 92.924 (cuantificación), 269 287> 80 777 (calificación)
- Vitamina E: 431 415> 165 022 (cuantificación), 431 415> 136 975 (calificación)
- β-Caroteno: 537 606> 104 959 (cuantificación), 537 606> 94 928 (calificación)
- Coenzima Q9: 795 713> 197 094 (cuantificación) 795 713> 94 926 (calificación)
- Coenzima Q10: 863 777> 197 036 (cuantificación), 863 777> 94 928 (calificación)

Los parámetros instrumentales fueron:

- Corona voltaje de la descarga: 3.80 kV
- Temperatura-fuente: 150 °C
- La temperatura de la sonda: 500 °C
- Flujo gas-cono: 150L/h
- Desolvatación flujo de gas: 500 L/h
- Colisión flujo de gas: 0,18 ml / min
- Nebulizador de flujo de gas: 7,0 bar.

El nitrógeno (>99,995%) se utilizó como gas de desolvatación y el Argón (99,995%) como gas de colisión.

Resultados:

El procesamiento de los datos se realizó en condiciones de tiempo segmentado basado en la separación cromatográfica de los compuestos estudiados con el fin de maximizar la sensibilidad de la detección, empleando el software MassLynx 4.1. (Waters Corporation, Milford, EE.UU.).

2.7.5.3 Determinación de actividad SOD

Fundamento:

Uno de los radicales de oxígeno más relevantes en la generación de estrés oxidativo celular es el anión superóxido. De forma fisiológica existen enzimas capaces de catalizar la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, como la SOD, que supone una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno. Para la determinación de su actividad, se empleó el kit colorimétrico DetectX[®] Superoxide Dismutase Colorimetric Activity Kit de la casa comercial Arbor Assay (Arbor Assay, Michigan, EE.UU.), capaz de medir la actividad de distintos tipos de SOD, incluyendo Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y Fe-SOD. Este ensayo se basa en la formación de superóxido en presencia de oxígeno a partir de la adición de un sustrato que es catalizado por la enzima xantina oxidasa (XO). Esta transformación, genera un producto de coloración amarilla que puede detectarse espectrofotométricamente a 450 nm. Un mayor nivel de SOD en la muestra provoca una disminución en la concentración de superóxido y por tanto una reducción de coloración amarilla.

Método:

La determinación de la actividad SOD se llevó a cabo según lo indicado por el fabricante (Arbor Assays, 2011-2015). El primer paso realizado fue la reconstitución de una solución madre liofilizada de la enzima SOD. A partir de esta, se elaboró una curva patrón con distintos grados de actividad SOD. A continuación, se pipetearon 10 µl de muestra, patrón y blanco en los correspondientes pocillos de una microplaca de media área y se les adicionaron 50 µl de sustrato y 25 µl de la enzima XO, dejando incubar posteriormente la placa durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo, se leyó la placa en un espectrofotómetro a 450nm.

Resultados:

Los resultados de actividad SOD se obtuvieron gracias a la herramienta informática online propuesta por la casa comercial Arbor Assays (<http://www.myassays.com/arbor-assays-superoxide-dismutase-colorimetric-activity-kit.assay>). Para ello, los valores de DO obtenidos en la lectura se introdujeron en una base de datos que configuró una curva de 4 parámetros de actividad SOD en U/ml frente a la DO corregida respecto a los valores de DO del blanco. Los resultados generados venían expresados en unidades de actividad (U), que viene definida como “cantidad de enzima que causa la mitad de la inhibición máxima de la reducción de 1,5mM de Nitroazul tetrazolio en presencia de riboflavina, a

25°C y a un pH de 7,8". Finalmente, los resultados de actividad de SOD fueron normalizados por concentración de proteínas totales, obteniendo la actividad específica de SOD en U_{SOD} por miligramos de proteína.

2.7.5.4 Determinación de actividad Catalasa (CAT)

Fundamento:

La catalasa es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua utilizando el grupo hemo y manganeso como cofactores. El peróxido de hidrógeno se genera fisiológicamente y tiene, entre otras funciones, una prioritaria de defensa celular. Debido su capacidad oxidante, es capaz de dañar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (a través de la formación de radicales hidroxilos entre otros), por lo que su eliminación debe hacerse de forma rápida y eficiente hacia productos menos tóxicos o inocuos. Para la determinación cuantitativa de la actividad catalasa se empleó el kit DetectX® Catalase Colorimetric Activity Kit, de la casa comercial Arbor Assay (Arbor Assay, Michigan, EE.UU.), siguiendo las recomendaciones descritas por el fabricante (Arbor Assays, 2012-2015). Este kit se basa en la determinación espectrofotométrica a 560 nm de un producto de coloración rosácea generado por la reacción de una peroxidasa de rábano con un sustrato incoloro en presencia de peróxido de hidrógeno. Un mayor nivel de catalasa en las muestras provoca una disminución en la concentración de H_2O_2 y, por tanto, una reducción en el producto coloreado.

Método:

El primer paso realizado fue la reconstitución de una solución madre liofilizada de la enzima CAT. A partir de esta, se elaboró una curva patrón con distintos grados de actividad. A continuación, se pipetearon 25 μ l de muestra, patrón y blanco en los correspondientes pocillos de una microplaca de media área y se les adicionó 25 μ l de tampón de trabajo y 25 μ l de solución de peróxido de hidrógeno. Seguidamente, se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos y, tras este periodo, se incorporaron 25 μ l de reactivo de detección colorimétrica. Terminado este proceso, se inició la reacción por adición de 25 μ l de solución de peroxidasa de rábano y se dejó incubando la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo, se leyó la placa en un espectrofotómetro a 560nm.

Resultados:

Los resultados de actividad CAT se obtuvieron gracias a la herramienta informática online propuesta por el fabricante (<http://www.myassays.com/arbor-assays-catalase-colorimetric-activity-kit.assay>). Para ello, los valores de DO obtenidos en la lectura se introdujeron en una base de datos que configuró una curva de 4 parámetros de actividad CAT en U/ml frente a la DO corregida respecto a los valores de DO del blanco. Los resultados generados venían expresados en unidades de actividad (U). Finalmente, los resultados de actividad de CAT fueron normalizados por concentración de proteínas

totales, obteniendo la actividad específica de CAT en U_{CAT} por miligramos de proteína.

2.7.6 Determinación de Secreted Frizzled Related Protein 4 (SFRP-4)

Fundamento:

La proteína SFRP-4 forma parte de una familia de proteínas denominadas genéricamente como Sfrps (Secreted Frizzled-Related Proteins), que actúan como moduladores de la ruta Wnt, uniéndose directamente a wnt, evitando así su unión a los receptores específicos y regulando la proliferación celular. Existe suficiente evidencia científica para argumentar que la proteína sfrp-4 está relacionada con los procesos carcinogénicos de tumores mamarios (Granados-Principal et al., 2011) y ováricos (Jacob et al., 2012). Para determinar la presencia en plasma de la proteína sfrp4, se utilizó el kit Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Secreted Frizzled Related Protein 4 (SFRP4) de la casa comercial Cloud-Clone Corp (Cloud-Clone Corporation, Houston, EE.UU), empleando las condiciones descritas en la bibliografía (F. Liu et al., 2015). Este kit se basa en la interacción de la proteína Sfrp-4 presente en la muestra con un anticuerpo primario específico. Esta unión forma un complejo que es reconocido por un anticuerpo secundario conjugado con HRP, responsable de la formación de coloración por catálisis de un sustrato. Este color es directamente proporcional a la concentración de Sfrp4 de la muestra y puede medirse espectrofotométricamente a 450nm.

Método:

El primer paso realizado fue la reconstitución de los patrones liofilizados proporcionados por el fabricante, a partir de los cuales se preparó una curva estándar. A continuación, se pipetearon 100 μ l de muestra, patrón y blanco en los correspondientes pocillos de la microplaca proporcionada por la casa comercial, dejando incubar durante 2 horas a 37°C. Finalizado este tiempo, se adicionaron 100 μ l del reactivo de detección A que contenía el anticuerpo primario y se dejó incubando durante 1 hora a 37°C, tras lo cual se lavó la placa 3 veces con el tampón de lavado correspondiente. Completado este proceso, se agregaron 100 μ l del reactivo de detección B (anticuerpo secundario conjugado) y se volvió a incubar 30 minutos a 37°C, lavando de nuevo 5 veces al finalizarse la última incubación. El siguiente paso fue la adición de 90 μ l de sustrato. La placa se mantuvo a 37°C durante 25 minutos en oscuridad, generándose así una coloración azul intensa que viró a amarillo tras la adición de 50 μ l de solución de parada. Finalmente, la absorbancia de la placa fue leída en un espectrofotómetro a 450 nm.

Resultados:

La concentración final de Sfrp4 de las muestras se determinó incorporando los resultados de DO obtenidos en la herramienta informática online MyAssays (www.myassays.com). Con esta aplicación se trazó una curva patrón de 4 parámetros y se extrapolaron los valores de DO correspondientes al plasma, obteniendo así los valores

de concentración de Sfrp4 expresados en pg/ml. Los resultados finales se generaron tras la normalización de los valores de concentración de Sfrp4 plasmática respecto a los valores de concentración de proteínas totales en plasma, quedando finalmente expresada como pg de Sfrp4 por mg de proteína.

2.7.7 Variables histopatológicas y bioquímicas

A lo largo de todo el ensayo clínico, se tomaron muestras plasmáticas destinadas a determinaciones analíticas generales. Todos los resultados obtenidos de las analíticas rutinarias de estas pacientes fueron procesados y almacenados en una base de datos codificada por el hospital. Entre estos parámetros, encontramos los relativos a los perfiles bioquímicos y hepáticos obtenidos a través de un equipo Beckman Coulter AV5800 (Beckman Coulter Inc., CA, EE.UU) por la Unidad de Gestión Clínica de Análisis Clínicos del Complejo Hospitalario de Jaén. Los datos de ambos perfiles fueron adquiridos a través de un facultativo experto que supervisó la toma y adquisición de los mismos.

2.7.7.1 Determinación inmunohistoquímica de la proliferación celular mediante ki67, determinación de receptores hormonales del tumor (Estrógenos [RE] y Progesterona [RP]) y estado del HER-2

Fundamento:

De forma general, la reacción de inmunotinción se basa en la adicción a la muestra de un anticuerpo primario que reconoce un antígeno específico en la superficie del corte histológico. Una vez llevada a cabo la reacción antígeno-anticuerpo, se añade una solución bloqueante con el objetivo de neutralizar las peroxidasas endógenas contenidas en la muestra y minimizar la inmunotinción inespecífica, pues el sistema de inmunodetección se basa en la unión al complejo antígeno-anticuerpo de un polímero compuesto de un esqueleto de dextrano al que se acoplan hasta 100 moléculas de peroxidasa de rábano y hasta 20 moléculas de anticuerpo secundario anti-ratón/conejo (solución de detección).

Método:

La determinación de estas variables se llevó a cabo según la metodología establecida previamente por miembros del grupo de investigación y como queda reflejada en la bibliografía (Sanchez-Munoz et al., 2013). Para ello, la muestra se adhirió primeramente a un portaobjetos. Después, se procedió a la recuperación o desenmascaramiento antigénico, utilizando un equipo automático de recuperación antigénica que constaba de dos tanques con tampón de desenmascaramiento diluido en agua destilada (dilución 1:10), a pH 6. Posteriormente, se dispusieron las muestras en una

gradilla y se sumergieron en el tampón. Tras introducir los tanques en la cámara del equipo, se programó el desenmascaramiento antigénico según los siguientes parámetros:

- Pre-tratamiento: aumento gradual de la temperatura de 23°C a 97°C.
- Desenmascaramiento: 97°C durante 20 minutos.
- Enfriamiento: disminución gradual de la temperatura de 97°C a 65°C.

El tampón de desenmascaramiento fue entonces sustituido por un tampón de lavado diluido con agua destilada (dilución 1:10), donde se incubaron los portaobjetos durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Para la inmunotinción se empleó un equipo automático y software específico. En primer lugar, se programó el equipo según el protocolo especificado para Ki-67 (clona SP6, Master Diagnóstica, S.L., Granada, España), RE (clona SP1, Master Diagnóstica, S.L., Granada, España) o RP (clona SP2, Master Diagnóstica, S.L., Granada, España) y HER-2 (HERCEPTEST, Dako S.L. Copenague, Dinamarca) siendo todos ellos anticuerpos prediluidos. Una vez hecho esto, el mismo equipo estableció los reactivos y el orden en el que éstos debían ser cargados en el reservorio. Por último, se añadió el sustrato, consistente en una solución de 3,3'-diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB) que fue previamente diluida en un tampón orgánico comercial (dilución 1:50), y una solución de hematoxilina específica para el equipo de inmunotinción. La peroxidasa acoplada al polímero cataliza la peroxidación de la DAB, que viró a un color marrón en el lugar de unión del antígeno con el anticuerpo. La hematoxilina tiñe el núcleo de las células.

Para finalizar, los portaobjetos fueron extraídos de la cámara del equipo automático de inmunotinción, ordenados en una gradilla e introducidos en un tanque con agua destilada. El tanque con los portaobjetos se ensambló en la cámara de un equipo teñidor automático con el objetivo de deshidratar y parafinar las muestras, por lo que se programó para llevar a cabo exclusivamente estas dos tareas, que implicaron 3 lavados consecutivos en soluciones etanólicas al 70%, 80% y 100% y dos inmersiones en isoparafina. Los portaobjetos fueron transferidos a un equipo montador automático.

Dado que estos procedimientos se utilizan de rutina en el diagnóstico del cáncer de mama, en todos los casos, se incluyó un control positivo para garantizar la correcta realización de la misma y sólo se introdujeron controles negativos cuando estaba establecido según protocolos de calidad de la UGC de Anatomía Patológica.

Resultados:

Tras la inmunotinción, se procedió al análisis microscópico en el que las muestras fueron evaluadas por dos patólogos expertos dedicados a la patología mamaria, las discrepancias fueron debatidas entre ambos llegando a acuerdo.

La valoración de los receptores hormonales se realizó mediante estimación semicuantitativa del porcentaje de células (núcleos teñidos) valorando toda la muestra expresando su resultado en porcentaje de células teñidas sobre el total de células tumorales. Además se estimó la intensidad de tinción según la siguiente escala: 0 =

ausencia de tinción; 1 = tinción nuclear débil; 2 = Tinción moderada; 3 = Tinción fuerte). Se consideró positividad cuando el porcentaje superó el 10% de células independientemente a la intensidad de la misma.

La valoración del Ki-67 se realizó mediante estimación semicuantitativa del porcentaje de células (núcleos teñidos) valorando al menos cuatro áreas de la muestra que incluían todas las zonas de mayor expresión (Hot Dot). Cuando el porcentaje estimado se encontraba en la horquilla entre 10-25%, y puesto que el punto de corte utilizado para subclasificar el fenotipo luminal en A y B era el 14%, se procedió aun contaje automatizado, captando las áreas a medir y contando al menos 500 células. La evaluación del estado HER-2 se realizó según las nuevas recomendaciones para diagnóstico de HER-2 de la ASCO/CAP publicadas en JCO 2013; 31:3997-4013: NEGATIVO (valor 0: ausencia de tinción o valor 1: tinción apenas perceptible de < 10% de células tumorales); POSITIVO (valor 3: >10% de células tumorales con tinción completa de membrana e intensidad fuerte); EQUÍVOCO (Valor 2:>10% de células tumorales con tinción de membrana débil o moderada o <10% con tinción fuerte). Para estos casos, se realizó técnica de FISH para estudio de amplificación del gen HER-2 (Sonda ON ERBB2, Her2/Neu (17q12)/SE17, Master Diagnóstica, S.L., Granada, España) mediante el contaje de al menos 20 células y siguiendo también las recomendaciones sobre valoración recogidas en el artículo anteriormente citado.

2.7.8 Determinación plasmática de Hidroxitirosol:

Fundamento:

La determinación plasmática de los derivados del hidroxitirosol aporta la información necesaria para conocer si las pacientes han ingerido el suplemento de HT diariamente sirviendo de control los niveles hallados para las pacientes que han ingerido el placebo.

Método:

El proceso de determinación de los niveles plasmáticos de HT se llevó a cabo a partir de una extracción inicial de los compuestos fenólicos presentes en plasma y la posterior cuantificación de los derivados del HT a través de HPLC MS/MS.

La extracción de los compuestos fenólicos plasmáticos se realizó utilizando un sistema de extracción en fase sólida (SPE). Para ello, se emplearon los cartuchos OASIS HLB 200 mg (Waters Corp., Milford, MA), de acuerdo con lo descrito previamente por Suarez, M y col. (Suarez et al., 2009). El acondicionamiento de los cartuchos se realizó añadiendo secuencialmente 5 ml de metanol y 5 ml de agua milliQ acidificada con ácido acético a pH 2. Las extracciones se realizaron cargando 1 ml de plasma, previamente mezclado con 50 µl de ácido cafeico (IS) (2 mg/l) y 20 µl de ácido fosfórico al 85% para romper los enlaces entre las proteínas y compuestos fenólicos. Los cartuchos cargados se lavaron con 1 ml de agua milliQ y 2 ml de metanol al 5%. Finalmente, los compuestos

fenólicos retenidos se eluyeron con 5 ml de metanol y se adicionaron 20 µl de ácido ascórbico 1% para evitar el daño oxidativo. Con el fin de preconcentrar los analitos, el disolvente de elución se evaporó bajo una corriente de nitrógeno en una unidad de evaporación en 30 °C (PIERCE Modelo 18780, IL, EE.UU.) y se reconstituyó con 100 µl de metanol. Todos los extractos se filtraron a través de un filtro de nylon de 0,22 micras (Sigma-Aldrich, Barcelona, España).

La determinación de los compuestos derivados del HT a nivel plasmático se realizó mediante cromatografía líquida (Agilent Technologies 1200, San José, CA, EE.UU.) acoplada a ionización por electrospray en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Agilent Technologies 6420, San José, CA, EE.UU.). Para el análisis se inyectaron 2 µl del extracto obtenido previamente. La separación cromatográfica se realizó en una columna de fase reversa C18 (2,1 x 50 mm, 1,8µm); Agilent Technologies, San Jose, CA, EE.UU.) usando un caudal de 0,2 ml/min durante 19 minutos (0-5 min 0 % de B, 5 a 8 min de 0% de B a 30% B, 8-9 min desde 30% de B a 100% B, 8 a 12 min 100% de B, 12 a 13 min forma 100% de B a 0% de B, 13 a 19 min 0% de B), empleando los disolventes A, 0,1% de ácido fórmico, y B, acetonitrilo 0,1% de ácido fórmico. La ionización por electrospray se llevó a cabo tanto en modo de ion positivo y negativo (dependiendo del metabolito que se pretendía determinar) usando nitrógeno a una presión de 50 psi para el nebulizador con un caudal de 12 L/min y 325 ° C.

Resultados:

Para detectar los metabolitos individuales, se realizó una monitorización de reacción múltiple (MRM) tanto en el modo de iones negativos como positivos. Para ello, se empleó una energía de colisión y un voltaje fragmentador optimizados e individuales (aplicación Optimizer, MassHunter, Agilent Technologies, San Jose, CA, EE.UU.). Las transiciones de MRM se consiguieron mediante la inyección de flujo de los estándares puros. Finalmente, se compararon con la literatura. La determinación de pico y la integración del área del pico se realizaron con Mass Hunter Qualitative Analyses (Agilent Technologies, San Jose, CA, EE.UU)

2.8 *Material empleado:*

2.8.1 *Elementos 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 Precision, SL. Barcelona, España).
- **Balanza electrónica de precisión** SARTORIUS BP110S (Sartorius AG, Göttingen, Alemania).

- **Baño seco digital** (LABNET INTERNATIONAL, Inc. Woodbridge, NJ, EEUU).
- **Baño termostatzado de metacrilato P-SELECTA** (JP-Selecta, SA. Barcelona, España).
- **Calibre electrónico** pie de rey digital AFORA (Afora, S.A. Barcelona, España).
- **Cámara HITACHI** (Standard Video with Meteor II).
- **Centrífuga** 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).
- **Cubetas de electroforesis** CONSORT (Belgium).
- **Detector de diodo array** (System Gold Diode Array Detector Module 168) BECKMAN (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, EEUU).
- **Detector electroquímico coulométrico** ESA Coulochem III (ESA Biosciences, Inc. Chelmsford, MA, EEUU).
- **Estufa** MEMMERT (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Alemania).
- **Fuente de alimentación** CONSORT E802 (300V-2000mA) (Bélgica).
- **Inyector automático** WATERS™ 717 Plus (Waters Corporation, Milford, MA, EEUU).
- **Lector de microplacas** SYNERGY HT, Multi-Detection Microplate Reader, BIO-TEK (BioTek Instruments, Inc. Highland Park, Vermont, EEUU).
- **Máquina productora de hielo** SCOTSMAN AF-10 (Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, EEUU).
- **Microcentrífuga** para eppendorfs HETTICH EBA12 ZENTRIFUGEN (HettichLab GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Alemania).
- **Micropipetas electrónicas** EPPENDORF RESEARCH® PRO. EPPENDORF AG (Hamburgo, Alemania).
- **Microscopio-UV** Leica DMLS con filtro de excitación de 435nm, y amplificador de 400 (Leica Microsystems. Nusstoch, Alemania).
- **pH-metro** GLP 21, CRISON (Barcelona, España).
- **Pipetas automáticas** NICHIPET EX (Nichiryo, Tokio, Japón).
- **Vortex** VWR (VWR International Eurolab S.L. Barcelona, España).

2.8.2 *Software específico.*

- **Gene Five** para lector de microplacas SYNERGY HT, BIO-TEK (BioTek Instruments, Inc. Highland Park, Vermont, EEUU).
- **Kinetic Imaging Komet 5.5** (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, Reino Unido).
- **SPSS 15.0** para Windows.
- **System Gold® HPLC** (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, EEUU).

2.8.3 *Material para el estudio anatomopatológico*

- **Agua destilada** estéril (Fresenius Kabi AG, Sevres, Francia).
- **Baño histológico** para inclusión en parafina Termofin (JP Selecta, Barcelona, España).
- **Cuchillas** para microtomo de 250 µm de grosor (Feather Safety Razor Co, Ltd, Osaka, Japón).
- **Equipo de inmunotinción** automática Autostainer Plus Link (Dako Denmark A/S, Dinamarca).
- **Equipo de recuperación antigénica** PT Link (Dako Denmark A/S, Dinamarca).
- **Equipo de tinción** automática Leica Autostainer XL (Leica, Wetzlar, Alemania).
- **Estufa** Incubat (JP Selecta, Barcelona, España).
- **Etanol 100%** (Etanol absoluto parcialmente desnaturalizado QP, Panreac Química SA, Barcelona, España).
- **Hematoxilina** para tinción inmunohistoquímica Dako Automation Hematoxylin Histological Staining Reagent (Dako Denmark A/S, Dinamarca).
- **Isoparafina H** (Isoparafina H -Sustituto de Xileno- DC, Panreac Química SA, Barcelona, España).
- **Medio de montaje** (Medio de Montaje para sustitutos de xileno DC, Panreac Química SA, Barcelona, España).
- **Microscopio óptico** ECLIPSE E600 (Nikon Co., Tokio, Japón).
- **Microtomo** Leica RM2235 (Leica, Wetzlar, Alemania)
- **Montador automático** Leica CV5030 (Leica, Wetzlar, Alemania).
- **Placa fría** Leica EG1150C (Leica, Wetzlar, Alemania)

- **Portaobjetos** para inmunohistoquímica Dako REAL™ Capillary Gap Microscope Slides (Dako Denmark A/S, Dinamarca).
- **Sistema de detección** inmunohistoquímica Dako Real™ EnVision System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Dako Denmark A/S, Dinamarca).
- Software para el equipo de inmunotinción automática DakoLink, versión 1.5.2.1 (System Dynamics, New Jersey, USA)
- **Solución bloqueante** de peroxidasa DakoCytomation 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 6 (Dako Denmark A/S, Dinamarca).
- **Tampón de desenmascaramiento** antigénico Dako Target Retrieval Solution, pH 9 (Dako Denmark A/S, Dinamarca).

CAPÍTULO 3 RESULTADOS

El análisis de los resultados obtenidos se llevó a cabo aplicando un Modelo Lineal General (MLG) de Medidas Repetidas teniendo en cuenta como factor intra-sujetos el tiempo y como factor inter-sujetos el grupo de tratamiento. Para ello, se asumió la normalidad de los datos, a pesar del escaso tamaño de muestra. En cada test se estudió la esfericidad de la matriz de varianzas-covarianzas y se tuvieron en cuenta los resultados de los test correspondientes. De esta forma, se obtuvo, para cada una de las variables, el p valor correspondiente a ambos grupos de tratamiento en los puntos temporales T1, T2 y T3, relativos a la variación durante el tratamiento con quimioterápicos de la terapia neoadyuvante. Los resultados estadísticamente significativos se consideraron a partir de $p < 0,05$. En la tabla 6 se puede observar un resumen de estos valores, quedando resaltados aquellos estadísticamente significativos. En dicha tabla, encontramos tres columnas diferenciadas en función de dónde se encontró la diferencia significativa. En la mayoría de los casos, sólo se obtuvieron diferencias a lo largo del tiempo y pocas diferencias significativas por grupo o en la interacción tiempo x grupo (tratado o no con HT).

Estos resultados, hicieron postular una nueva forma de enfocar el estudio, contemplándose un único grupo, independientemente de que estuviesen tratados o no con HT. Este hecho podría deberse a la escasez de tamaño muestral obtenido hasta la fecha y no al efecto del tratamiento. Los resultados reflejados a continuación tienen como característica principal un enfoque de cómo distintas variables asociadas al estrés oxidativo en pacientes con cáncer de mama se han ido modificando a lo largo del tiempo tras el tratamiento con distintos agentes quimioterápicos (Epirrubicina y ciclofosfamida en primer lugar y taxanos posteriormente) en una terapia neoadyuvante.

Tabla 6. Diferencias observadas en las variables considerando el tiempo, la interacción tiempo x grupo y el grupo a lo largo del tratamiento con quimioterápicos (T1, T2 y T3).

Variable	Tiempo	Tiempo*Grupo	Grupo
OTM	0,842	0,095	0,008
8-Hidroxiguanosina	0,051	0,930	0,547
Lípidos totales	0,000	0,172	0,845
Proteínas totales	0,300	0,059	0,155
TAC	0,000	0,063	0,179
AOPP/Proteínas	0,910	0,601	0,750
Catalasa/Proteínas	0,192	0,236	0,172
Isoprostanos/Lípidos totales	0,000	0,782	0,218
NEFA/Lípidos totales	0,200	0,632	0,288
Actividad SOD/Proteína	0,067	0,236	0,075
Proteínas carbonilo/Proteínas	0,064	0,086	0,183
Sfrp4/Proteínas	0,000	0,318	0,427
AGE/Proteínas	0,067	0,585	0,124
Vitamina A/Lípidos totales	0,285	0,679	0,447
Vitamina E/ Lípidos totales	0,016	0,874	0,234
Co9Q/ Lípidos totales	0,098	1,000	1,000
Co10Q/ Lípidos totales	0,068	0,348	0,311
Caroteno/ Lípidos totales	0,073	0,149	0,719
Glucosa	0,005	0,790	0,644
Urea	0,375	0,704	0,584
Creatinina	0,001	0,710	0,290

Ácido Úrico	0,055	0,037	0,914
Colesterol total	0,071	0,713	0,081
GGT	0,000	0,742	0,454
Bilirrubina total	0,001	0,557	0,727
Bilirrubina indirecta	0,083	0,718	0,106
Bilirrubina directa	0,067	0,714	0,844
Fosfatasa alcalina	0,005	0,242	0,930
Lactato deshidrogenasa	0,017	0,255	0,504
Sodio	0,118	0,003	0,468
Potasio	0,025	0,385	0,688
Calcio	0,898	0,560	0,576
IL-6	0,892	0,828	0,260
PGE-2	0,412	0,662	0,735
HDL	0,017	0,493	0,047
LDL	0,018	0,401	0,030
GPT	0,002	0,228	0,153
GOT	0,001	0,024	0,856
Triglicéridos	0,010	0,238	0,389

Las diferencias observadas vienen expresadas como valor de p para cada variable y punto temporal.

OTM: Olive Tail Moment

TAC: Total Antioxidant Capacity (Capacidad antioxidante total)

AOPP: Advanced Oxidation Protein Products (Productos avanzados de oxidación proteica)

NEFA: Non-Esterified Fatty Acids (Ácidos grasos no esterificados)

SOD: Superóxido Dismutasa

Sfrp4: Secreted frizzled-related protein 4

AGE: Advanced Glycation End Products (Productos finales de glicosilación avanzada)

CoQ: Coenzima Q

GGT: Gamma glutamil transferasa

IL-6: Interleucina 6

PGE-2: Prostaglandina E2

HDL: High Density Lipoprotein (Lipoproteínas de alta densidad)

LDL: Low Density Lipoprotein (Lipoproteínas de baja densidad)

GPT: Transaminasa glutámico pirúvica o Alanina aminotransferasa

GOT: Transaminasa glutámico oxalacética o Aspartato aminotransferasa

Además del estudio del tratamiento quimioterápico, se contempló cómo actuó el HT, de una forma global, sobre la terapia neoadyuvante completa. En la siguiente tabla (Tabla 7), se muestra de nuevo el p valor de acuerdo con el mismo tratamiento estadístico entre los puntos temporales inicial y al mes de haberse producido el final de la terapia antitumoral completa (T1 y T6 respectivamente), estando remarcados los valores estadísticamente significativos de $p < 0,05$. En esta tabla además se incorporan nuevas variables medidas gracias a la intervención quirúrgica, como son el Grado Bloom y el grado de proliferación celular medido como porcentaje de Ki-67. Al igual que sucedía en el caso anterior, de nuevo se encontró que la mayor parte de resultados se focalizaron en el efecto tiempo, es decir, a lo largo de la terapia completa, con pocos resultados observables asociados al grupo (tratado o no con HT) o a la interacción tiempo x grupo.

Tabla 7. Diferencias observadas en las variables considerando el tiempo, la interacción tiempo x grupo y el grupo desde el estado basal hasta un mes posterior al fin de la terapia antitumoral neoadyuvante (T1 y T6)

Variable	Tiempo	Tiempo*Grupo	Grupo
OTM	0,546	0,299	0,354
8-Hidroxiguanosina	0,001	0,236	0,983
Lípidos totales	0,526	0,047	0,961
Proteínas totales	0,753	0,079	0,360

TAC	0,789	0,584	0,581
AOPP/Proteínas	0,008	0,274	0,486
Catalasa/Proteínas	0,032	1,000	1,000
Isoprostanos/Lípidos totales	0,419	0,429	0,195
NEFA/Lípidos totales	0,047	0,668	0,242
Actividad SOD/Proteínas	0,000	0,396	0,017
Proteínas carbonilo/Proteínas	0,311	0,168	0,110
Sfrp4/Proteínas	0,052	0,104	0,483
AGE/Proteínas	0,000	0,898	0,244
Vitamina A/Lípidos totales	0,192	0,315	0,363
Vitamina E/Lípidos totales	0,230	0,156	0,509
Co9Q/Lípidos totales	1,000	1,000	1,000
Co10Q/Lípidos totales	0,301	0,051	0,762
Caroteno/Lípidos totales	0,235	0,426	0,927
Glucosa	0,291	0,072	0,991
Urea	0,667	0,581	0,644
Creatinina	0,257	0,770	0,448
Ácido Úrico	0,042	0,013	0,075
Colesterol total	0,016	0,459	0,356
GGT	0,004	0,235	0,154
Bilirrubina total	0,021	0,091	0,353
Bilirrubina indirecta	0,000	0,664	0,761
Bilirrubina directa	0,000	0,539	0,584
Fosfatasa alcalina	0,000	0,717	0,414
Lactato deshidrogenasa	0,001	0,113	0,521
Sodio	0,120	0,026	0,147
Potasio	0,579	0,837	0,271
Calcio	0,080	0,407	0,960
IL-6	0,547	0,323	0,596
PGE-2	0,256	0,900	0,563
Grado Bloom	0,005	0,001	0,295
Ki-67	0,000	0,290	0,331
HDL	0,254	0,676	0,948
LDL	0,008	0,242	0,321
GPT	0,020	0,391	0,956
GOT	0,001	0,403	0,791
Triglicéridos	0,001	0,054	0,162

Las diferencias observadas vienen expresadas como valor de p para cada variable y punto temporal

OTM: Olive Tail Moment

TAC: Total Antioxidant Capacity (Capacidad antioxidante total)

AOPP: Advanced Oxidation Protein Products (Productos avanzados de oxidación proteica)

NEFA: Non-Esterified Fatty Acids (Ácidos grasos no esterificados)

SOD: Superóxido Dismutasa

Sfrp4: Secreted frizzled-related protein 4

AGE: Advanced Glycation End Products (Productos finales de glicosilación avanzada)

CoQ: Coenzima Q

GGT: Gamma glutamil transferasa

IL-6: Interleucina 6

PGE-2: Prostaglandina E2

HDL: High Density Lipoprotein (Lipoproteínas de alta densidad)

LDL: Low Density Lipoprotein (Lipoproteínas de baja densidad)

GPT: Transaminasa glutámico pirúvica o Alanina aminotransferasa

GOT: Transaminasa glutámico oxalacética o Aspartato aminotransferasa

En la tabla 8, se puede observar de forma resumida los distintos valores promedios y errores típicos obtenidos para cada una de las variables determinada a lo largo del estudio, incluidos los niveles de derivados del HT a nivel plasmático y para ambos grupos de tratamiento. Debido al elevado número de variables analizadas, se exponen de forma seriada una serie de tablas que recogen el contenido de los resultados obtenidos para: variables asociadas al daño oxidativo a proteínas; variables asociadas al daño oxidativo

sobre lípidos e hidratos de carbono; variables asociadas al daño oxidativo de ácidos nucleicos; variables relacionadas con la defensa antioxidante; concentración de proteína Sfrp-4; variables bioquímicas, inmunológicas e histopatológicas y finalmente la concentración de los distintos derivados del HT en forma de sulfato y glucurónico plasmáticos.

Tabla 8. Variables asociadas al daño oxidativo proteico

Variable	Tiempo	Tratado		Placebo		Total	
Proteínas totales (mg/ml)	T1	50414,74	± 1490,01	57187,50	± 2389,19	53665,66	± 1519,90
	T2	49214,01	± 1866,89	55088,40	± 3103,76	52033,72	± 1839,67
	T3	52665,74	± 2041,37	53426,57	± 2055,36	53014,45	± 1423,30
	T6	52153,17	± 1982,90	52344,54	± 1990,30	52236,37	± 1384,63
AOPP (µmol cloramina/mg proteínas)	T1	5,12E-03	± 6,32E-04	4,07E-03	± 4,23E-04	4,61E-03	± 3,93E-04
	T2	4,60E-03	± 7,71E-04	4,85E-03	± 9,49E-04	4,72E-03	± 5,95E-04
	T3	4,67E-03	± 7,67E-04	4,37E-03	± 8,28E-04	4,53E-03	± 5,51E-04
	T6	6,07E-03	± 6,29E-04	6,15E-03	± 6,38E-04	6,11E-03	± 4,41E-04
Proteínas carbonilo (nmol/mg proteínas)	T1	1,13	± 0,08	0,78	± 0,11	0,96	± 0,07
	T2	0,88	± 0,11	0,85	± 0,10	0,86	± 0,07
	T3	0,81	± 0,08	0,76	± 0,05	0,78	± 0,05
	T6	1,09	± 0,08	1,09	± 0,11	1,09	± 0,07

Los resultados expresan como la media ± EEM (Error estándar de la media) de cada grupo. El grupo tratado es aquel donde se suministró Hidroxitirosol. El grupo placebo es el que no recibió suplementación con Hidroxitirosol. El total viene determinado por los resultados obtenidos para ambos grupos, sin tener en consideración el grupo de asociación. Las variables AOPP y proteínas carbonilo están normalizadas respecto a la concentración de proteínas totales plasmáticas.

AOPP: Advanced Oxidation Protein Products. (Productos finales de oxidación proteica)

De la misma manera que en las variables de naturaleza proteica, en la tabla 9 pueden observarse los distintos resultados de las determinaciones llevadas a cabo para evaluar el daño oxidativo en lípidos e hidratos de carbono a lo largo de la terapia antitumoral para cada grupo de tratamiento.

Tabla 9. Variables asociadas al daño oxidativo a lípidos e hidratos de carbono

Variable	Tiempo	Tratado		Placebo		Total	
Lípidos totales (mg/dl)	T1	750,42	± 39,26	679,33	± 28,30	716,30	± 25,09
	T2	877,38	± 37,32	908,19	± 33,14	892,17	± 24,77
	T3	838,76	± 29,32	865,44	± 47,38	850,99	± 26,42
	T6	703,43	± 33,10	769,22	± 29,18	732,03	± 23,19
Isoprostanos (pg/mg lípidos)	T1	1,79	± 0,25	1,39	± 0,13	1,60	± 0,14
	T2	1,21	± 0,24	0,92	± 0,10	1,07	± 0,13
	T3	1,07	± 0,23	0,83	± 0,08	0,96	± 0,13
	T6	1,78	± 0,65	0,88	± 0,15	1,39	± 0,38
NEFA (mmol/mg lípidos)	T1	3,81E-03	± 8,08E-04	3,09E-03	± 7,50E-04	3,46E-03	± 5,47E-04
	T2	3,33E-03	± 4,92E-04	2,44E-03	± 6,21E-04	2,90E-03	± 3,95E-04
	T3	2,65E-03	± 5,14E-04	2,55E-03	± 2,74E-04	2,60E-03	± 2,99E-04
	T6	2,74E-03	± 4,07E-04	1,65E-03	± 2,82E-04	2,27E-03	± 2,81E-04
AGE (µg/mg proteínas)	T1	2,62	± 0,16	2,35	± 0,17	2,49	± 0,12
	T2	2,90	± 0,18	2,39	± 0,18	2,65	± 0,14
	T3	2,47	± 0,17	2,23	± 0,16	2,36	± 0,12
	T6	1,82	± 0,10	1,65	± 0,09	1,74	± 0,07

Los resultados se muestran como media ± EEM (Error estándar de la media) de cada grupo. En el grupo tratado se suministró Hidroxitirosol. El grupo placebo no recibió suplementación con Hidroxitirosol. El total viene determinado por los resultados obtenidos para ambos grupos, sin valorar el grupo de asociación. Las variables Isoprostanos y NEFA se presentan normalizadas por

concentración de lípidos totales en plasma. La variable AGE se encuentra referenciada frente a la concentración de proteínas totales del plasma.

NEFA: Non-Esterified Fatty Acids (Ácidos grasos no esterificados)

AGE: Advanced Glycation End Products (Productos finales de glicosilación avanzada)

En la tabla 10 quedan resumidos los valores obtenidos en las determinaciones relacionadas con el daño oxidativo en ácidos nucleicos para ambos grupos a lo largo de los distintos puntos temporales.

Tabla 10. Parámetros asociados a daño oxidativo a ácidos nucleicos.

Variable	Tiempo	Tratado	Placebo	Total
OTM	T1	1,34 ± 0,19	0,90 ± 0,12	1,13 ± 0,12
	T2	1,43 ± 0,18	0,67 ± 0,12	1,07 ± 0,13
	T3	1,16 ± 0,18	1,15 ± 0,20	1,16 ± 0,13
	T6	1,25 ± 0,15	1,30 ± 0,28	1,27 ± 0,14
8OH (pg/ml)	T1	5977,26 ± 356,34	5477,16 ± 384,62	5737,21 ± 261,08
	T2	6739,46 ± 470,40	6463,01 ± 648,29	6606,76 ± 388,31
	T3	6554,56 ± 531,42	6232,16 ± 649,69	6406,80 ± 406,26
	T6	7040,18 ± 524,41	7568,14 ± 623,87	7269,73 ± 396,39

Los resultados vienen dados como valor de la media ± EEM (Error estándar de la media) de cada grupo. Al grupo tratado se suministró Hidroxitirosol. El grupo placebo no recibió suplementación con Hidroxitirosol. El total se caracteriza por ser los resultados obtenidos para ambos grupos, sin considerar el grupo.

OTM: Olive Tail Moment

8OH: 8-Hidroxi-2-deoxiguanosina

La tabla 11 muestra un resumen de los valores de las variables asociadas al sistema de defensa antioxidante plasmático para cada grupo de tratamiento de la terapia neoadyuvante.

Tabla 11. Valoración del sistema de defensa antioxidante plasmático

Variable	Tiempo	Tratado	Placebo	Total
TAC (µmol Trolox)	T1	122,35 ± 2,30	121,08 ± 4,37	121,74 ± 2,36
	T2	148,78 ± 5,76	131,41 ± 4,09	140,44 ± 3,93
	T3	118,30 ± 3,26	118,76 ± 1,95	118,51 ± 1,94
	T6	123,93 ± 7,48	117,74 ± 5,59	121,24 ± 4,82
Catalasa (U/mg proteínas)	T1	2,54E-06 ± 4,28E-07	2,23E-06 ± 3,54E-07	2,39E-06 ± 2,76E-07
	T2	2,98E-06 ± 4,46E-07	1,74E-06 ± 2,93E-07	2,38E-06 ± 2,94E-07
	T3	1,91E-06 ± 2,37E-07	1,51E-06 ± 1,98E-07	1,72E-06 ± 1,59E-07
	T6	1,98E-06 ± 3,11E-07	1,27E-06 ± 1,98E-07	1,67E-06 ± 2,06E-07
SOD (U/mg proteínas)	T1	2,00E-02 ± 1,24E-03	1,56E-02 ± 1,44E-03	1,78E-02 ± 1,03E-03
	T2	1,63E-02 ± 2,01E-03	1,22E-02 ± 1,04E-03	1,43E-02 ± 1,21E-03
	T3	1,53E-02 ± 1,57E-03	1,59E-02 ± 1,74E-03	1,55E-02 ± 1,14E-03
	T6	1,33E-02 ± 1,12E-03	1,17E-02 ± 4,67E-04	1,26E-02 ± 6,74E-04
Vitamina A (mg/mg lípidos)	T1	1,31E-05 ± 9,40E-07	1,50E-05 ± 1,25E-06	1,40E-05 ± 7,79E-07
	T2	1,17E-05 ± 6,04E-07	1,32E-05 ± 1,31E-06	1,24E-05 ± 7,06E-07
	T3	1,25E-05 ± 8,72E-07	1,29E-05 ± 1,24E-06	1,27E-05 ± 7,24E-07
	T6	1,64E-05 ± 1,26E-06	1,53E-05 ± 1,08E-06	1,59E-05 ± 8,43E-07
Vitamina E (mg/mg lípidos)	T1	0,76 ± 0,08	0,86 ± 0,09	0,81 ± 0,06
	T2	0,60 ± 0,04	0,64 ± 0,04	0,62 ± 0,03
	T3	0,68 ± 0,03	0,74 ± 0,05	0,71 ± 0,03

	T6	0,96 ± 0,06	0,90 ± 0,04	0,93 ± 0,04
CoQ9 (mg/mg lípidos)	T1	5,89E-06 ± 3,36E-07	6,71E-06 ± 3,40E-07	6,29E-06 ± 2,49E-07
	T2	5,56E-06 ± 2,80E-07	5,55E-06 ± 4,38E-07	5,56E-06 ± 2,50E-07
	T3	5,89E-06 ± 4,44E-07	6,27E-06 ± 4,25E-07	6,07E-06 ± 3,05E-07
	T6	6,83E-06 ± 3,16E-07	6,27E-06 ± 3,27E-07	6,59E-06 ± 2,31E-07
CoQ10 (mg/mg lípidos)	T1	3,32E-05 ± 3,36E-06	4,11E-05 ± 4,55E-06	3,70E-05 ± 2,85E-06
	T2	3,01E-05 ± 2,32E-06	2,84E-05 ± 2,79E-06	2,93E-05 ± 1,77E-06
	T3	3,22E-05 ± 2,43E-06	3,87E-05 ± 4,75E-06	3,52E-05 ± 2,58E-06
	T6	4,57E-05 ± 2,98E-06	3,84E-05 ± 2,40E-06	4,25E-05 ± 2,09E-06
Caroteno (mg/mg lípidos)	T1	3,25E-05 ± 7,68E-06	2,38E-05 ± 7,99E-06	2,83E-05 ± 5,49E-06
	T2	2,15E-05 ± 4,99E-06	2,12E-05 ± 4,60E-06	2,13E-05 ± 3,33E-06
	T3	2,68E-05 ± 5,86E-06	3,64E-05 ± 6,23E-06	3,12E-05 ± 4,29E-06
	T6	3,63E-05 ± 9,13E-06	4,48E-05 ± 1,05E-05	4,00E-05 ± 6,80E-06

Los resultados se muestran como media ± EEM (Error estándar de la media) de cada grupo. En el grupo tratado se suministró Hidroxitirosol. El grupo placebo no recibió suplementación con Hidroxitirosol. El total viene determinado por los resultados obtenidos para ambos grupos, sin valorar el grupo de asociación. Las variables Catalasa y SOD se expresan normalizadas por concentración de proteínas totales del plasma. Las variables vitamina A, vitamina E CoQ9, CoQ10 y caroteno se presentan normalizadas por concentración de lípidos totales en plasma.

TAC: Total Antioxidant Capacity (Capacidad antioxidante total)

SOD: Superóxido dismutasa

CoQ: Coenzima Q

De la misma forma que se hizo en la descripción del material y métodos llevados a cabo durante el ensayo, los resultados de la concentración plasmática de la proteína Sfrp-4 se muestran de forma independiente al resto de las determinaciones, al no poder asociarse directamente con un grupo de variables concretas. Estos valores quedan recogidos en la tabla 12.

Tabla 12. Concentración plasmática de Sfrp-4

Variable	Tiempo	Tratado	Placebo	Total
Sfrp4 (pg/mg proteínas)	T1	5,24E-04 ± 6,23E-05	5,06E-04 ± 7,48E-05	5,15E-04 ± 4,74E-05
	T2	7,89E-04 ± 7,61E-05	8,85E-04 ± 1,23E-04	8,35E-04 ± 7,04E-05
	T3	5,89E-04 ± 7,50E-05	7,42E-04 ± 1,19E-04	6,59E-04 ± 6,82E-05
	T6	5,49E-04 ± 1,07E-04	7,74E-04 ± 1,97E-04	6,47E-04 ± 1,05E-04

Esta variable viene normalizada por concentración de proteínas totales plasmáticas. Viene representada por los valores de la media ± EEM (Error estándar de la media).

Sfrp4: Secreted Frizzled-Related Protein 4.

En la tabla 13 se muestran de forma resumida los resultados de las variables bioquímicas, inmunológicas e histopatológicas.

Tabla 13. Parámetros bioquímicos, inmunológicos e histopatológicos de las pacientes.

Variable	Tiempo	Tratado	Placebo	Total
Glucosa (mg/dl)	T1	93,62 ± 2,47	97,55 ± 3,43	95,42 ± 2,06
	T2	104,83 ± 4,42	103,73 ± 3,20	104,30 ± 2,71
	T3	104,67 ± 5,69	104,00 ± 5,98	104,35 ± 4,03
	T6	103,38 ± 4,91	97,20 ± 3,87	100,70 ± 3,25
Urea (mg/dl)	T1	32,58 ± 1,85	32,00 ± 2,61	32,30 ± 1,54
	T2	32,50 ± 1,96	27,50 ± 2,36	30,00 ± 1,59
	T3	31,83 ± 2,04	29,73 ± 2,02	30,83 ± 1,42
	T6	32,54 ± 1,70	32,20 ± 2,55	32,39 ± 1,43
	T1	0,86 ± 0,04	0,81 ± 0,04	0,83 ± 0,03

Creatinina (mg/dl)	T2	0,79 ± 0,02	0,73 ± 0,03	0,76 ± 0,02
	T3	0,89 ± 0,05	0,85 ± 0,04	0,87 ± 0,03
	T6	0,82 ± 0,03	0,80 ± 0,02	0,81 ± 0,02
Ácido úrico (mg/dl)	T1	4,78 ± 0,35	3,69 ± 0,25	4,28 ± 0,25
	T2	4,96 ± 0,38	4,33 ± 0,73	4,76 ± 0,34
	T3	4,64 ± 0,39	4,32 ± 0,44	4,49 ± 0,29
	T6	4,68 ± 0,29	4,22 ± 0,33	4,48 ± 0,22
Sodio (mEq/L)	T1	140,62 ± 0,62	138,36 ± 0,62	139,58 ± 0,49
	T2	139,92 ± 0,66	141,00 ± 0,49	140,43 ± 0,42
	T3	139,42 ± 0,58	140,45 ± 0,45	139,91 ± 0,38
	T6	140,23 ± 0,47	140,60 ± 0,62	140,39 ± 0,37
Potasio (mEq/L)	T1	4,40 ± 0,09	4,50 ± 0,13	4,44 ± 0,07
	T2	4,20 ± 0,11	4,15 ± 0,14	4,18 ± 0,09
	T3	4,33 ± 0,11	4,27 ± 0,10	4,30 ± 0,07
	T6	4,37 ± 0,09	4,50 ± 0,10	4,43 ± 0,07
Calcio (mg/dl)	T1	9,68 ± 0,15	9,69 ± 0,12	9,68 ± 0,10
	T2	9,86 ± 0,12	9,83 ± 0,13	9,85 ± 0,09
	T3	9,74 ± 0,05	9,85 ± 0,16	9,79 ± 0,08
	T6	9,98 ± 0,06	9,86 ± 0,11	9,93 ± 0,06
Colesterol total (mg/dl)	T1	205,00 ± 7,89	206,00 ± 7,05	205,46 ± 5,25
	T2	224,33 ± 9,32	207,25 ± 12,53	219,08 ± 7,57
	T3	206,33 ± 5,53	209,45 ± 19,58	207,83 ± 9,56
	T6	217,85 ± 7,08	232,90 ± 9,22	224,39 ± 5,76
HDL (mg/dl)	T1	61,17 ± 4,23	61,73 ± 4,06	61,43 ± 2,87
	T2	54,50 ± 3,42	64,25 ± 7,97	57,75 ± 3,56
	T3	52,31 ± 3,68	53,20 ± 3,17	52,70 ± 2,44
	T6	59,62 ± 4,22	59,20 ± 3,64	59,43 ± 2,80
LDL (mg/dl)	T1	122,08 ± 8,39	126,27 ± 7,32	124,08 ± 5,50
	T2	146,88 ± 8,63	109,00 ± 7,77	134,25 ± 8,13
	T3	125,33 ± 4,60	137,33 ± 15,53	130,48 ± 7,06
	T6	130,54 ± 6,26	150,40 ± 11,03	139,17 ± 6,18
Triglicéridos (mg/dl)	T1	117,25 ± 19,58	77,42 ± 6,98	97,33 ± 10,98
	T2	123,25 ± 11,02	150,75 ± 46,00	132,42 ± 16,10
	T3	156,62 ± 25,22	151,80 ± 21,44	154,52 ± 16,68
	T6	133,23 ± 16,23	118,70 ± 10,56	126,91 ± 10,17
Bilirrubina total (mg/dl)	T1	0,54 ± 0,06	0,64 ± 0,10	0,58 ± 0,06
	T2	0,38 ± 0,05	0,28 ± 0,04	0,33 ± 0,03
	T3	0,46 ± 0,04	0,47 ± 0,06	0,47 ± 0,03
	T6	0,50 ± 0,05	0,50 ± 0,07	0,50 ± 0,04
Bilirrubina indirecta (mg/dl)	T1	0,16 ± 0,03	0,19 ± 0,05	0,17 ± 0,03
	T2	0,34 ± 0,05	0,17 ± 0,04	0,29 ± 0,04
	T3	0,37 ± 0,03	0,39 ± 0,05	0,38 ± 0,03
	T6	0,41 ± 0,04	0,41 ± 0,06	0,41 ± 0,03
Bilirrubina directa (mg/dl)	T1	0,38 ± 0,07	0,45 ± 0,11	0,41 ± 0,06
	T2	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01
	T3	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01
	T6	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Fosfatasa ácida (UI/L)	T1	70,69 ± 5,32	61,73 ± 3,06	66,58 ± 3,28
	T2	79,78 ± 6,80	76,00 ± 10,68	78,62 ± 5,51
	T3	96,17 ± 9,23	86,64 ± 4,19	91,61 ± 5,21
	T6	101,15 ± 8,82	93,20 ± 8,31	97,70 ± 6,08
LDH (UI/L)	T1	316,23 ± 20,84	274,27 ± 29,57	297,00 ± 17,78
	T2	576,78 ± 73,38	481,25 ± 82,51	547,38 ± 56,31
	T3	415,25 ± 25,78	392,40 ± 33,67	404,86 ± 20,42
	T6	355,15 ± 17,23	367,70 ± 20,44	360,61 ± 12,94
GGT (UI/L)	T1	18,67 ± 2,10	22,36 ± 4,87	20,43 ± 2,54
	T2	35,00 ± 3,97	44,10 ± 8,30	39,14 ± 4,35
	T3	21,83 ± 2,49	32,09 ± 5,74	26,74 ± 3,16
	T6	23,67 ± 2,42	34,80 ± 6,85	28,73 ± 3,50
GPT (UI/L)	T1	17,50 ± 1,38	18,73 ± 4,27	18,09 ± 2,12

	T2	32,33 ± 4,94	37,00 ± 4,93	34,57 ± 3,45
	T3	24,00 ± 2,86	38,90 ± 8,89	30,48 ± 4,36
	T6	26,85 ± 3,92	24,60 ± 4,65	25,87 ± 2,94
GOT (UI/L)	T1	17,69 ± 0,98	17,33 ± 1,61	17,52 ± 0,91
	T2	26,00 ± 2,95	20,45 ± 1,65	23,35 ± 1,79
	T3	24,85 ± 1,98	30,60 ± 4,73	27,35 ± 2,36
	T6	23,77 ± 1,79	22,20 ± 1,53	23,09 ± 1,20
IL-6 (pg/ml)	T1	3,93 ± 1,14	2,43 ± 0,80	3,14 ± 0,69
	T2	4,01 ± 0,70	2,95 ± 0,53	3,50 ± 0,45
	T3	4,18 ± 0,85	3,83 ± 1,23	4,02 ± 0,71
	T6	2,77 ± 0,34	2,95 ± 0,66	2,84 ± 0,33
PGE2 (pg/ml)	T1	870,43 ± 181,50	963,27 ± 148,88	927,17 ± 112,30
	T2	890,58 ± 98,58	668,00 ± 137,45	784,13 ± 84,88
	T3	917,73 ± 133,73	780,36 ± 104,70	849,05 ± 84,22
	T6	849,83 ± 146,30	843,80 ± 155,07	847,09 ± 103,92
Grado Bloom-Richardson	T1	1,58 ± 0,19	2,22 ± 0,22	1,86 ± 0,16
	T2	1,67 ± 0,19	1,50 ± 0,15	1,58 ± 0,12
Ki-67 (%)	T1	23,97 ± 4,53	29,58 ± 4,48	26,67 ± 3,17
	T2	9,15 ± 2,68	9,57 ± 3,43	9,34 ± 2,09

Los resultados expresan como la media ± EEM (Error estándar de la media) de cada grupo. El grupo tratado es aquel donde se suministró Hidroxitirosol. El grupo placebo no recibió suplementación con Hidroxitirosol. El total viene determinado por los resultados obtenidos para ambos grupos, sin tener en consideración el grupo de asociación.

HDL: High Density Lipoprotein (Lipoproteínas de alta densidad)

LDL: Low Density Lipoprotein (Lipoproteínas de baja densidad)

LDH: Lactato deshidrogenasa

GGT: Gamma glutamil transferasa

GPT: Transaminasa glutámico pirúvica o Alanina aminotransferasa

GOT: Transaminasa glutámico oxalacética o Aspartato aminotransferasa

IL-6: Interleucina 6

PGE-2: Prostaglandina E2

Con el objetivo de constatar que el estudio de todas las variables anteriormente expuestas se llevó a cabo sobre dos grupos de pacientes completamente diferenciados inicialmente (tratado y no tratado), se determinó la concentración de los distintos derivados de HT a nivel plasmático. Tales concentraciones quedan reflejadas para ambos grupos a lo largo del tiempo en la tabla 14.

Tabla 14. Concentración de derivados de Hidroxitirosol.

Variable	Tiempo	Tratado	Placebo
HT glucurónido (nM)	T1	0,42 ± 0,11	0,53 ± 0,23
	T3	1,27 ± 0,29	0,78 ± 0,21
HT sulfato (nM)	T1	0,85 ± 0,24	1,20 ± 0,53
	T3	4,55 ± 2,18*	0,41 ± 0,18

Los resultados de concentración HT, glucurónido y sulfato, vienen expresados como valor de la media ± EEM (Error estándar de la media) de cada grupo. El grupo tratado es aquel donde se suministró Hidroxitirosol. El grupo placebo no recibió suplementación con Hidroxitirosol. El asterisco (*) muestra diferencias estadísticamente significativas entre grupo tratado y placebo.

HT: Hidroxitirosol

Finalmente, se exponen los distintos resultados que caracterizan a la población así como diversos parámetros relacionados con las características y comportamiento del

tumor a la llegada de las participantes al estudio (tabla 15) y tras la intervención quirúrgica en dichas pacientes (tabla 16).

Tabla 15. Características de la población y del tumor al inicio del estudio

Variable	Tratado	Placebo
Edad	51,08 ± 8,55	49,08 ± 7,42
Fenotipo tumoral Biopsia	Luminal A 38,5%	Luminal A 16,7%
	Luminal B 61,5%	Luminal B 83,3%
Ki67 pre (%)	23,97 ± 16,32	29,58 ± 15,54
RE (biopsia)	No tinción: 0%	No tinción: 8,3%
	Tinción incompleta y débil (1+): 0%	Tinción incompleta y débil (1+): 0%
	Tinción débil/moderada (2+): 15,4%	Tinción débil/moderada (2+): 8,3%
	Tinción fuerte (3+): 84,6%	Tinción fuerte (3+): 83,4%
RP (Biopsia)	No tinción: 0%	No tinción: 18,2%
	Tinción incompleta y débil (1+): 22,2%	Tinción incompleta y débil (1+): 18,2%
	Tinción débil/moderada (2+): 33,3%	Tinción débil/moderada (2+): 27,3%
	Tinción fuerte (3+): 44,5%	Tinción fuerte (3+): 36,3%
Tamaño tumoral inicial (mm)	27,31 ± 12,59	32,20 ± 8,30
Grado Bloom-Richardson (biopsia)	Grado I: 45,5%	Grado I: 11,1%
	Grado II: 45,5%	Grado II: 55,6%
	Grado III: 9%	Grado III: 33,3%
	Grado IV: 0%	Grado IV: 0%
	No evaluable: 0%	No evaluable: 0%

RE: Receptores de estrógenos

RP: Receptores de progesterona

Tabla 16. Características de la población y del tumor tras intervención quirúrgica

Variable	Tratado	Placebo
Respuesta radiológica	Ausencia 7,7%	Ausencia 8,3%
	Menor 30,8%	Menor 41,7%
	Mayor 38,5%	Mayor 25%
	Completa 23%	Completa 25%
Respuesta patológica (Miller&Paine)	Grado 1: 0%	Grado 1: 0%
	Grado 2: 0%	Grado 2: 0%
	Grado 3: 61,5%	Grado 3: 16,7%
	Grado 4: 30,8%	Grado 4: 83,3%
	Grado 5: 7,7%	Grado 5: 0%
Fenotipo tumoral Pieza quirúrgica	Luminal A 81,8%	Luminal A 72,7%
	Luminal B 18,2%	Luminal B 27,3%
Ki67 post (%)	9,15 ± 9,66	9,57 ± 11,36
RE (pieza quirúrgica)	No tinción 8,3%	No tinción: 8,3%
	Tinción incompleta y débil (1+): 0%	Tinción incompleta y débil (1+): 0%
	Tinción débil/moderada (2+): 8,3%	Tinción débil/moderada (2+): 8,3%
	Tinción fuerte (3+): 83,4%	Tinción fuerte (3+): 83,4%
RP (pieza quirúrgica)	No tinción: 11,1%	No tinción: 0%
	Tinción incompleta y débil (1+): 33,3%	Tinción incompleta y débil (1+): 37,5%
	Tinción débil/moderada (2+): 44,5%	Tinción débil/moderada (2+): 62,5%
	Tinción fuerte (3+): 11,1%	Tinción fuerte (3+): 0%
RCB cualitativo	Clase I: 23,1%	Grado I: 41,7%
	Clase II: 76,9%	Grado II: 58,3%

Grado Bloom-Richardson (pieza quirúrgica)	Grado I: 41,7%	Grado I: 50%
	Grado II: 50%	Grado II: 50%
	Grado III: 8,3%	Grado III: 0%
	Grado IV: 0%	Grado IV: 0%
	No evaluable: 0%	No evaluable: 0%

RE: Receptores de estrógenos
 RP: Receptores de progesterona
 RCB: Residual Cancer Burden

Debido al gran volumen de datos obtenidos, y para hacerlo más comprensible, los resultados han sido divididos en variables con resultados significativos primeramente por **grupo**, a continuación por la interacción **tiempo x grupo** y finalmente, por **tiempo**, de acuerdo con la clasificación establecida en el material y métodos propuesto. Así mismo, se detalla una descripción de resultados primeramente por puntos temporales T1, T2 y T3 y finalmente T1 y T6 en el orden anteriormente citado.

La descripción de resultados asociados exclusivamente al **grupo** (factor inter-sujetos) se llevó a cabo empleando el MLG. Este detectó diferencias significativas inherentes al grupo (tratado o no tratado), independientemente del tiempo. Una vez aplicado el MLG, se calcularon las Comparaciones Múltiples de Bonferroni para localizar las diferencias detectadas en dicho grupo.

En el caso de las comparaciones asociadas a la interacción **tiempo x grupo**, el MLG detectó diferencias estadísticamente significativas para esta intersección, que posteriormente fueron localizadas a través de las comparaciones múltiples de Bonferroni.

Finalmente, cuando el MLG detectó únicamente diferencias significativas respecto al **tiempo** (factor intra-sujetos), independientemente del grupo de asociación de las participantes, éstas fueron posteriormente determinadas a través de las comparaciones múltiples de Bonferroni.

3.1 Daño oxidativo, variables bioquímicas e histopatológicas durante el tratamiento quimioterápico (T1, T2 y T3):

3.1.1 Daño oxidativo:

3.1.1.1 Daño oxidativo asociado a lípidos e hidratos de carbono

3.1.1.1.1 Resultados obtenidos por tiempo

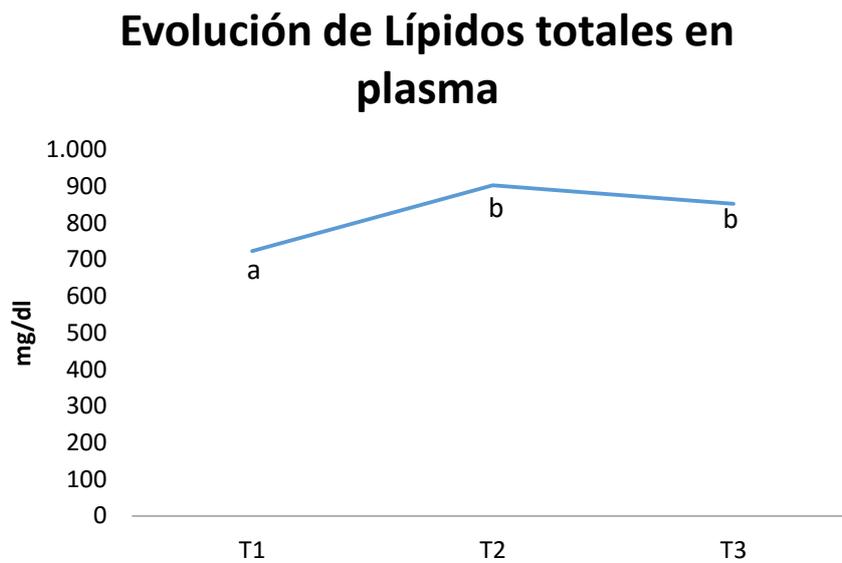


Figura 15. Evolución temporal de lípidos totales plasmáticos a lo largo del tratamiento con quimioterápicos. T1 es el estado basal. T2 es el final del tratamiento con epirubicina y ciclofosfamida. T3 es el final del tratamiento con taxanos. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas intra sujetos a lo largo del tiempo ($p < 0,005$).

En la evolución de los valores de lípidos totales se encontraron diferencias estadísticamente significativas a través del MLG ($p < 0,005$). Como puede observarse en la figura 15, la concentración lipídica basal de las pacientes diagnosticadas con cáncer de mama se situaba en los niveles más bajos de todo el periodo de tratamiento antitumoral. Durante el tratamiento con epirubicina y ciclofosfamida (de T1 a T2) se comprobó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,001$) en el nivel de lípidos, alcanzando los valores más altos a lo largo del tratamiento quimioterápico. Posteriormente, durante el tratamiento con taxanos se produjo un ligero descenso (de T2 a T3), que no llegaron a representar ninguna diferencia respecto al punto temporal T2. Así mismo, se encontró que los valores de lípidos totales eran significativamente más elevados al final del tratamiento quimioterápico (T3), comparados con los niveles basales (T1) ($p < 0,005$).

Evolución de Isoprostanos plasmáticos

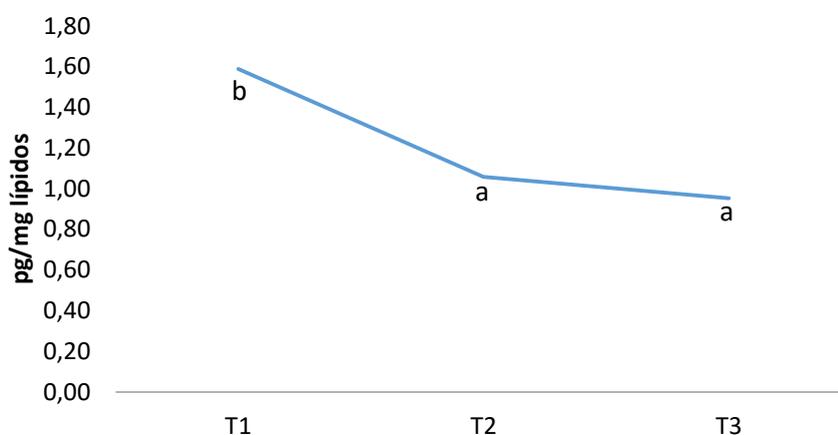


Figura 16. Evolución temporal de Isoprostanos normalizados por lípidos totales en plasma, a lo largo del tratamiento con quimioterápicos. T1 es el estado basal. T2 es el final del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida. T3 es el final del tratamiento con taxanos. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas intra sujetos a lo largo del tiempo ($p < 0,001$).

En el caso de los isoprostanos plasmáticos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el factor intra-sujeto ($p < 0,001$). En la figura 16 se puede observar dónde se localizan estas diferencias a lo largo del tiempo. Se produjo un descenso muy pronunciado desde el inicio de la terapia antitumoral con epirrubicina y ciclofosfamida (T1) hasta el inicio de la terapia con taxanos (T2) ($p < 0,005$). Así mismo, los niveles plasmáticos de isoprostanos eran los más elevados a nivel basal, llegando al valor más pequeño al final del tratamiento quimioterápico, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los valores del punto inicial (T1) y final (T3) ($p < 0,001$). A pesar de que se produjo un leve descenso de los niveles de isoprostanos plasmáticos durante el tratamiento con taxanos (de T2 a T3), no se estableció ninguna diferencia significativa entre ambos puntos temporales.

3.1.1.2 Daño oxidativo asociado ácidos nucleicos

3.1.1.2.1 Resultados obtenidos por grupo



Figura 17. Daño en el ADN de linfocitos de sangre periférica. Los resultados vienen expresados adimensionalmente como OTM (Olive Tail Moment) para los distintos grupos (tratado o no con HT) y una significancia de $p < 0,01$.

La variable OTM determina la genotoxicidad celular asociada a distintas patologías, químicos, radiaciones o estrés oxidativo (Mozaffarieh et al., 2008). En este caso, tras aplicarse el MLG y obtener diferencias estadísticamente significativas inter-sujetos ($p < 0,01$) pudo observarse por las comparaciones múltiples de Bonferroni cómo el hecho de pertenecer al grupo tratado implicaba un mayor grado de daño en el ADN de linfocitos aislados ($p < 0,01$), sin tener en cuenta la evolución temporal.

3.1.1.3 Antioxidantes plasmáticos

3.1.1.3.1 Resultados obtenidos por tiempo

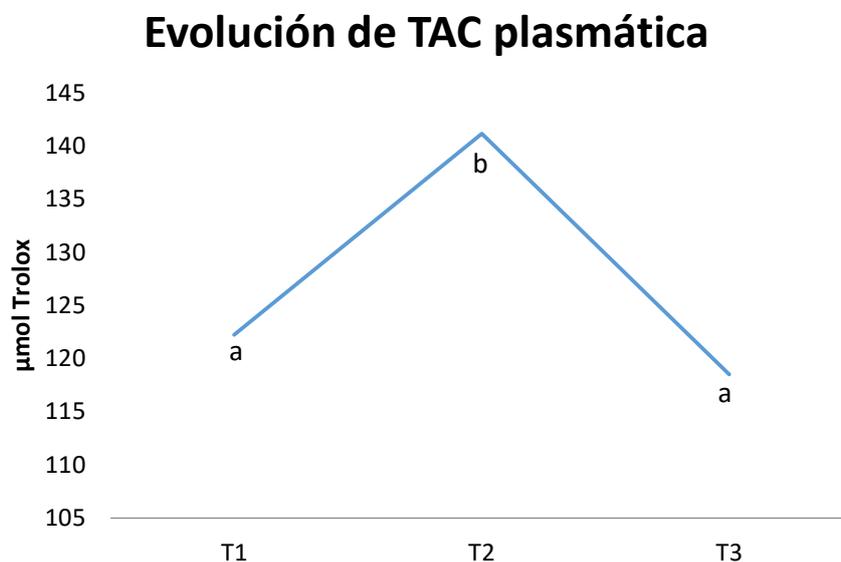


Figura 18. Evolución temporal de capacidad antioxidante total plasmática (TAC) a lo largo del tratamiento con quimioterápicos. T1 es el estado basal. T2 es el final del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida. T3 es el final del tratamiento con taxanos. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas intra sujetos a lo largo del tiempo ($p < 0,001$).

La capacidad antioxidante total del plasma nos indica el grado de respuestas antioxidante global que presenta el plasma frente a determinados compuestos tales como determinadas EROs. En el caso de la TAC, se detectaron diferencias significativas en el factor intra-sujetos ($p < 0,001$). En la figura 18, se puede contemplar un incremento exacerbado de la TAC desde que las pacientes llegaron a consulta hasta que finalizó el tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida (de T1 a T2) ($p < 0,001$). Posteriormente, una vez iniciado los distintos ciclos de terapia antitumoral con taxanos, volvió a descender hasta niveles similares al basal (de T2 a T3) ($p < 0,001$). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el punto temporal T2 respecto al punto inicial y final del tratamiento con quimioterápicos.

Evolución de Vitamina E en plasma

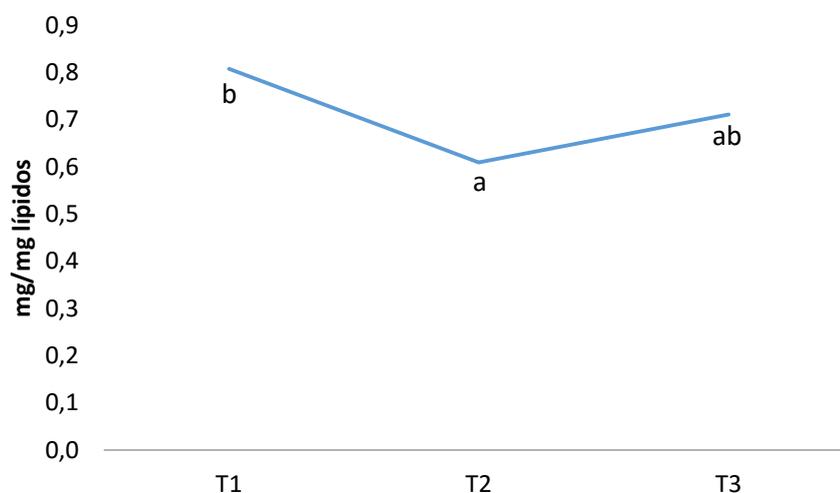


Figura 19. Evolución temporal de Vitamina E normalizada por lípidos totales en plasma a lo largo del tratamiento con quimioterápicos. T1 es el estado basal. T2 es el final del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida. T3 es el final del tratamiento con taxanos. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas intra sujetos a lo largo del tiempo ($p < 0,05$).

Como puede observarse en la figura anterior (figura 19), las diferencias establecidas por las comparaciones múltiples de Bonferroni se localizaron principalmente a nivel basal. En este punto, se hallaron los valores de concentración plasmática más elevados de vitamina E. Durante el tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida (de T1 a T2), se produjo un descenso estadísticamente significativo respecto al estado basal ($p < 0,05$), que finalmente se invirtió, comenzando de nuevo a ascender levemente hasta T3 (final del tratamiento con taxanos). En este punto (T3) no se observaron diferencias significativas respecto al punto T1 (basal) y T2 (final de tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida).

3.1.1.4 Secreted Frizzled Related Protein 4 (Sfrp-4)

3.1.1.4.1 Resultados obtenidos por tiempo

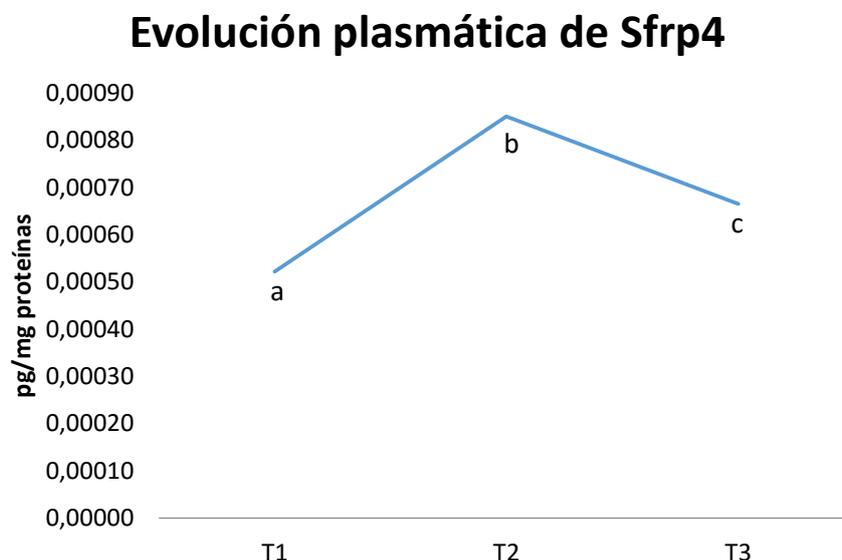


Figura 20. Evolución temporal de Sfrp4 (Secreted Frizzled-Related Protein 4) normalizada por proteínas en plasma a lo largo del tratamiento con quimioterápicos. T1 es el estado basal. T2 es el final del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida. T3 es el final del tratamiento con taxanos. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas intra sujetos a lo largo del tiempo ($p < 0,001$).

En la figura 20 se pueden observar las variaciones de los valores plasmáticos de la proteína Sfrp4 a lo largo del tratamiento quimioterápico. Según el MLG, existían diferencias estadísticamente significativas en el factor intra-sujetos ($p < 0,001$). De acuerdo con la gráfica anterior, los valores más bajos de Sfrp4 plasmática se encontraron al inicio del ensayo (T1). A lo largo del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida (de T1 a T2), la proteína aumentó hasta alcanzar su punto de concentración plasmática máxima en T2 ($p < 0,001$). Finalmente, al inicio del tratamiento con taxanos (de T2 a T3), la proteína fue decreciendo nuevamente ($p < 0,05$) hasta situarse en valores ligeramente superiores a los encontrados basalmente, sin llegar a alcanzar los niveles mínimos de concentración inicial ($p < 0,05$). Estos resultados indican que la proteína incrementó a causa del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida, mientras que los taxanos tenían un efecto modulador que rebajaba los niveles de dicha proteína hasta una concentración cercana a la basal.

3.1.1.5 Variables bioquímicas e histopatológicas

3.1.1.5.1 Resultados obtenidos por grupo

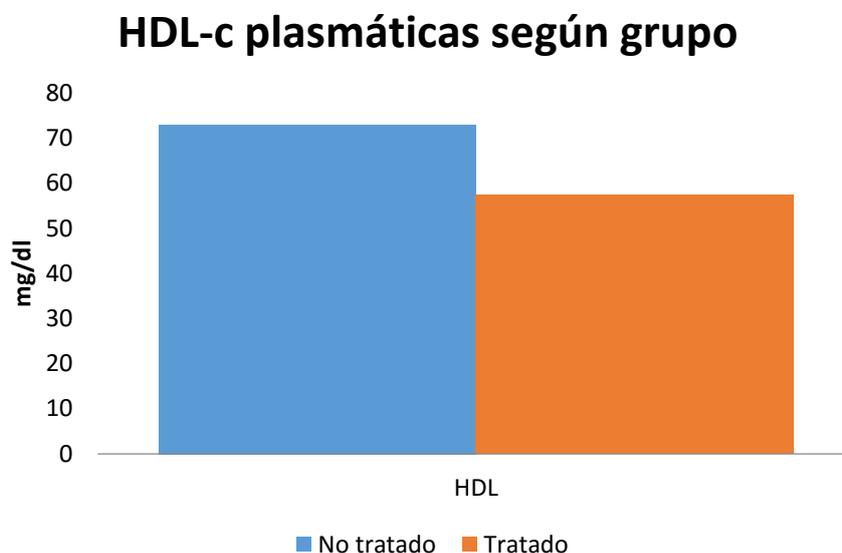


Figura 21. Niveles plasmáticos de lipoproteínas HDL (lipoproteínas de alta densidad) en los grupos tratado y no tratado con Hidroxitirosol y significancia de $p < 0,05$.

Los niveles de HDL reflejan el transporte del colesterol desde los tejidos hacia el hígado, donde será almacenado para su reutilización o transportado para su eliminación biliar. Niveles inferiores a 40mg/dl de colesterol HDL (c-HDL) se han asociado a un mayor riesgo cardiovascular en la mujer. En el caso que nos ocupa, el MLG detectó diferencias estadísticamente significativas debidas al grupo, independientemente de la evolución temporal existente ($p < 0,05$), pudiendo observarse cómo, el hecho de pertenecer al grupo tratado con HT, implicaba unos niveles de c-HDL menores comparados con los del grupo placebo. A pesar de lo anterior, ambos grupos se encuentran dentro de unos niveles adecuados de c-HDL, superiores a 50mg/dl.

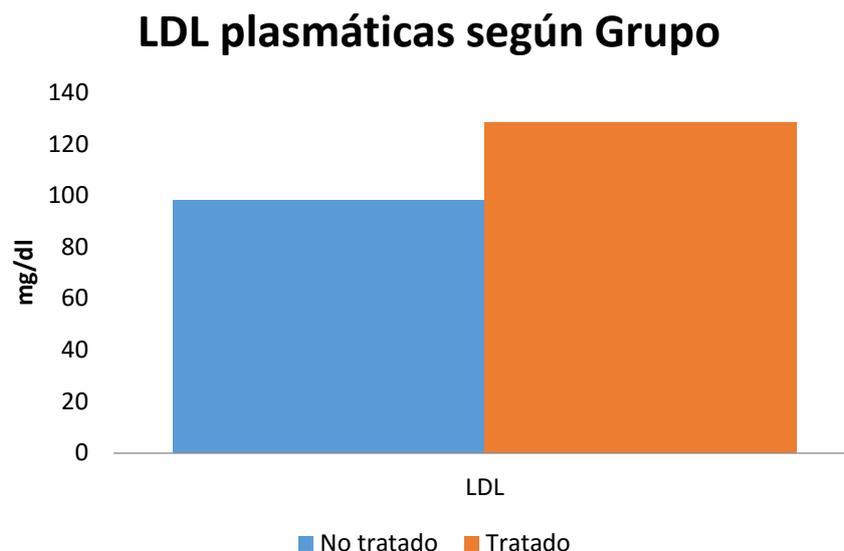


Figura 22. Niveles plasmáticos de lipoproteínas LDL (lipoproteínas de baja densidad) en los grupos tratado y no tratado con HT y significancia de $p < 0,05$.

A diferencia del c-HDL, valores elevados de LDL se asocian con un mayor riesgo cardiovascular. En este caso, los valores de lipoproteínas LDL trasladan información de cómo se está transportando el colesterol hacia los tejidos, suponiendo un mayor riesgo de aterosclerosis por acumulación de las mismas a nivel arterial cuando exceden de 160 mg/dl en individuos sanos (siendo el valor óptimo en torno a 100mg/dl en individuos sanos). Tal y como demostró el MLG, aquellas pacientes que aleatoriamente fueron asignadas al grupo placebo presentaban unos niveles de LDL menores respecto al grupo tratado con HT ($p < 0,05$). La concentración de LDL de las pacientes tratadas con HT, de acuerdo con las comparaciones múltiples de Bonferroni, fueron ligeramente superiores a las tratadas con el placebo. Ambos grupos se encontraban dentro de los valores LDL de referencia.

3.1.1.5.2 *Resultados obtenidos por grupo x tiempo*

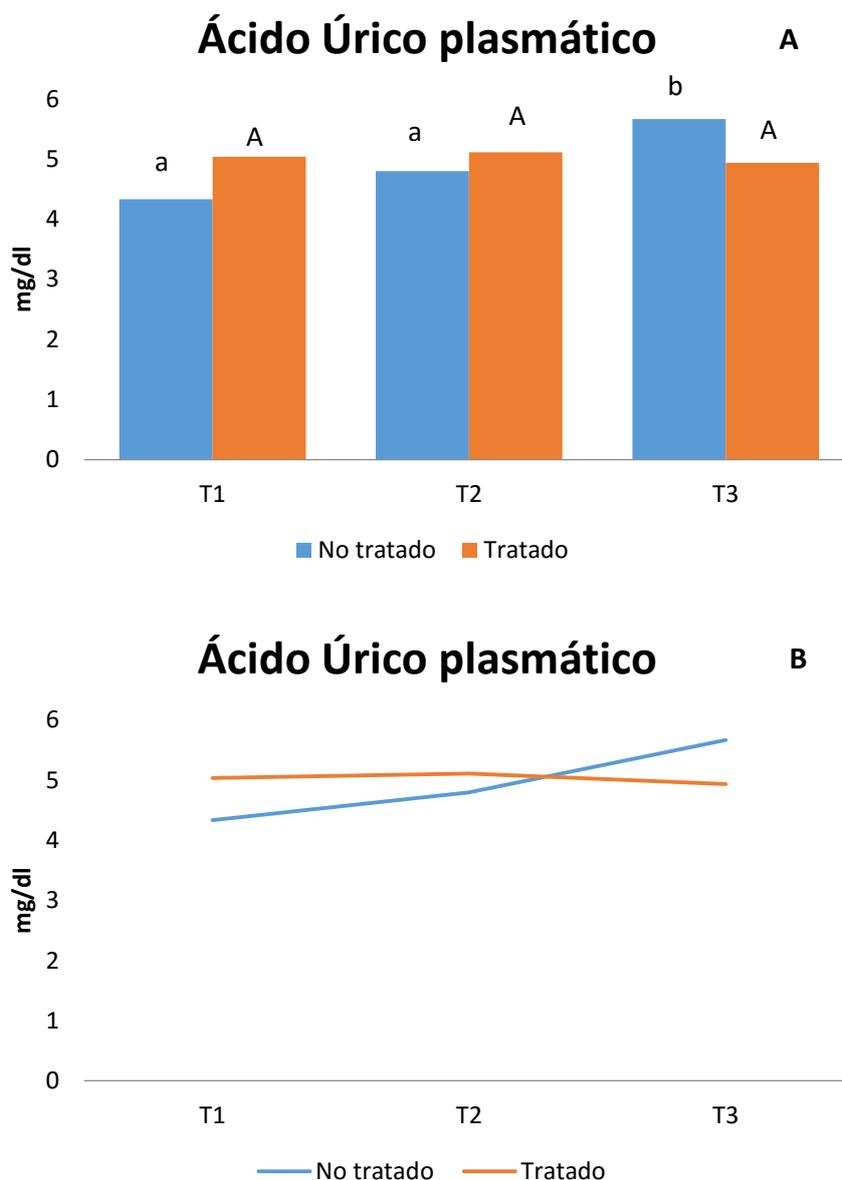


Figura 23. Niveles plasmáticos de Ácido Úrico. Los valores se expresan como como la interacción del tiempo x grupo. A) Expresado en barras; B) Expresado linealmente. Las letras muestran la diferencia intra-sujetos a lo largo del tiempo. Minúsculas para el grupo placebo y mayúsculas para el tratado ($p < 0,05$).

En la figura 23 (A y B) se muestran las diferencias entre los valores de la variable según el tiempo y el grupo conjuntamente ($p < 0,05$). Para establecer dónde se encontraban dichas diferencias, se aplicaron las comparaciones múltiples de Bonferroni, determinando que las diferencias estadísticamente significativas se hallaron dentro del grupo placebo. En este grupo no tratado con HT, los niveles de ácido úrico plasmático ascendían a lo largo del tiempo. El grupo tratado mantuvo prácticamente invariables sus niveles a lo largo del tiempo, sin existir diferencias entre tratado y no tratado. El grupo control sufrió un incremento estadísticamente significativo entre el estado basal (T1) y el punto final del tratamiento con taxanos (T3) ($p < 0,05$)

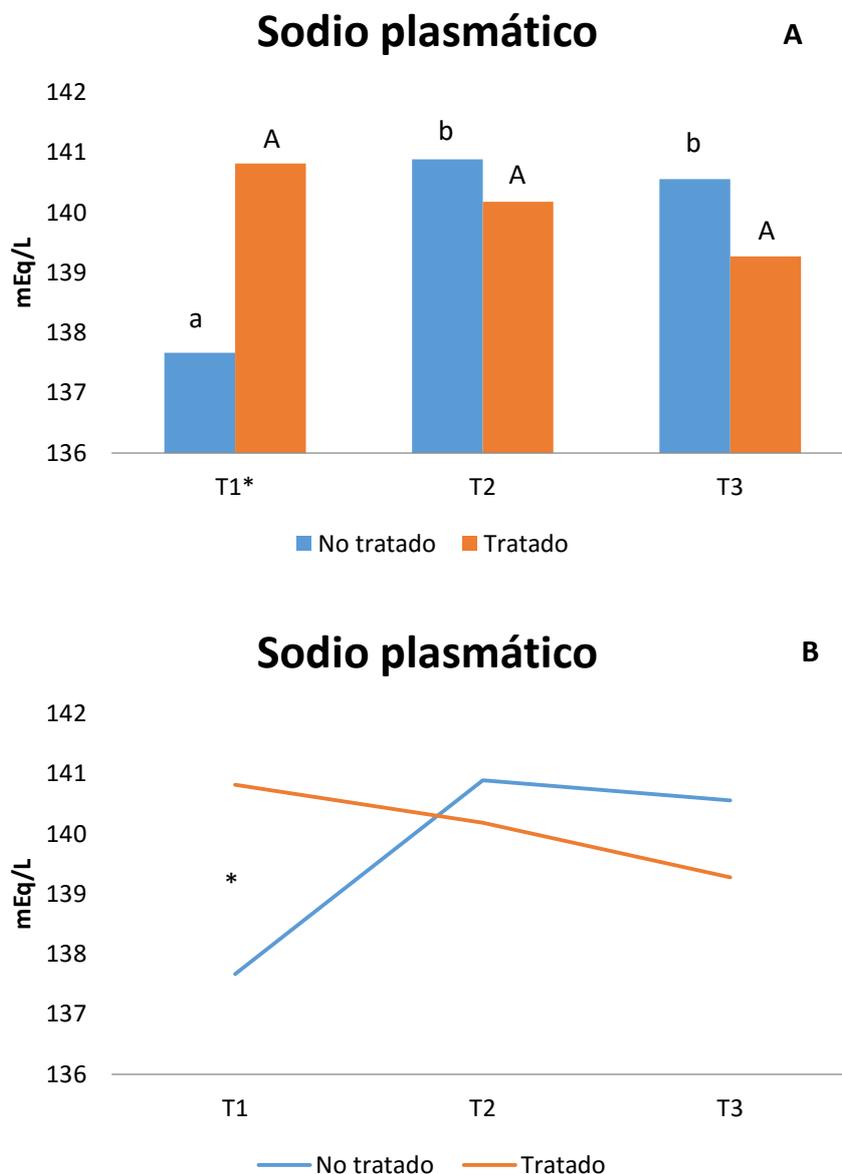


Figura 24. Niveles de sodio plasmático. Los resultados se representan como la interacción del tiempo x grupo ($p < 0,005$). A) Expresado en barras; B) Expresado linealmente. Las letras muestran la diferencia a lo largo del tiempo. El asterisco (*) muestra las diferencias entre ambos grupos (tratado y no tratado) ($p < 0,05$).

Respecto a los niveles plasmáticos de sodio, el MLG detectó diferencias estadísticamente significativas en la interacción tiempo x grupo ($p < 0,005$). Se trataron de identificar dónde se localizaban estas diferencias a través de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias significativas entre el grupo tratado y no tratado con HT se encontraron en el punto basal T1, siendo mucho mayores en el grupo tratado con HT ($p < 0,005$). Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las pacientes del grupo no tratado durante la evolución temporal de T1 a T2 ($p < 0,05$), así como entre T1 y T3 ($p < 0,05$). Este grupo demostró una evolución creciente a lo largo del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida (de T1 a T2) que se mantuvo constante

posteriormente durante el tratamiento con taxanos (de T2 a T3). A diferencia del grupo placebo, el grupo tratado con HT mantuvo sus niveles estables a lo largo del tiempo, a pesar de que presentaban, al inicio del estudio, unos valores de sodio plasmático mayores a los del grupo placebo.

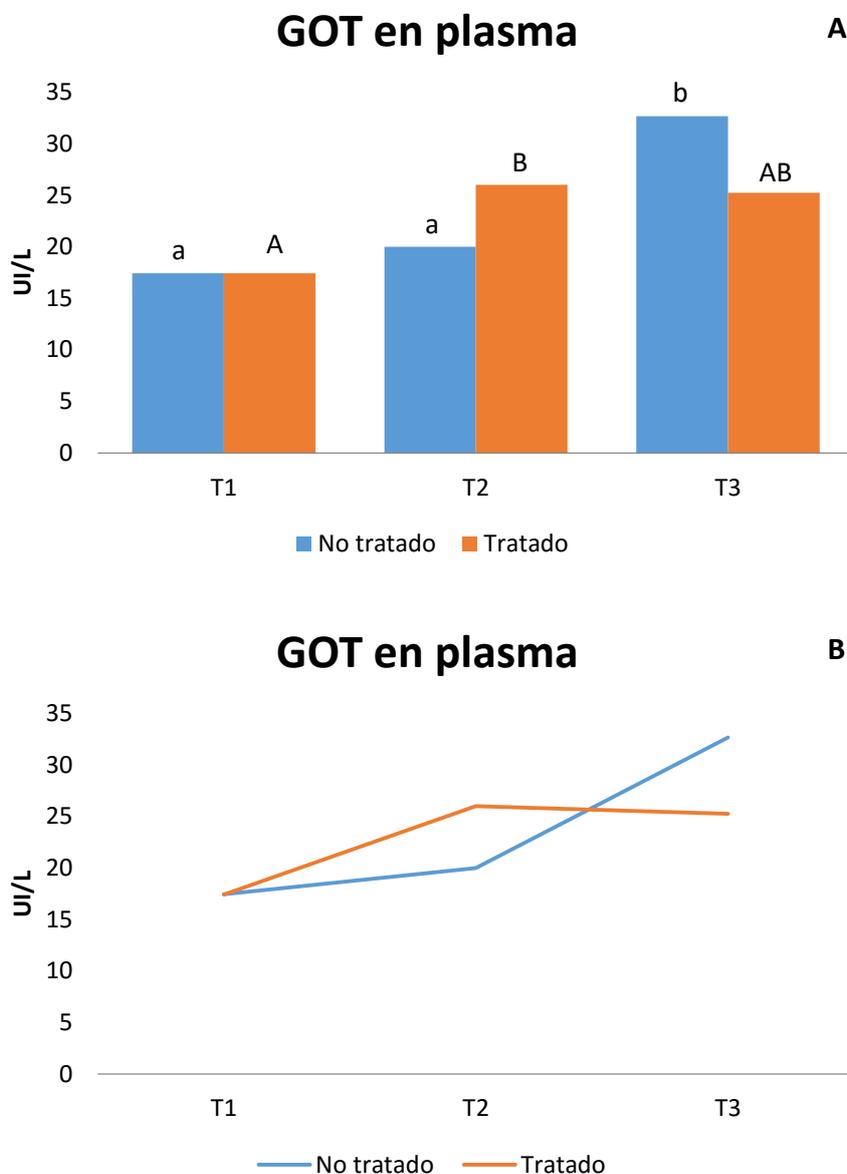


Figura 25. Niveles de GOT (Transaminasa glutámico oxalacética) en plasma. Los resultados vienen definidos como la interacción del tiempo x grupo ($p < 0,005$). A) Expresado en barras; B) Expresado linealmente. Las letras muestran la diferencia a lo largo del tiempo.

La GOT (Transaminasa glutámico oxalacética) es también conocida como AST (Aspartato aminotransferasa) y se localiza principalmente en hígado, corazón y músculo estriado. Sus niveles se relacionan con daños profundos celulares tales como hepatopatías o tratamiento con determinados fármacos. En este caso, el MLG puso de manifiesto diferencias estadísticamente significativas en la interacción tiempo x grupo conjuntamente ($p < 0,05$). Tratando de discernir dónde se localizaban estas diferencias, las

comparaciones múltiples de Bonferroni determinaron que se encontraban de forma paralela en ambos grupos a lo largo del tiempo.

Los niveles plasmáticos de GOT mostraron diferencias a lo largo del tiempo en el grupo placebo y en el grupo tratado, pero no se encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en ningún punto temporal. En el grupo placebo pudo observarse un incremento sustancial en los niveles de GOT a lo largo del tratamiento quimioterápico, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre T1 y T3 ($p < 0,05$) y T2 y T3 ($p < 0,05$). Respecto al grupo tratado, se comprobó un crecimiento moderado en los niveles de GOT, hallando diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida (de T1 a T2) ($p < 0,01$). Posteriormente, este grupo (tratado) mantuvo los niveles estables durante el tratamiento con taxanos (de T2 a T3), donde no se apreciaron diferencias.

3.1.1.5.3 *Resultados obtenidos por tiempo*

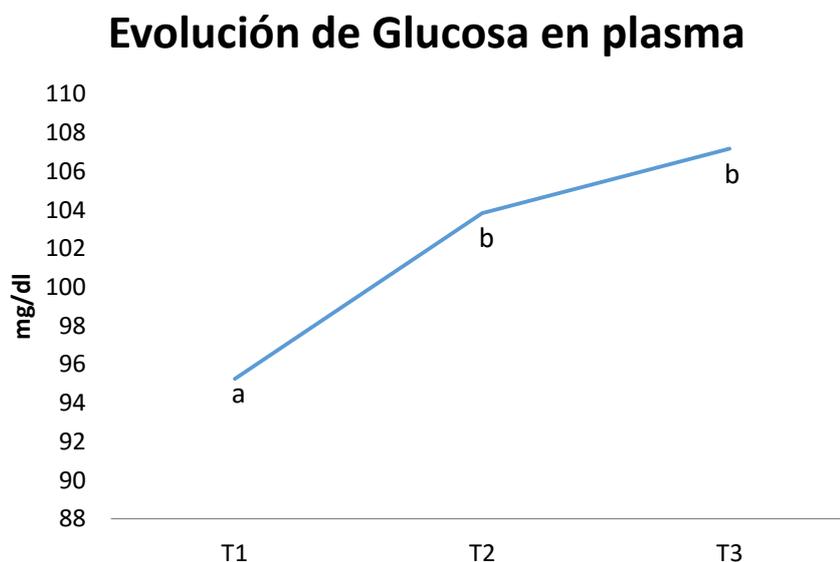


Figura 26. Evolución temporal de glucemia a lo largo del tratamiento con quimioterápicos. T1 es el estado basal. T2 es el final del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida. T3 es el final del tratamiento con taxanos. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas intra sujetos a lo largo del tiempo ($p < 0,05$).

Las pacientes presentaban una concentración de glucosa plasmática menor al inicio del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida (T1). Como refleja la figura 26, se produjo un ascenso a lo largo del tratamiento quimioterápico, de tal forma que el punto basal (T1) presentó diferencias estadísticamente significativas respecto al fin del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida (T2) ($p < 0,05$) y respecto al final de tratamiento con taxanos (T3) ($p < 0,05$). De la misma forma, no se observaron diferencias durante el tratamiento con taxanos (de T2 a T3).

Evolución de Creatinina plasmática

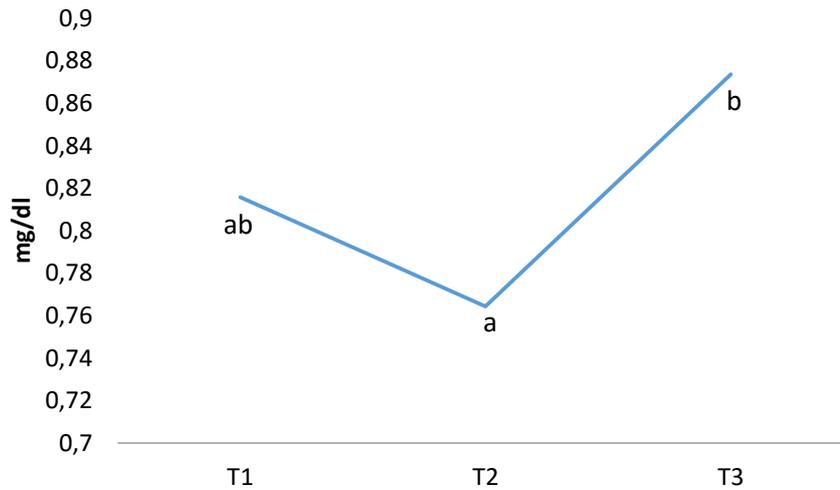


Figura 27. Evolución temporal de Creatinina plasmática a lo largo del tratamiento con quimioterápicos. T1 es el estado basal. T2 es el final del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida. T3 es el final del tratamiento con taxanos. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas intra sujetos a lo largo del tiempo ($p < 0,005$).

Los valores de creatinina plasmática se mantuvieron prácticamente constantes a lo largo del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida, donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (de T1 a T2). Al inicio del tratamiento con taxanos se produjo un ascenso estadísticamente significativo en los niveles de creatinina, que fueron en ascenso hasta alcanzar su máxima concentración al final de la terapia (de T2 a T3) ($p < 0,05$). Así mismo, de acuerdo con los test aplicados, no se hallaron diferencias significativas entre el estado basal (T1) y el resto de puntos temporales.

Evolución de Bilirrubina total

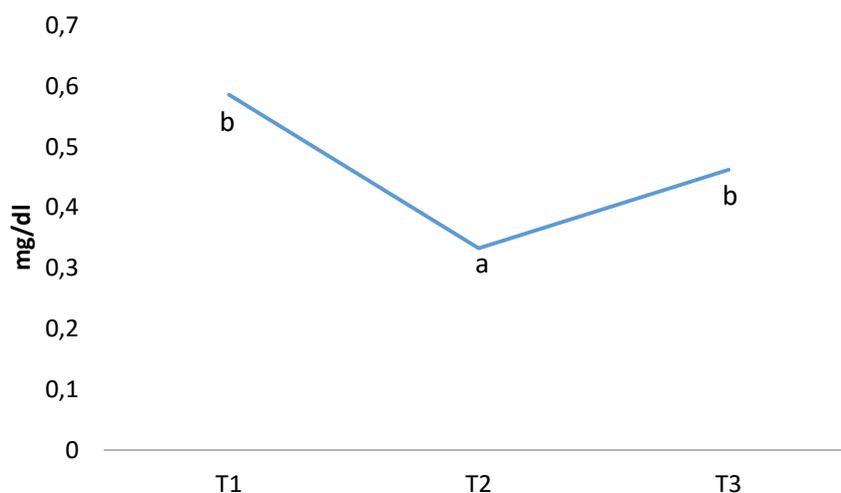


Figura 28. Evolución temporal de Bilirrubina total plasmática a lo largo del tratamiento con quimioterápicos. T1 es el estado basal. T2 es el final del tratamiento con epirubicina y ciclofosfamida. T3 es el final del tratamiento con taxanos. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas intra sujetos a lo largo del tiempo ($p < 0,005$).

A lo largo de la evolución de los niveles plasmáticos de bilirrubina total, se pudieron observar diferencias significativas en T2 (inicio de tratamiento con taxanos) con respecto al estado basal ($p < 0,05$) y frente al punto final del tratamiento quimioterápico (T3) ($p < 0,05$). Las pacientes presentaban los mayores niveles de bilirrubina total a la llegada a la consulta. A pesar de las fluctuaciones ocasionadas por el tratamiento con epirubicina y ciclofosfamida, no se observaron diferencias significativas entre estado basal y final del tratamiento quimioterápico (T3).

Evolución de Potasio en plasma

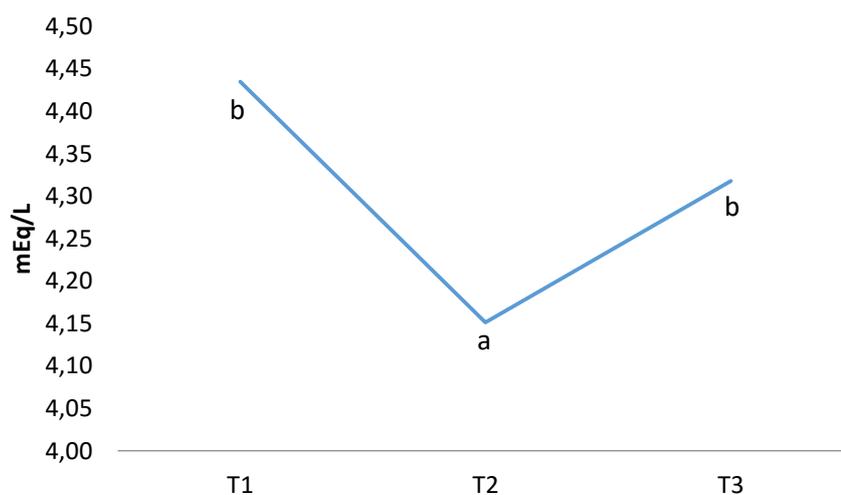


Figura 29. Evolución temporal de Potasio plasmático a lo largo del tratamiento con quimioterápicos. T1 es el estado basal. T2 es el final del tratamiento con epirubicina y ciclofosfamida. T3 es el final del tratamiento con taxanos. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas intra sujetos a lo largo del tiempo ($p < 0,05$).

Los niveles más elevados de potasio plasmático se hallaron a la llegada de las pacientes a la consulta (figura 29). Se produjo un descenso acusado potasio durante el tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida, llegando a alcanzar los niveles más bajos de todo el tratamiento quimioterápico. De la misma forma, una vez se inició la terapia con taxanos, se produjo un incremento gradual de sus niveles, alcanzando de nuevo valores similares a los basales. Las diferencias significativas se encontraron a nivel de T2 (fin del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida) respecto al estado basal ($p<0,05$) y frente al final del tratamiento quimioterápico (T3) ($p<0,05$). No se detectaron diferencias entre los puntos temporales inicial y final.

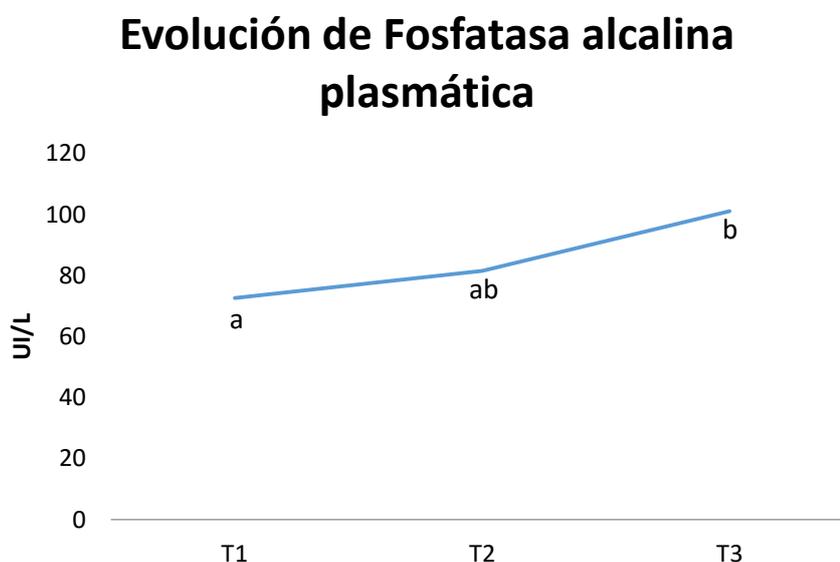


Figura 30. Evolución temporal de Fosfatasa alcalina plasmática a lo largo del tratamiento con quimioterápicos. T1 es el estado basal. T2 es el final del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida. T3 es el final del tratamiento con taxanos. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas intra sujetos a lo largo del tiempo ($p<0,05$).

Al inicio del estudio, las pacientes presentaban los valores más bajos de fosfatasa alcalina, incrementándose posteriormente a lo largo de todo el tratamiento quimioterápico (de T1 a T3) ($p<0,005$). A pesar de no encontrar diferencias significativas entre el punto basal (T1) y el final del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida (T2), se observó cierta tendencia de ascenso entre dichos puntos. Así mismo, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los puntos T2 (inicio del tratamiento con taxanos) y el punto final del tratamiento quimioterápico (T3), aunque de nuevo se apreció una tendencia creciente entre ambos puntos temporales.

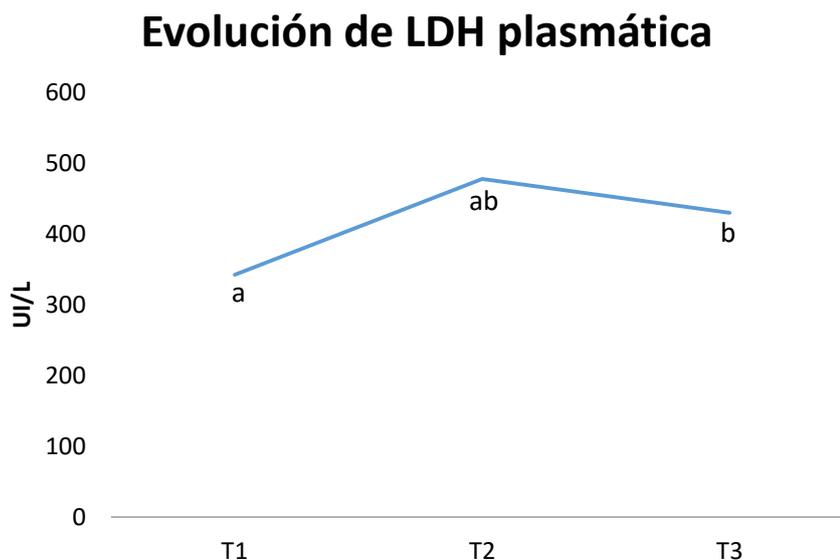


Figura 31. Evolución temporal de LDH (lactato deshidrogenasa) plasmática a lo largo del tratamiento con quimioterápicos. T1 es el estado basal. T2 es el final del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida. T3 es el final del tratamiento con taxanos. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas intra sujetos a lo largo del tiempo ($p < 0,05$).

La evolución de la concentración plasmática de enzima lactato deshidrogenasa presentó diferencias estadísticamente significativas entre el estado basal y el final del tratamiento quimioterápico (T1 y T3) ($p < 0,05$). En la figura 31 puede observarse un incremento a lo largo del tratamiento tanto con epirrubicina y ciclofosfamida como con taxanos, sin encontrar diferencias significativas entre el punto T2 (inicio del tratamiento con taxanos) y el final de la terapia antitumoral farmacológica (T3). Se observó que los valores de concentración de LDH más bajos se dieron al inicio de la terapia antitumoral, propiciando el tratamiento quimioterápico un incremento en su concentración a lo largo del tiempo.

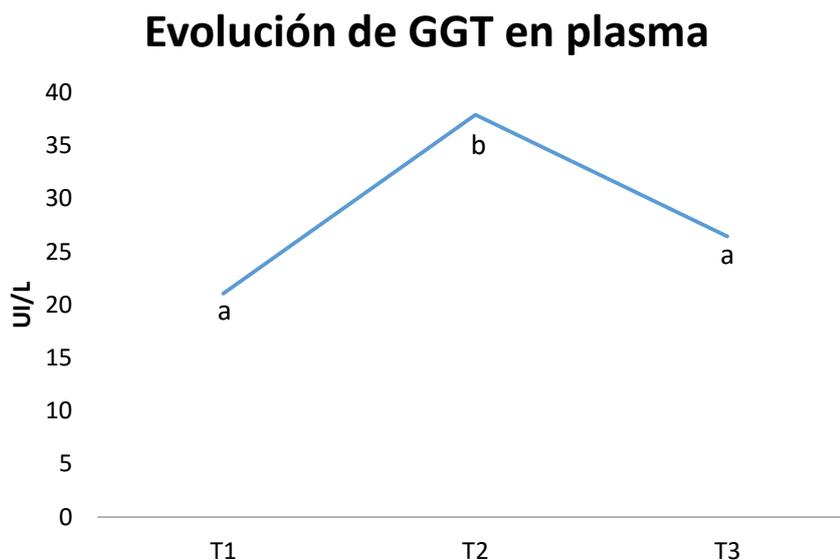


Figura 32. Evolución temporal de GGT (gamma glutamil transpeptidasa) plasmática a lo largo del tratamiento con quimioterápicos. T1 es el estado basal. T2 es el final del tratamiento con epirubicina y ciclofosfamida. T3 es el final del tratamiento con taxanos. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas intra sujetos a lo largo del tiempo ($p < 0,001$).

En la evolución de la enzima γ -glutamyl transferasa se debe destacar que las diferencias significativas encontradas por los test aplicados se centran de forma global en el punto temporal T2 (final de tratamiento con epirubicina y ciclofosfamida). Este punto presenta el valor más alto de GGT de todo el tratamiento quimioterápico, siendo estadísticamente mayor que los niveles encontrados en el punto basal (T1) ($p < 0,001$) y al final del tratamiento (T3) ($p < 0,05$). De la misma forma, encontramos que los valores más bajos de este enzima se localizan a nivel basal, produciéndose un incremento durante el tratamiento con epirubicina y ciclofosfamida, para posteriormente sufrir un descenso durante en tratamiento con taxanos hasta niveles similares a los encontrados en el punto inicial. No hubo diferencias significativas entre los puntos inicial y final.

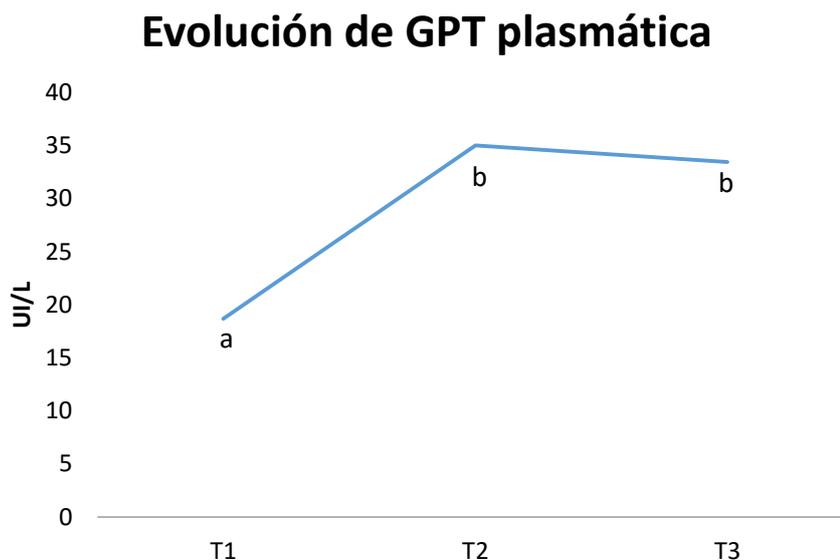


Figura 33. Evolución temporal de GPT (transaminasa glutámico pirúvica) plasmática a lo largo del tratamiento con quimioterápicos. T1 es el estado basal. T2 es el final del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida. T3 es el final del tratamiento con taxanos. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas intra sujetos a lo largo del tiempo ($p < 0,005$).

De acuerdo con la figura 33, la transaminasa glutámico-pirúvica o alanina aminotransferasa (ALT) presentó su concentración plasmática más baja al inicio del tratamiento antitumoral. Desde este punto, sufrió un incremento significativo a lo largo del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida (de T1 a T2) ($p < 0,005$) y un posterior mantenimiento en sus valores a lo largo del tratamiento con taxanos (de T2 a T3). De acuerdo con las comparaciones múltiples de Bonferroni, se detectaron diferencias significativas entre los puntos temporales inicial y final ($p < 0,05$). Así mismo, no se hallaron diferencias significativas entre los T2 y T3 (correspondientes a la terapia con taxanos).

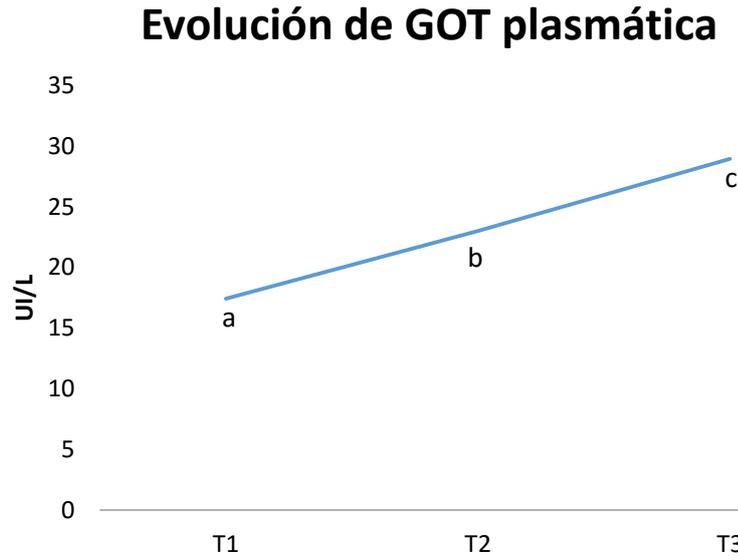


Figura 34. Evolución temporal de GOT (transaminasa glutámico oxalacética) plasmática a lo largo del tratamiento con quimioterápicos. T1 es el estado basal. T2 es el final del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida. T3 es el final del tratamiento con taxanos. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas intra sujetos a lo largo del tiempo ($p < 0,005$).

Analizando la evolución temporal de la enzima transaminasa glutámico-oxalacética o aspartato aminotransferasa (AST), se observó un incremento gradual a lo largo de todo el tratamiento quimioterápico. Los niveles de concentración plasmática más bajos se obtuvieron a la llegada de las pacientes a la consulta, viéndose a continuación incrementados a lo largo del tratamiento. Se hallaron diferencias significativas durante el tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida (de T1 a T2) ($p < 0,05$) y entre estado inicial y final (de T1 a T3) ($p < 0,005$). Además de estas diferencias, los test aplicados mostraron significación entre los puntos temporales T2 (inicio de la terapia con taxanos) y T3 (punto final de tratamiento quimioterápico) ($p < 0,05$). Se observó por tanto una evolución creciente a lo largo de todo el tratamiento farmacológico.

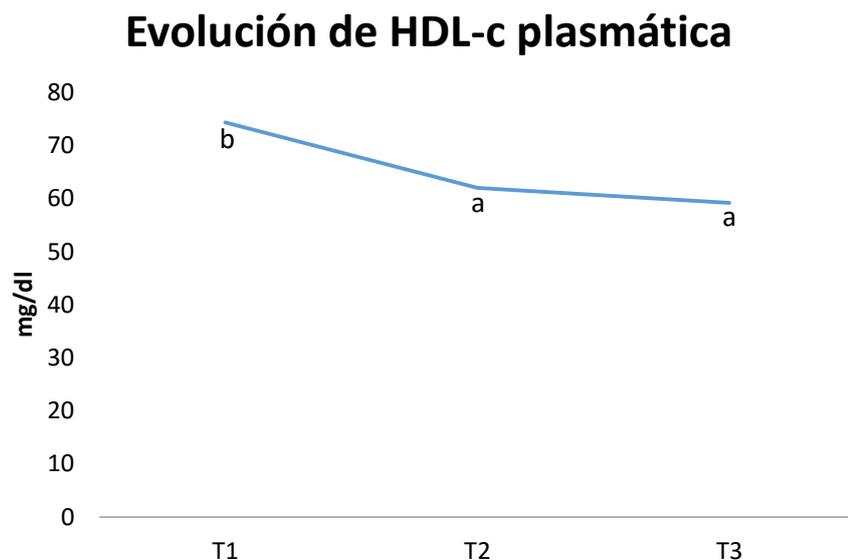


Figura 35. Evolución temporal de HDL-c (lipoproteínas de alta densidad) plasmáticas a lo largo del tratamiento con quimioterápicos. T1 es el estado basal. T2 es el final del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida. T3 es el final del tratamiento con taxanos. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas intra sujetos a lo largo del tiempo ($p < 0,05$).

Analizando en el perfil lipídico, la primera variable corresponde a la concentración plasmática de HDL. En este caso, se observó que los mayores niveles plasmáticos de esta lipoproteína se encontraban al inicio de la terapia antitumoral. De acuerdo con las comparaciones múltiples de Bonferroni, las principales diferencias se localizaron a nivel basal, encontrándose resultados significativos entre el punto temporal T1 (basal) y T2 (final del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida) ($p < 0,05$) y entre los puntos temporales T1 y T3 (final del tratamiento quimioterápico) ($p < 0,05$). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre T2 y T3. En la figura 35 puede observarse un descenso global en los niveles de HDL a lo largo del tratamiento farmacológico.

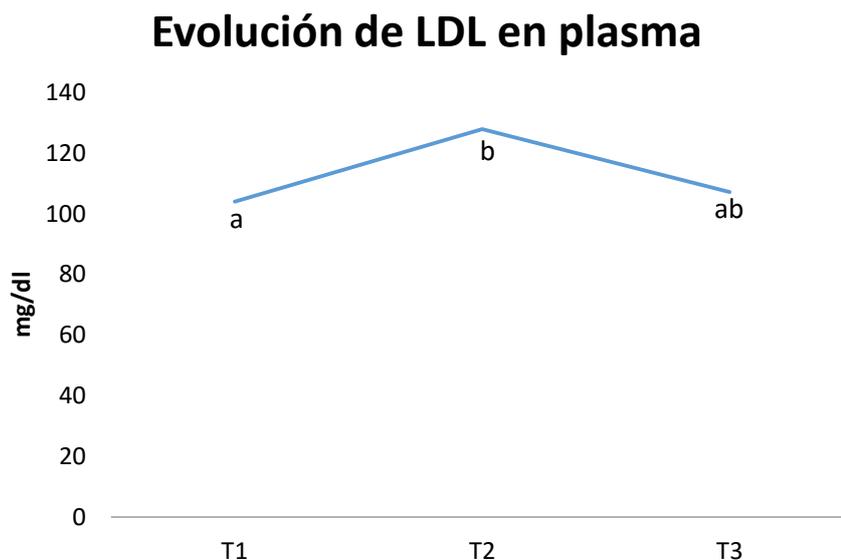


Figura 36. Evolución temporal de LDL (lipoproteínas de baja densidad) plasmáticas a lo largo del tratamiento con quimioterápicos. T1 es el estado basal. T2 es el final del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida. T3 es el final del tratamiento con taxanos. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas intra sujetos a lo largo del tiempo ($p < 0,05$).

De forma paralela a lo que sucedió en los niveles plasmáticos de HDL, la concentración plasmática de LDL se vio alterada a lo largo de la quimioterapia. En este caso, la principal diferencia se encontró en el punto T2 (final del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida). De acuerdo con la figura 36, los niveles más bajos de esta lipoproteína se alcanzaron en los puntos inicial y final, entre los cuales no se hallaron diferencias estadísticamente significativas. Estas diferencias sí se aprecian en la evolución creciente que sufrieron los niveles de LDL entre el punto basal (T1) y el final de la terapia con epirrubicina y ciclofosfamida (T2) ($p < 0,05$). Aunque no se detectaron diferencias significativas entre T2 y T3 (final de la quimioterapia).

Evolución de Triglicéridos en plasma

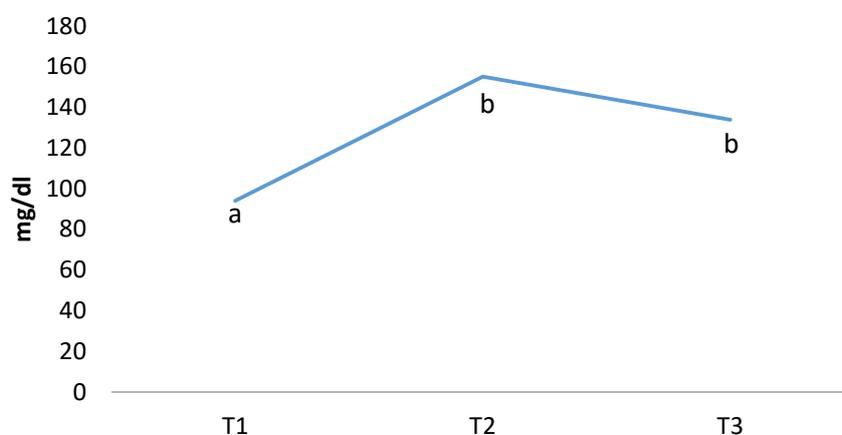


Figura 37. Evolución temporal de triglicéridos plasmáticos a lo largo del tratamiento con quimioterápicos. T1 es el estado basal. T2 es el final del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida. T3 es el final del tratamiento con taxanos. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas intra sujetos a lo largo del tiempo ($p < 0,05$).

Como última variable significativa relacionada con el perfil lipídico encontramos los niveles plasmáticos de triglicéridos. En este caso, de forma similar a lo que sucedía con los niveles de LDL, se encontró que las pacientes presentaron los valores más bajos de triglicéridos al inicio de la terapia antitumoral, produciéndose un incremento a lo largo del tratamiento quimioterápico. De esta forma, las comparaciones múltiples de Bonferroni hallaron diferencias significativas entre los puntos T1 (basal) y T2 (final de tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida) ($p < 0,05$) y entre los puntos inicial y final (T3) ($p < 0,05$). Asimismo, no se detectan diferencias significativas entre los puntos T2 y T3.

3.2 *Daño oxidativo y variables bioquímicas e histopatológicas durante la terapia antitumoral neoadyuvante (T1 y T6):*

3.2.1 *Daño oxidativo:*

3.2.1.1 Daño oxidativo asociado a proteínas

3.2.1.1.1 Resultados obtenidos por tiempo

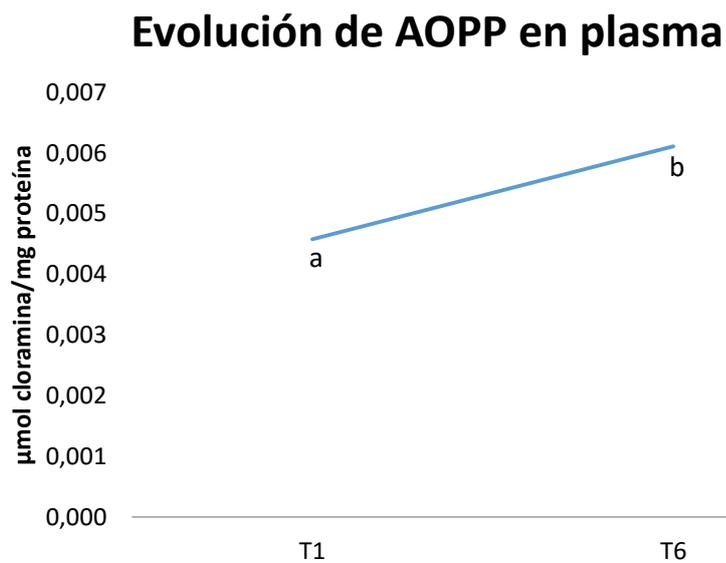


Figura 38. Evolución temporal de la concentración plasmática de AOPP (Productos finales de oxidación proteica) normalizados por concentración de proteínas totales del plasma a lo largo de la terapia antitumoral neoadyuvante. T1 es el estado basal y T6 tras un mes de la intervención quirúrgica. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas.

La concentración plasmática de AOPP evolucionó globalmente de forma creciente a lo largo de toda la terapia antitumoral neoadyuvante, independientemente del grupo al que perteneciesen las participantes, de acuerdo con el MLG ($p < 0,01$).

3.2.1.2 Daño oxidativo asociado a lípidos e hidratos de carbono

3.2.1.2.1 Resultados obtenidos por grupo x tiempo

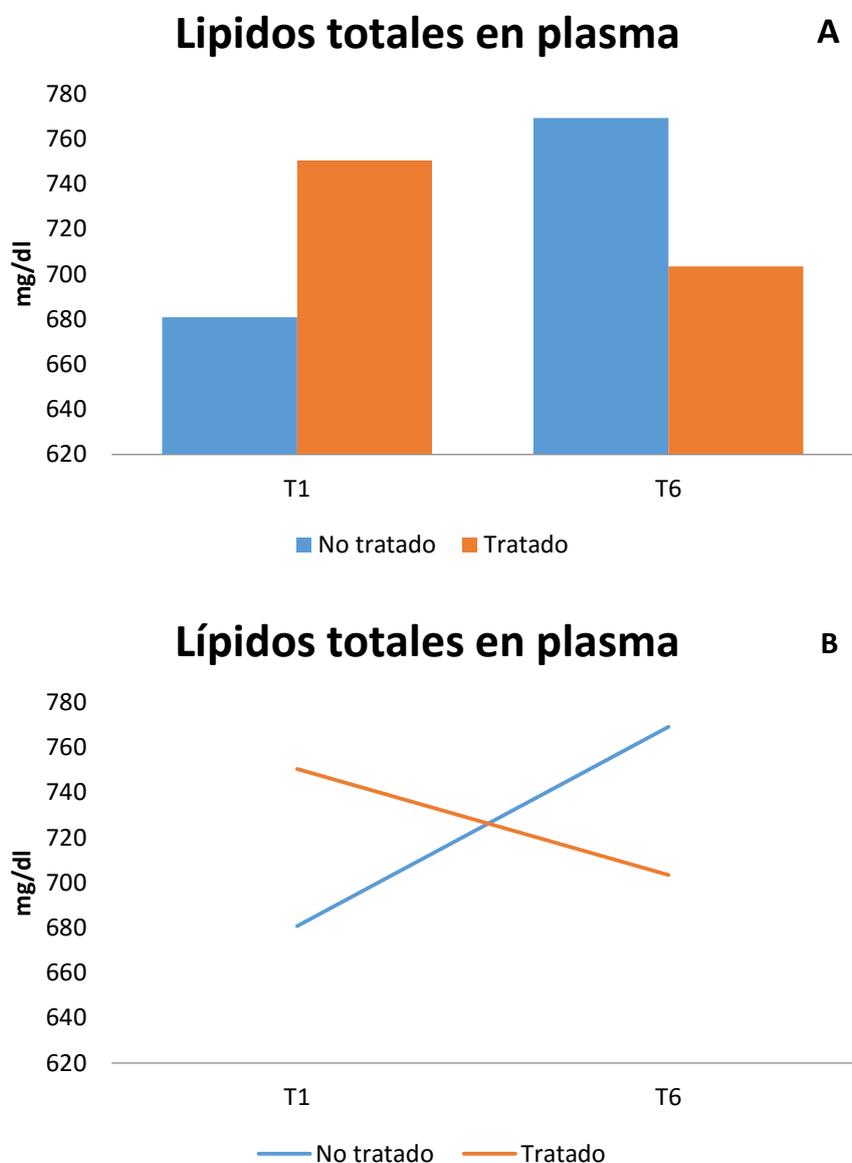


Figura 39. Niveles de lípidos totales determinados el plasma. Viene expresado como la interacción del tiempo x grupo y significancia de $p < 0,05$. A) Expresado en barras; B) Expresado linealmente.

Los resultados de concentración plasmática de lípidos totales mostraron diferencias estadísticamente significativas, según el MLG, para la interacción grupo x tiempo ($p < 0,05$). En este caso, existió una diferencia entre el hecho de estar asociado a un grupo de tratamiento u otro a lo largo del tiempo. Para averiguar dónde estaban localizadas las diferencias, se aplicaron las comparaciones múltiples de Bonferroni. Este test no pudo determinar dónde se encontraban las diferencias significativas debido a la escasa potencia asociada al bajo tamaño muestral. A pesar de ello, se encontró cierta tendencia a que fuese en el grupo no tratado con HT donde se produjesen, suponiendo un incremento

considerable a lo largo de toda la terapia antitumoral neoadyuvante, teniendo por tanto un comportamiento inverso al grupo tratado con HT.

3.2.1.2.2 Resultados obtenidos por tiempo

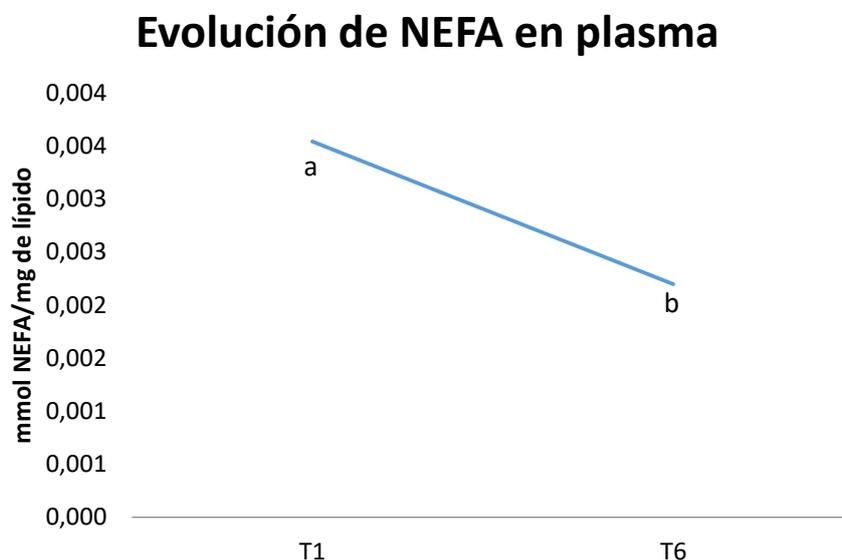


Figura 40. Evolución temporal de la concentración plasmática de NEFA (Ácidos grasos no esterificados) normalizados por la concentración de lípidos totales, a lo largo de la terapia antitumoral neoadyuvante. T1 es el estado basal y T6 tras un mes de la intervención quirúrgica. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

La evolución de la concentración plasmática de ácidos grasos no esterificados mostró, de acuerdo con el MLG, un carácter descendente a lo largo de la terapia antitumoral, independientemente del grupo de asignación al que perteneciese la paciente (tratado o placebo) ($p < 0,05$).

Evolución de AGE en plasma

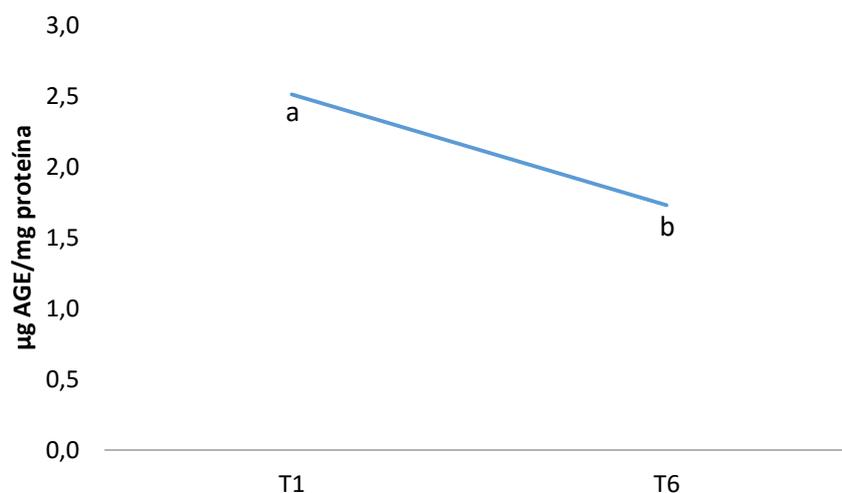


Figura 41. Evolución temporal de la concentración plasmática de productos finales de glicosilación avanzada (AGE) normalizados por proteínas totales en plasma, a lo largo de la terapia antitumoral neoadyuvante. T1 es el estado basal y T6 tras un mes de la intervención quirúrgica. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

La concentración plasmática de AGE evolucionó globalmente de forma descendente a lo largo de toda la terapia antitumoral neoadyuvante, independientemente del grupo al que perteneciesen las pacientes, de acuerdo con el MLG ($p < 0,001$).

3.2.1.3 Daño oxidativo asociado ácidos nucleicos

3.2.1.3.1 Resultados obtenidos por tiempo

Evolución de 8OH en plasma

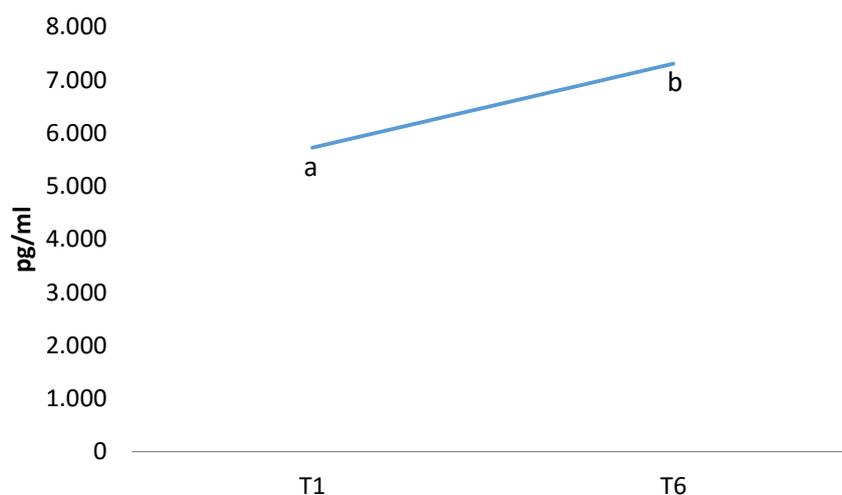


Figura 42. Evolución temporal de 8-hidroxiguanosina-2-deoxiguanosina (8OH) plasmática a lo largo de la terapia antitumoral neoadyuvante. T1 es el estado basal y T6 tras un mes de la intervención quirúrgica. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$).

De acuerdo con el MLG, al inicio del estudio las pacientes presentaron menores niveles de 8OHdG respecto al final de la terapia neoadyuvante ($p < 0,005$). Estos resultados indican que hubo una evolución creciente en esta variable a lo largo del tiempo, independientemente del grupo al que fueron asociadas.

3.2.1.4 Antioxidantes plasmáticos

3.2.1.4.1 *Resultados obtenidos por grupo*

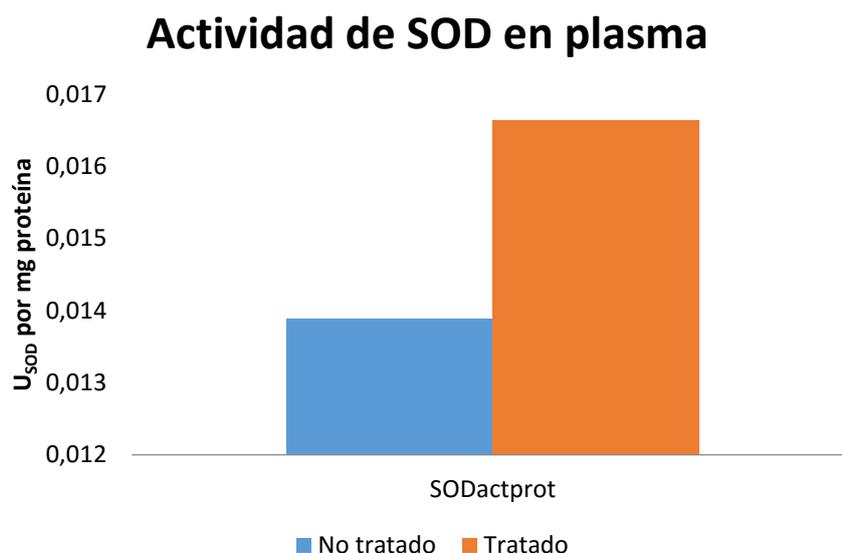


Figura 43. Niveles plasmáticos de actividad SOD normalizada por concentración total de proteínas plasmáticas en los distintos grupos (tratado y no tratado con Hidroxitirosol) a lo largo de toda la terapia antitumoral neoadyuvante y una significancia de $p < 0,05$.

La actividad SOD (Superóxido dismutasa) presentó diferencias estadísticamente significativas a nivel inter-sujetos, con independencia del tiempo ($p < 0,05$). De forma global, el hecho de asociar a una paciente al grupo tratado con HT promueve una mayor capacidad antioxidante asociada a SOD.

3.2.1.4.2 *Resultados obtenidos por tiempo*

Evolución de actividad Catalasa plasmática

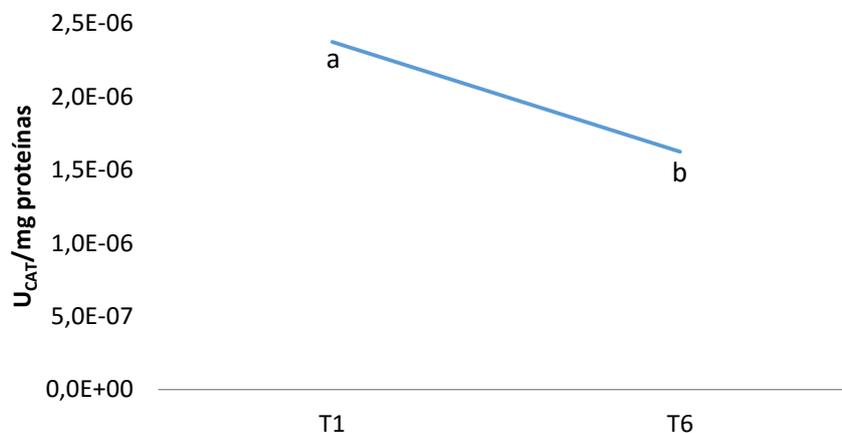


Figura 44. Evolución temporal de la actividad catalasa plasmática normalizada por concentración de proteínas totales del plasma, a lo largo de la terapia antitumoral neoadyuvante. T1 es el estado basal y T6 tras un mes de la intervención quirúrgica. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

La actividad catalasa plasmática se caracterizó por un descenso a lo largo de la terapia neoadyuvante. Las pacientes registraron los mayores niveles de defensa antioxidante asociada a catalasa a la llegada a consulta, disminuyendo significativamente al final del estudio ($p < 0,05$).

Evolución de actividad SOD en plasma

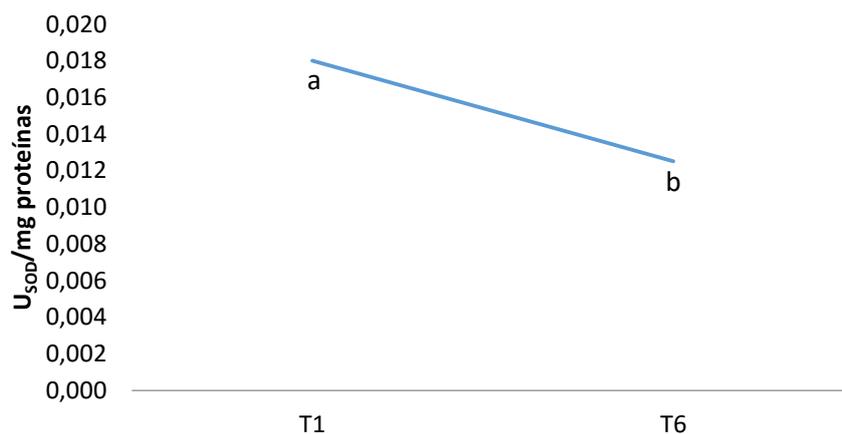


Figura 45. Evolución temporal de la actividad SOD (Superóxido dismutasa) plasmática normalizada por concentración de proteínas totales en plasma, a lo largo de la terapia antitumoral neoadyuvante. T1 es el estado basal y T6 tras un mes de la intervención quirúrgica. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

La actividad SOD, de forma similar a como ocurría con otras enzimas antioxidantes, se caracterizó por una disminución estadísticamente significativa a lo largo de la terapia antitumoral neoadyuvante independiente al grupo de asociación ($p < 0,001$).

3.2.1.5 Concentración de Sfrp-4 en plasma

3.2.1.5.1 Resultados obtenidos por tiempo

La concentración plasmática de Sfrp-4, aunque no presentó resultados estadísticamente significativos, sí demostró una tendencia ascendente a lo largo del tratamiento, independientemente del grupo, tal y como muestra la tabla 17. El MLG detectó cierta tendencia ($p = 0,052$) en el factor intra-sujetos sin llegar a obtenerse significancia. Esto puede deberse al escaso tamaño muestral que dota a los test estadísticos de una menor potencia de detección.

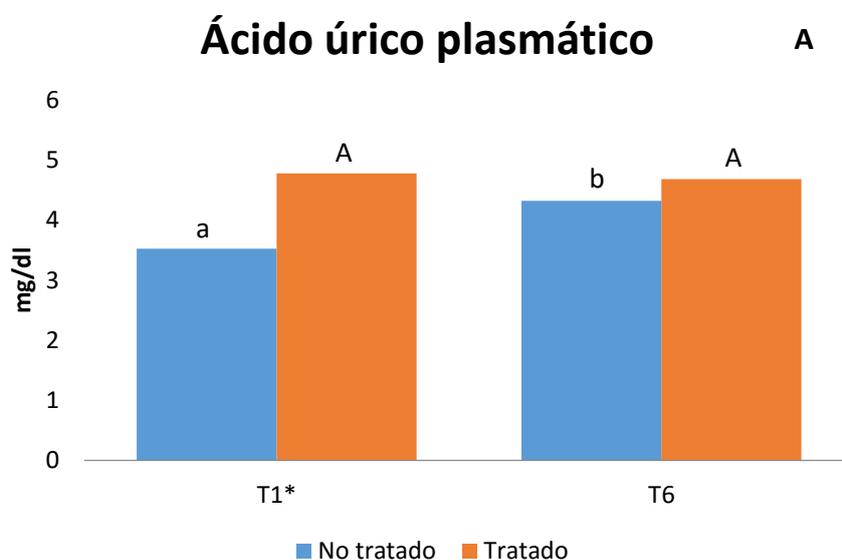
Tabla 17. Concentración plasmática de Sfrp4 (Secreted Frizzled-Related Protein 4) normalizada por concentración de proteínas totales del plasma, a lo largo de la terapia neoadyuvante para ambos grupos de tratamiento y significancia de $p = 0,052$.

Tiempo	Grupo	Media \pm EEM
T1	Placebo	0,00051 \pm 0.000262
	Tratado	0,00052 \pm 0.000224
	Total	0,00052 \pm 0.000236
T6	Placebo	0,00077 \pm 0.000624
	Tratado	0,00055 \pm 0.000386
	Total	0,00065 \pm 0.000503

EEM: Error estándar de la media

3.2.1.6 Variables histopatológicas y bioquímicas

3.2.1.6.1 Resultados obtenidos por grupo x tiempo



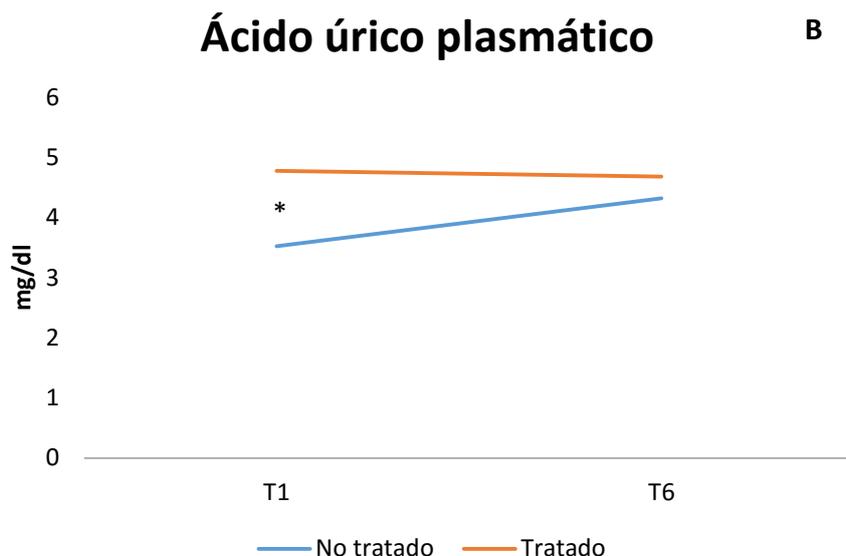
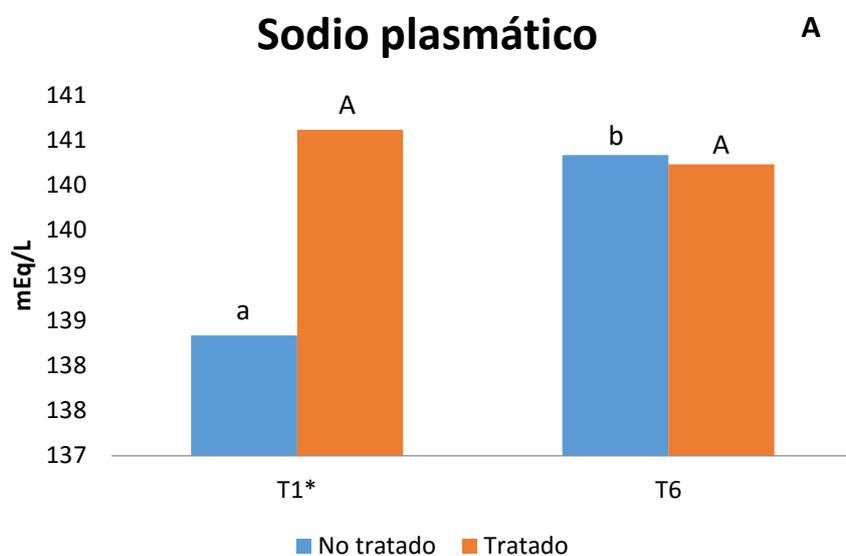


Figura 46. Niveles de ácido úrico determinados el plasma. Viene expresado como la interacción del tiempo x grupo y significancia de $p < 0,05$. A) Expresado en barras; B) Expresado linealmente. Las letras muestran la diferencia intra-sujetos, a lo largo del tiempo. Minúsculas para el grupo placebo y mayúsculas para el tratado. El asterisco (*) muestra las diferencias entre el grupo tratado y el placebo, factor inter-sujeto ($p < 0,05$).

De acuerdo con el MLG, se detectaron diferencias significativas para los valores de ácido úrico en plasma en la interacción grupo x tiempo conjuntamente ($p < 0,05$). Siguiendo el test de comparaciones múltiples de Bonferroni, se localizaron las diferencias existentes entre ambos grupos a nivel basal, mostrando que los niveles de partida de las pacientes tratadas con HT presentaban niveles superiores de ácido úrico frente a las participantes asociadas al grupo placebo ($p < 0,05$). Además, se detectó que la evolución temporal se dio en el grupo placebo a lo largo de toda la terapia antitumoral neoadyuvante, produciéndose un incremento estadísticamente significativo entre el punto inicial y final ($p < 0,01$). No se detectaron diferencias significativas en el punto final para ambos grupos.



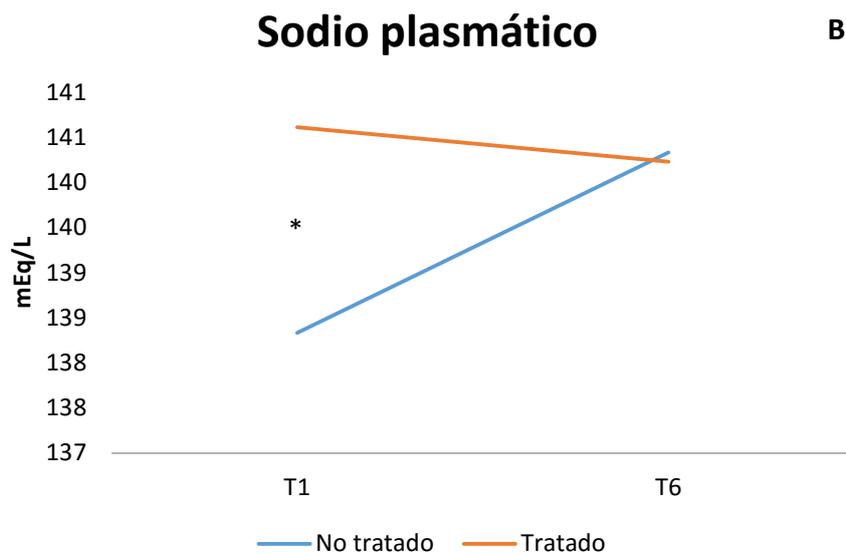


Figura 47. Nivel de sodio determinado el plasma. Viene expresado como la interacción del tiempo x grupo y una significancia de $p < 0,05$. A) Expresado en barras; B) Expresado linealmente. Las letras muestran la diferencia intra-sujetos, a lo largo del tiempo. Minúsculas para el grupo placebo y mayúsculas para el tratado. El asterisco (*) muestra las diferencias entre el grupo tratado y el placebo, factor inter-sujeto ($p < 0,05$).

En lo referente a los niveles plasmáticos de sodio, el MLG detectó diferencias estadísticamente significativas en la interacción grupo x tiempo ($p < 0,05$) que se trataron de identificar por comparaciones múltiples de Bonferroni. A través de estos test se halló que las diferencias significativas entre el grupo tratado y no tratado con HT se dieron en T1, mostrando que, a la llegada de las pacientes, ambos grupos presentaban diferencias en cuanto a los niveles de sodio plasmático, siendo mucho mayores en el grupo tratado con HT ($p < 0,05$). Las diferencias significativas a lo largo de la terapia se encontraron en el grupo placebo, desde el estado basal hasta el final de la terapia antitumoral neoadyuvante ($p < 0,05$), a diferencia del grupo tratado que mantuvo sus niveles constantes a lo largo de todo el tratamiento. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas inter-sujetos al finalizar la terapia antitumoral.

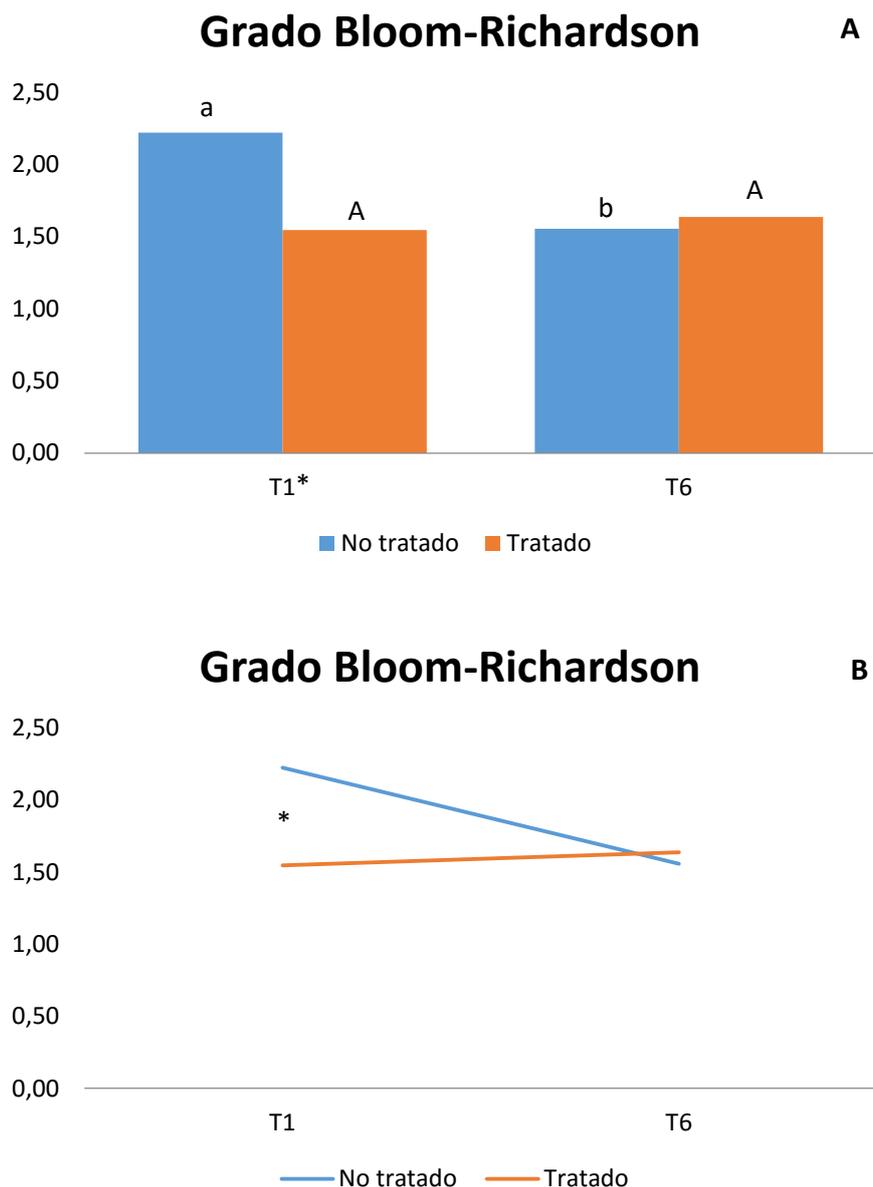


Figura 48. Grado Bloom-Richardson. Viene expresado como la interacción del tiempo x grupo ($p < 0,005$). A) Expresado en barras; B) Expresado linealmente. Las letras muestran la diferencia intra-sujetos. Minúsculas para el grupo placebo y mayúsculas para el tratado. El asterisco (*) muestra las diferencias entre el grupo tratado y el placebo, factor inter-sujeto ($p < 0,05$).

La variable de grado Bloom-Richardson, a diferencia de las anteriores, tiene como punto final (T6) el día de la intervención quirúrgica correspondiente a la terapia neoadyuvante. En esta intervención, se determinó el grado tumoral para cada una de las pacientes. De acuerdo con el MLG, se encontraron diferencias significativas en el tiempo y grupo conjuntamente ($p < 0,005$). Se detectaron diferencias inter-sujeto a nivel basal, de forma que el grupo placebo presentaba un grado Bloom-Richardson mayor que el correspondiente al grupo tratado ($p < 0,05$). Además, se pudo comprobar una evolución temporal asociada únicamente al grupo no tratado, produciéndose un descenso significativo de esta variable a lo largo del tratamiento quimioterápico ($p < 0,05$), sin que

se viese modificado en el grupo tratado con HT a lo largo del tiempo. Finalmente, no se encontraron diferencias significativas inter-sujetos al término de la terapia antitumoral.

3.2.1.6.2 Resultados obtenidos por tiempo

Evolución de Ácido Úrico en plasma

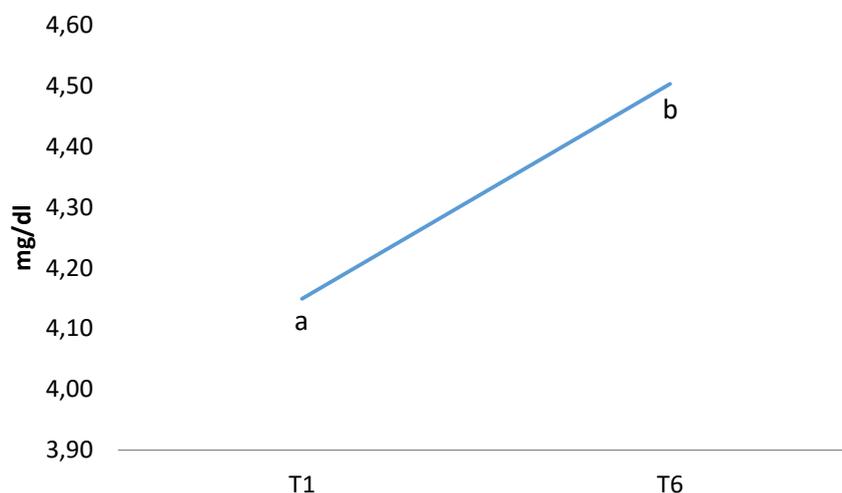


Figura 49. Evolución temporal de la concentración plasmática de ácido úrico a lo largo de la terapia antitumoral neoadyuvante. T1 es el estado basal y T6 tras un mes de la intervención quirúrgica. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

La concentración plasmática de ácido úrico se incrementó a lo largo de la terapia neoadyuvante de forma independiente al grupo de asociación. De esta forma, las pacientes registraron los menores niveles de esta variable al inicio del estudio, produciéndose un incremento significativo ($p < 0,05$).

Evolución de bilirrubina total en plasma

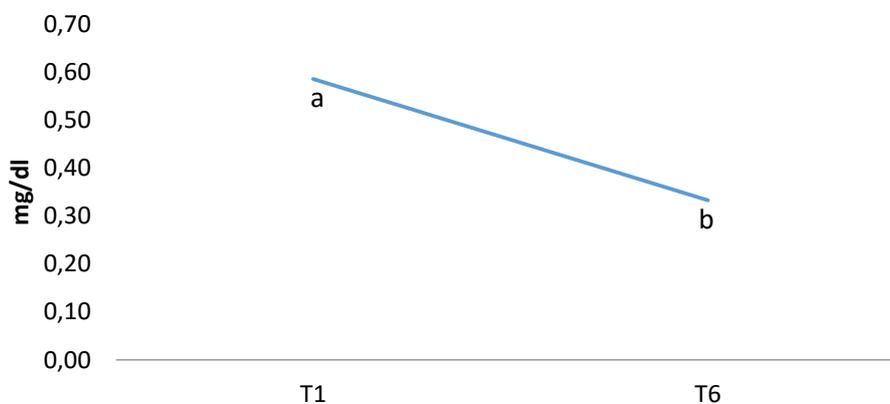


Figura 50. Evolución temporal de la concentración plasmática de bilirrubina total a lo largo de la terapia antitumoral neoadyuvante. T1 es el estado basal y T6 tras un mes de la intervención quirúrgica. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$).

La concentración de bilirrubina total plasmática se caracteriza por ser la suma de la bilirrubina no conjugada y la conjugada. A diferencia del ascenso esperado en su concentración, el MLG detectó un descenso global en los niveles totales de bilirrubina en plasma a lo largo de la terapia antitumoral ($p < 0,05$).

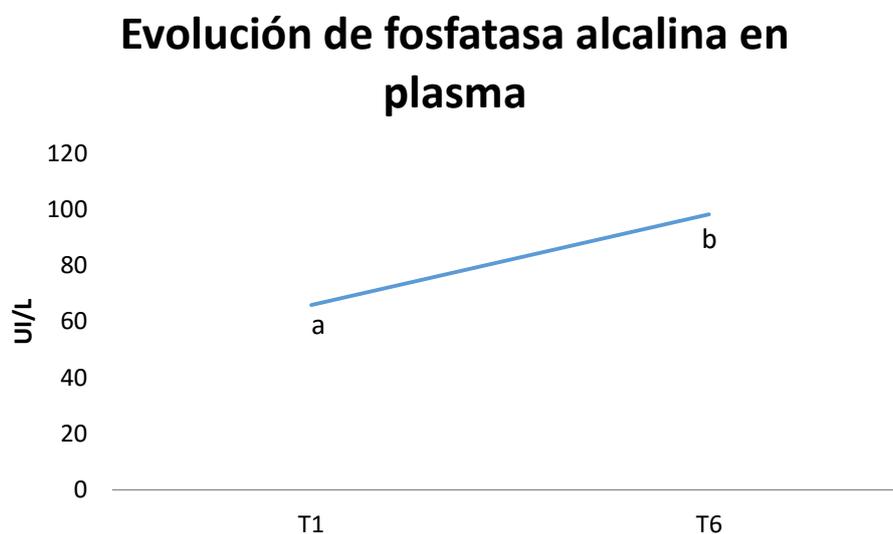


Figura 51. Evolución temporal de la concentración plasmática de fosfatasa ácida a lo largo de la terapia antitumoral neoadyuvante. T1 es el estado basal y T6 tras un mes de la intervención quirúrgica. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

De acuerdo con el MLG, la fosfatasa ácida presentó un aumento estadísticamente significativo en su concentración plasmática a lo largo de la terapia neoadyuvante, de forma independiente al grupo de asociación de las participantes ($p < 0,001$). De esta forma, los niveles más bajos de esta variable en las pacientes se localizaron al inicio de la terapia antitumoral.

Evolución de LDH plasmática

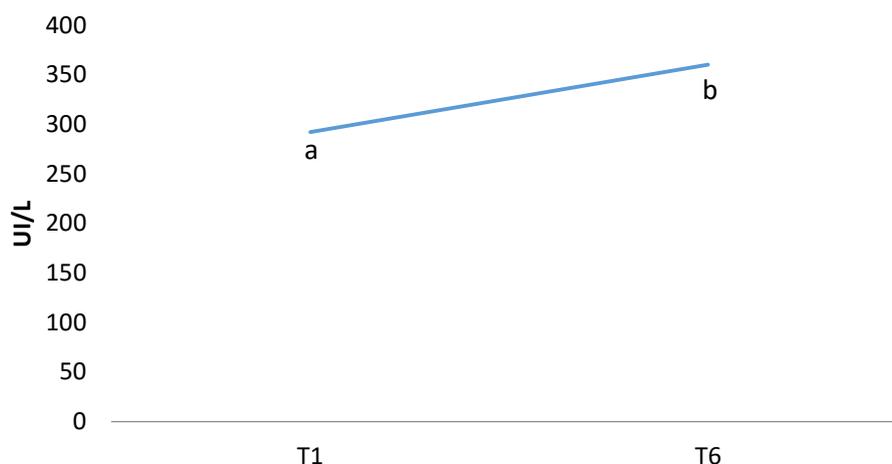


Figura 52. Evolución temporal de la concentración plasmática de lactato deshidrogenasa (LDH) a lo largo de la terapia antitumoral neoadyuvante. T1 es el estado basal y T6 tras un mes de la intervención quirúrgica. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$).

En la determinación de los valores plasmáticos de la enzima LDH, el MLG detectó un incremento estadísticamente significativo a lo largo del tratamiento antitumoral. Según este test, los niveles de concentración plasmática más bajos de LDH se localizaron en el punto inicial del tratamiento antitumoral, produciéndose un incremento gradual de forma independiente al grupo de asociación de las participantes ($p < 0,005$).

Evolución de GGT en plasma

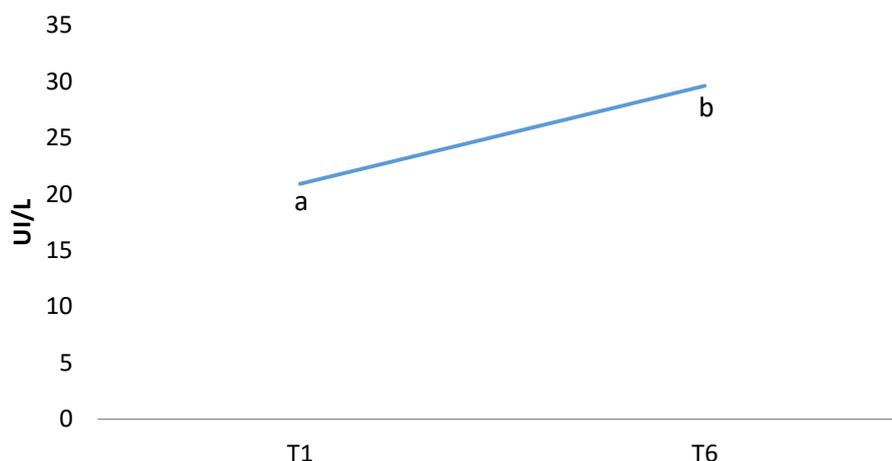


Figura 53. Evolución temporal de la concentración plasmática de gamma glutamil transferasa (GGT) a lo largo de la terapia antitumoral neoadyuvante. T1 es el estado basal y T6 tras un mes de la intervención quirúrgica. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

La concentración en plasma GGT se incrementó a lo largo de la terapia neoadyuvante de forma independiente al grupo de asociación. De esta forma, las pacientes presentaron los niveles más bajos de esta variable al inicio del estudio, existiendo un incremento significativo, detectado por el MLG ($p < 0,05$).

Evolución de GPT en plasma

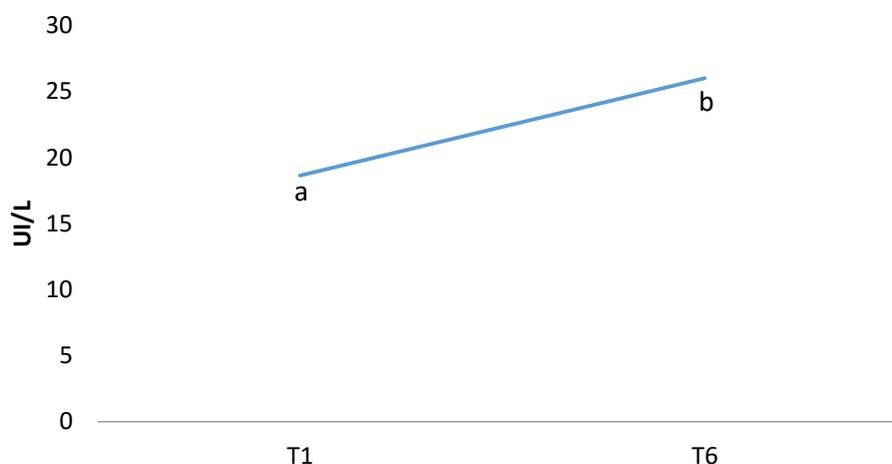


Figura 54. Evolución temporal de la concentración plasmática de transaminasa glutámico-pirúvica (GPT) a lo largo de la terapia antitumoral neoadyuvante. T1 es el estado basal y T6 tras un mes de la intervención quirúrgica. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

De acuerdo con el MLG, la concentración plasmática de GPT presentaba sus niveles más bajos al diagnóstico de las pacientes de cáncer de mama (punto basal). Esta concentración se vio incrementada a lo largo de la terapia antitumoral de forma independiente al grupo de asociación de las participantes ($p < 0,05$).

Evolución de GOT en plasma

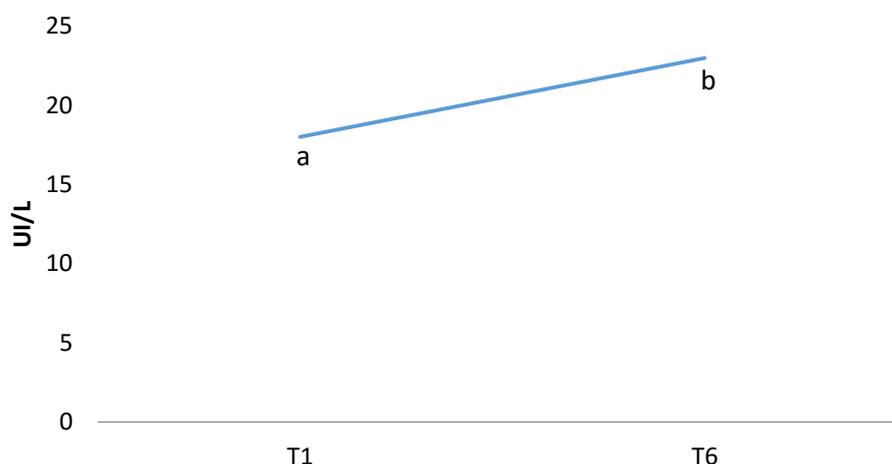


Figura 55. Evolución temporal de la concentración plasmática de transaminasa glutámico-oxalacética (GOT) a lo largo de la terapia antitumoral neoadyuvante. T1 es el estado basal y T6 tras un mes de la intervención quirúrgica. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$).

En la determinación de los valores plasmáticos de GOT, el test estadístico aplicado (MLG) detectó un incremento estadísticamente significativo a lo largo del tratamiento antitumoral. De acuerdo con esto, los niveles de concentración plasmática más bajos de

GOT se encontraron en el punto inicial del tratamiento antitumoral, produciéndose un incremento gradual de forma independiente al grupo de asociación de las participantes ($p < 0,005$).

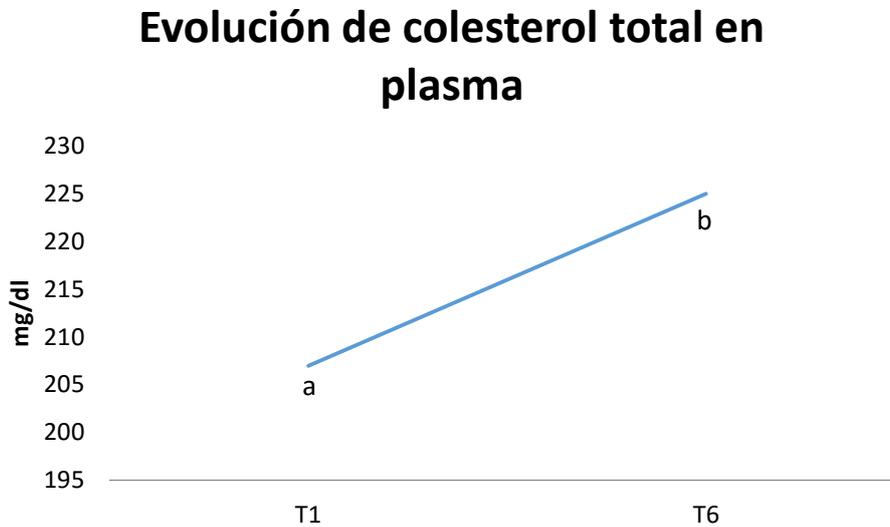


Figura 56. Evolución temporal de la concentración plasmática de colesterol total a lo largo de la terapia antitumoral neoadyuvante. T1 es el estado basal y T6 tras un mes de la intervención quirúrgica. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

De acuerdo con el MLG, el colesterol total presentó un aumento estadísticamente significativo en su concentración plasmática a lo largo de la terapia neoadyuvante, de forma independiente al grupo de asociación de las participantes ($p < 0,05$). Así, los niveles más bajos de esta variable en las pacientes fueron localizados al inicio de la terapia antitumoral.

Evolución de LDL plasmática

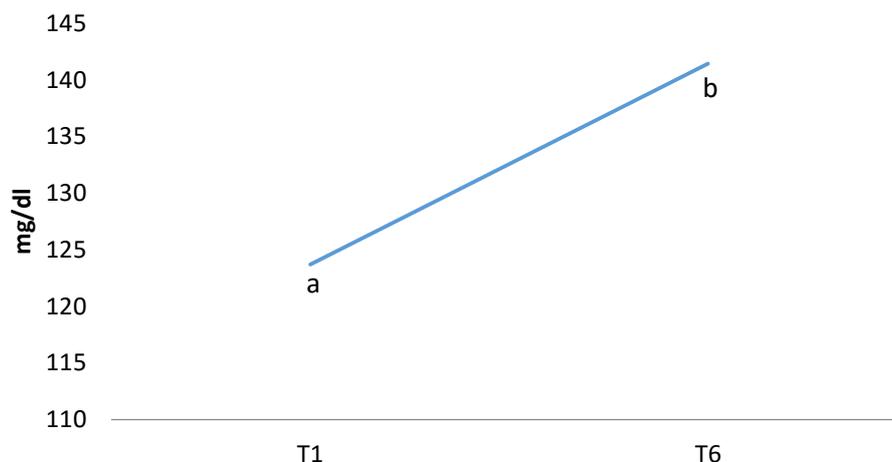


Figura 57. Evolución temporal de la concentración plasmática de LDL (lipoproteínas de baja densidad) a lo largo de la terapia antitumoral neoadyuvante. T1 es el estado basal y T6 tras un mes de la intervención quirúrgica. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

De forma paralela al incremento producido en los niveles totales de colesterol, la concentración de lipoproteínas de baja densidad se vio incrementada a lo largo de la terapia antitumoral, tal y como detectó el MLG, de forma independiente al grupo de asociación de las pacientes ($p < 0,01$).

Evolución de triglicéridos en plasma

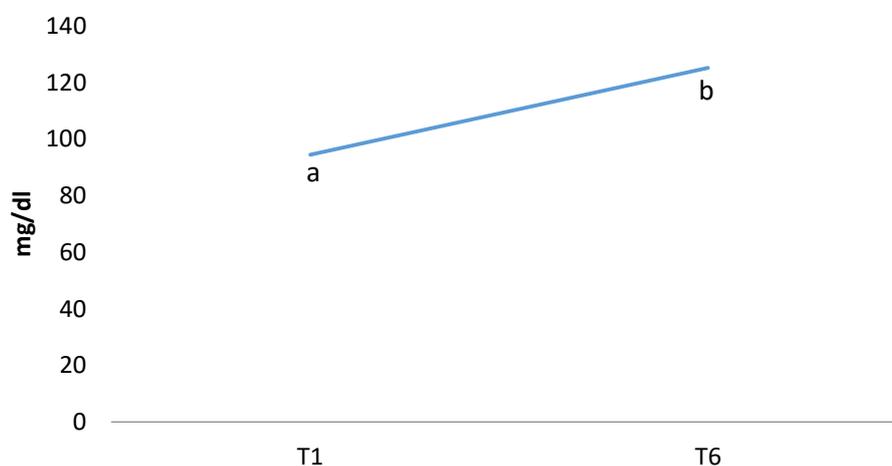


Figura 58. Evolución temporal de la concentración plasmática de triglicéridos a lo largo de la terapia antitumoral neoadyuvante. T1 es el estado basal y T6 tras un mes de la intervención quirúrgica. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas $p < 0,005$.

La concentración en plasma de triglicéridos se incrementó a lo largo de la terapia neoadyuvante de forma independiente al grupo de asociación. De esta forma, las pacientes registraron los valores más bajos al inicio del estudio, produciéndose un incremento significativo ($p < 0,005$).

Evolución de grado Bloom-Richardson

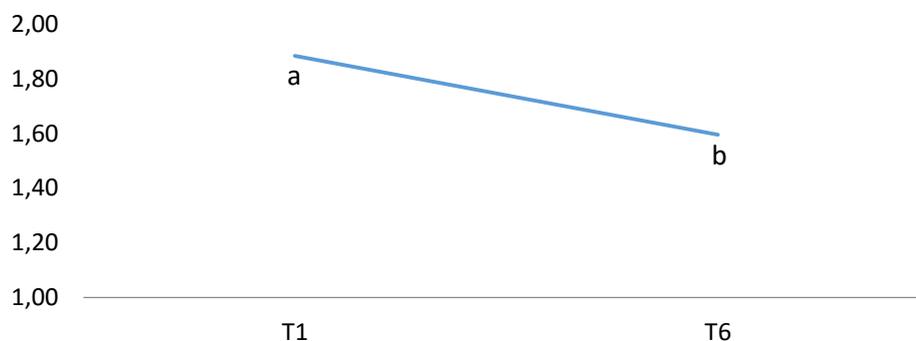


Figura 59. Evolución temporal del grado Bloom-Richardson lo largo de la terapia antitumoral neoadyuvante. T1 es el estado basal y T6 el día de la intervención quirúrgica. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$).

El grado Bloom-Richardson nos indica de forma general cómo de diferenciadas están las células tumorales respecto a las sanas, indicando el posible comportamiento de crecimiento tumoral. Este factor presentó sus niveles más altos al inicio del tratamiento (detectado en biopsia). Tras el comienzo de la terapia antitumoral neoadyuvante se observó, de acuerdo con el MLG, un descenso estadísticamente significativos en sus valores, desde el punto inicial del tratamiento hasta el final del tratamiento farmacológico (T6 para este caso) ($p < 0,01$). Este descenso marca por tanto cómo el tratamiento quimioterápico ha conseguido disminuir de forma significativa el grado tumoral en las pacientes, con independencia de la pertenencia al grupo tratado o no tratado con HT.

Evolución de Ki-67

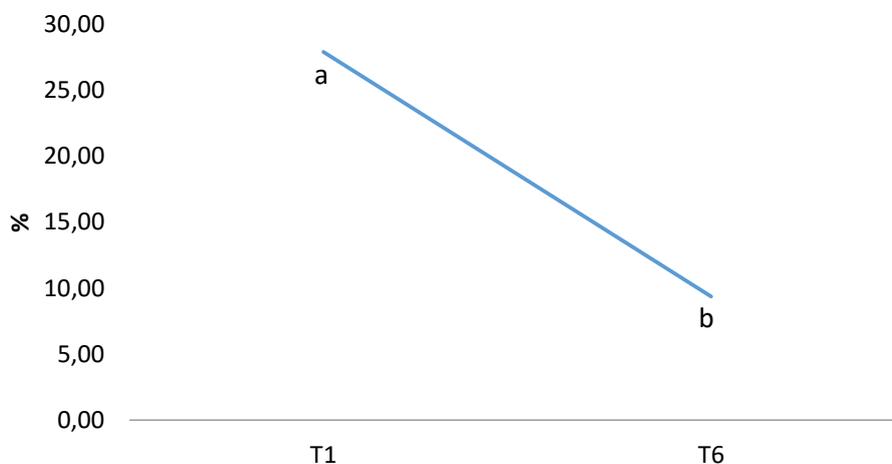


Figura 60. Evolución temporal de Ki-67 lo largo de la terapia antitumoral neoadyuvante. T1 es el estado basal y T6 el día de la intervención quirúrgica. Las letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

El porcentaje de Ki-67 nos indica el grado de proliferación de las células tumorales. Este marcador pronóstico presentaba sus niveles más altos a la llegada de las pacientes a consulta (detectado en biopsia). Tras el diagnóstico y comienzo de la terapia antitumoral neoadyuvante, se observó, de acuerdo con el MLG, un descenso estadísticamente significativos en sus valores, desde el punto inicial del tratamiento hasta el final del tratamiento quimioterápico (T6 para este caso) ($p < 0,001$). Este descenso marca por tanto cómo el tratamiento quimioterápico ha conseguido disminuir de forma significativa los niveles de proliferación celular en las pacientes, con independencia de la pertenencia al grupo tratado o no tratado con HT.

CAPITULO 4 DISCUSIÓN

4.1 Características del ensayo clínico y efecto del hidroxitirosol

Este ensayo clínico se origina como consecuencia de una serie de hallazgos relacionados con el HT y su capacidad antitumoral. Hasta el 2011, se habían encontrado ciertas evidencias de que esta molécula presentaba propiedades antioxidantes muy relevantes y se habían dado los primeros pasos para postular al HT como un compuesto de marcado efecto antitumoral. A partir de esta fecha, nuestro grupo de investigación llevan a cabo, por primera vez, un estudio con animales de experimentación a los que se les inducía un tumor mamario con DMBA y se les sometía a distintos quimioterápicos, combinados o no, con HT, además de un grupo que únicamente recibió HT. Los resultados de este trabajo dieron a conocer, por primera vez, que el HT, cuando se administraba a dosis de 0,5 mg/kg, era capaz de ejercer un efecto antitumoral *per se* con igual potencia que otros quimioterápicos empleados como Doxorubicina (del grupo de antraciclinas). Así mismo, el HT revertía distintos efectos asociados a los propios quimioterápicos (Sergio Granados-Principal et al., 2014; Granados-Principal et al., 2011). La ventaja que refería este compuesto frente a los quimioterápicos convencionales era la nula toxicidad demostrada a lo largo de diversos estudios en los que evalúan su teratogenicidad, mortalidad, toxicidad aguda, subcrónica y crónica, tanto en células como en animales de experimentación, a dosis de hasta 5g/kg (Aunon-Calles et al., 2013; Christian et al., 2004; D'Angelo et al., 2001).

Debido a los evidentes resultados que demostraban el efecto antitumoral del HT *in vivo*, se decidió dar un paso al frente y realizar un ensayo clínico que permitiese conocer si este efecto antitumoral en el cáncer de mama podía trasladarse a humanos, con la particularidad de ser el primer estudio (de acuerdo con la bibliografía revisada hasta el año 2016) realizado en pacientes diagnosticadas con cáncer de mama a las que se les ha suplementado HT a dosis de 15mg/día. En este caso, por lógicos motivos éticos, la suplementación de HT se realizó en sólo uno de los dos grupos tratados con terapia neoadyuvante, aleatoriamente seleccionados. Era, por tanto, imposible testar el efecto del HT como único tratamiento antitumoral, puesto que se administró conjuntamente con quimioterápicos (epirrubicina y ciclofosfamida, seguido de taxanos).

La elección de la dosis de HT para este ensayo clínico se llevó a cabo tras el estudio de diferentes dosis empleadas previamente en estudios con humanos. Dichos estudios administraban HT a individuos sanos en forma de aceite de oliva enriquecido y olivas para determinar, bien el efecto del HT sobre distintas biomoléculas como lipoproteínas LDL y HDL, o bien para establecer distintos aspectos sobre su biodisponibilidad. La mayor parte de estos estudios oscilaban en un rango de dosis desde 0,25 a 5 mg de HT por día (Castaner et al., 2012; Covas et al., 2006; Marrugat et al., 2004; Oliveras-Lopez et al., 2013). Otros estudios, sin embargo, emplearon extractos de hojas de olivo con una cantidad establecida de 9,7 mg de HT en forma de capsulas (de Bock, Thorstensen, et al., 2013). Excepcionalmente, algunos estudios se centraron en distintas situaciones patológicas como trastornos del perfil lipídico, a dosis de entre 0,2 y 1 mg de

HT por día en forma de aceite de oliva (Ruano et al., 2007; Valls et al., 2015) o de 9,7mg de HT en forma de capsulas de extracto de hojas de olivo (de Bock, Derraik, et al., 2013). Así mismo, diversos estudios se llevaron a cabo en pacientes con afecciones inflamatorias y vasculares que ingerían alrededor de 10 mg de HT en forma de preparados comerciales (Lockyer, Corona, Yaqoob, Spencer, & Rowland, 2015; Takeda, Koike, Taniguchi, & Tanaka, 2013; Verhoeven et al., 2015). Sin embargo, sólo un estudio llevado a cabo por Kountouri, M. y col. (Kountouri, Mylona, Kaliora, & Andrikopoulos, 2007) superó los 10 mg de HT, administrando una dosis de 73,4 mg de HT en forma de olivas de Kalamata a individuos sanos con el objetivo de evaluar la biodisponibilidad de los polifenoles presentes en dichos frutos.

La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) establece el rango de 2 a 15 mg de HT al día, con el fin de establecer una dosis segura para las pacientes. De acuerdo con la EFSA, está principalmente recomendado para la disminución de la oxidación de LDL y mejora del riesgo cardiovascular (EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, 2011). Según estas recomendaciones de seguridad y debido a que las pacientes fueron sometidas a múltiples efectos adversos asociados a los fármacos quimioterápicos, se estimó mantener el rango de concentración prescrito por dicha institución, administrándose HT a la máxima dosis recomendada (15 mg de HT al día), en forma de cápsulas con extracto de HT, suplementado durante toda la terapia antitumoral neoadyuvante, encontrándose dentro de valores establecidos como seguros por la EFSA y a niveles superiores a los realizados en estudios previos con humanos. Todo ello permitió conocer si el HT modulaba el efecto de los distintos quimioterápicos, si potenciaba su efecto antitumoral, si combatía los efectos adversos asociados a la terapia y si la respuesta global de las pacientes mejoraba.

De acuerdo con los resultados obtenidos de concentración de derivados de HT en plasma, quedó constatado que las pacientes asociadas al grupo tratado con HT tomaron el suplemento de forma adecuada a lo largo del estudio, pues llegaron incluso a multiplicar por 10 los valores plasmáticos del derivado de HT-sulfato al final del tratamiento quimioterápico (T3) ($p < 0,05$).

Algunos estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, principalmente en animales, han demostrado un efecto positivo del HT en el cáncer de mama, así como modulador del estrés oxidativo (Sergio Granados-Principal et al., 2014; Granados-Principal et al., 2011; Warleta et al., 2011), sin embargo, en este estudio sólo pudieron observarse sus efectos asociados al grupo (placebo o HT), durante el tratamiento quimioterápico, en los valores de HDL, LDL y OTM. Así mismo, las diferencias encontradas entre grupos (tratado con HT y placebo) a lo largo de la quimioterapia (interacción tiempo x grupo) se dieron únicamente en los niveles plasmáticos de ácido úrico, sodio y GOT.

Teniendo en cuenta el tratamiento antitumoral completo, se encontraron diferencias significativas asociadas exclusivamente al grupo (tratado con HT o placebo) únicamente en la variable SOD. Así mismo, cuando se estableció la comparativa de la interacción tiempo x grupo para el tratamiento antitumoral completo, se hallaron diferencias significativas en la concentración plasmática de Sodio y Ácido Úrico.

En referencia al daño oxidativo en ADN (OTM), el estudio llevado a cabo por Bhatti, S. y col. en 2008 (Bhatti et al., 2008), trató de averiguar si existían diferencias en los niveles OTM de linfocitos aislados en individuos inicialmente sanos que desarrollaron tumores de diversa índole, comparando los valores de daño en ADN entre el estado basal (sanos) y el estado patológico. Estos valores de OTM, determinados por Bhatti, S. y col. 2008, y anteriormente descritos por Sigurdson, H. y col. (Sigurdson et al., 2005), mostraban por tanto una referencia del daño oxidativo en el ADN (medido como Olive Tail Moment) tanto en pacientes con cáncer (incluido cáncer de mama) como para individuos sanos. Al comparar estos valores con los resultados de OTM obtenidos en nuestro estudio con pacientes de cáncer de mama, se comprobó que, a pesar de haber obtenido diferencias significativas inter-sujetos (tratadas con HT o placebo) y que el valor de OTM fuese mayor en el grupo HT, ambos grupos se encontraron dentro de valores de OTM asociados a la patología en sí misma y a valores establecidos para individuos sanos (Bajpayee et al., 2005; Bhatti et al., 2008). Debido a que ambos grupos se encontraron dentro de la normalidad establecida para esta variable, los resultados no aportaban una idea de daño oxidativo asociado a un grupo u otro, careciendo por tanto de interés clínico.

En relación a las variables bioquímicas para las que, durante el tratamiento quimioterápico, se hallaron diferencias significativas respecto al grupo de tratamiento (HDL y LDL) y respecto a la interacción tiempo x grupo (ácido úrico, sodio y GOT), debe resaltarse que la concentración plasmática de cada una de estas variables se situó dentro de los valores de referencia contemplados para un individuo sano (Kratz, Ferraro, Sluss, & Lewandrowski, 2004), a pesar de que la ciclofosfamida es potencialmente hiperuricémica. La pertenencia a un grupo placebo o intervenido fue indiferente debido, principalmente, al reducido valor clínico observado. De esta forma, se puede deducir que **el HT no interfiere en el metabolismo de las purinas ni del colesterol** (a pesar de que es su papel principal asignado por la EFSA). Así mismo, no modifica significativamente la concentración de electrolitos plasmáticos y no repercute significativamente en la concentración de GOT (a pesar de haber mantenido unos valores constantes más bajos que el grupo placebo, sin llegar a ser significativos entre ambos grupos).

Si se tienen en cuenta las variables para las que se hallaron diferencias a consecuencia del tratamiento antitumoral completo, bien por grupo (SOD), o bien por la interacción tiempo x grupo (sodio y ácido úrico), se puede observar que el grupo tratado con HT presentó de forma global unos valores de SOD más elevados que el grupo placebo. Aunque estas diferencias indican un efecto positivo del tratamiento con HT, el hecho de que no exista una asociación temporal a esas diferencias limita, en parte, los resultados, ya que se desconoce si es por efecto directo del tratamiento o porque las pacientes seleccionadas aleatoriamente a ese grupo presentaban de forma general mayor capacidad antioxidante asociada a SOD.

En lo relativo a los niveles de Sodio plasmático, las diferencias halladas se encontraron al inicio del estudio, donde aún no se había suministrado el suplemento. Esta diferencia, asociada a la interacción tiempo x grupo, no nos aporta una idea clínicamente interesante de qué ocurre con nuestra molécula, pues es anterior a la administración de la

misma. El hecho de que, al terminar el estudio, los niveles de sodio fuesen finalmente idénticos para ambos grupos y que éste se encontrase dentro de los valores de referencia, restó importancia a la diferencia encontrada para dicha interacción e HT.

Este mismo patrón se repitió cuando la variable de estudio fue el Ácido Úrico. De nuevo, las pacientes registraron una diferencia significativa previa al inicio del tratamiento con placebo o HT. De la misma forma, los valores de Ácido Úrico se igualan al final del ensayo y ambos se sitúan dentro de un rango normal para un individuo sano.

Si se tiene en cuenta que las diferencias encontradas para el grupo de tratamiento son escasas respecto a las encontradas para el tiempo (independientemente del grupo) y que en aquellas en las que se hallaron diferencias significativas se mantuvieron dentro de los rangos normales establecidos para un individuo sano, se puede deducir que asociar a las pacientes a un grupo u otro (tratado con HT o placebo) carece de interés. A pesar de esto, se debe resaltar la idea de que el HT ha presentado en múltiples estudios, efectos perfectamente constatables que le han servido incluso para encontrar una posición como recomendación por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria, hecho difícil de conseguir. El no haber encontrado un efecto claramente distintivo en este estudio puede deberse en gran medida al tamaño muestral empleado, pues muchas de las diferencias encontradas por el MLG no se pudieron detectar posteriormente a través de las Comparaciones Múltiples de Bonferroni, hecho generalmente asociado a un tamaño muestral escaso. De ahí que sea necesario seguir incrementando el número de participantes de este estudio para poder aseverar que las diferencias encontradas se deben o no al efecto del HT. No obstante, sí se encontraron múltiples diferencias asociadas al tiempo, lo que permitió conocer cómo cursa el cáncer de mama y qué características lo definen o pueden hacerlo en un futuro próximo. Por todo lo descrito anteriormente, la discusión de la tesis doctoral va a ir dirigida al efecto de la quimioterapia en el tiempo de tratamiento.

4.2 Características clínicas de la población

Las características clínicas de las pacientes reclutadas en este estudio fueron un reflejo de las particularidades clínicas globales del cáncer de mama en la sociedad. A pesar de que la población de estudio fue sometida inicialmente a una selección en función de la expresión de receptores hormonales (RE y/o RP), sin amplificación del gen HER-2 (fenotipos Luminal A y B), las características clínicas generales de las participantes se correlacionaban con lo establecido en la literatura para esta patología. De esta forma, encontramos que la edad mínima de las pacientes fue de 38 años y la máxima de 70, con un promedio de 50 años para ambos grupos (tratado y placebo), situándose por tanto dentro del rango de mayor incidencia establecido para el cáncer de mama (GLOBOCAM, 2012).

Otra de las características inherentes a la población de estudio fue el valor de Ki67 al inicio del ensayo (determinado sobre material biopsiado) y al finalizar la quimioterapia

neoadyuvante (determinado sobre el material extirpado quirúrgicamente). El porcentaje de células teñidas para Ki67 aporta una idea de la proliferación celular, indicando de tal forma que, un mayor grado de tinción, conlleva la existencia de un mayor número de células en división. Niveles elevados de este parámetro se relaciona con un peor pronóstico, aunque las pacientes parecen responder mejor al tratamiento quimioterápico (de Azambuja et al., 2007; Panal Cusati et al., 2014). Para la variable Ki67 no se encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado y el grupo placebo a lo largo del tiempo, por lo que se evaluó únicamente en función del tiempo, donde se hallaron diferencias significativas asociadas al efecto de los quimioterápicos ($p < 0,001$). Las pacientes comenzaron el ensayo con valores de Ki67 en torno al $27,8 \pm 3,1\%$ y finalizaron la quimioterapia neoadyuvante con valores $9,3 \pm 2,1\%$. Según estos datos, se pudo observar un esperado descenso en los niveles de proliferación celular promovidos por el efecto de la quimioterapia, objetivo perseguido, no obstante, por la propia terapia antitumoral. Además, los valores de Ki67 se han relacionado con el pronóstico y la respuesta patológica de las pacientes. De acuerdo con Horimoto, Y. y col. (Horimoto et al., 2014), un porcentaje de Ki67 superior al 35% está correlacionado con una respuesta patológica menor y peor pronóstico de supervivencia a 5 años. De igual forma, Yoshioka, T. y col. (Yoshioka et al., 2015), determinaron que una expresión elevada de Ki67 post-quimioterapia se relacionaba con una menor tasa de supervivencia libre de tumores y peor pronóstico a largo plazo. Observando la respuesta patológica (Miller y Paine), del total de las pacientes reclutadas en nuestro estudio, el 40% presentó una respuesta patológica de grado 3 (reducción marcada de celularidad tumoral invasiva entre 30% y 90% de la masa tumoral), un 56% obtuvo una respuesta de grado 4 (focos microscópicos de carcinoma invasivo) y finalmente, el 4% obtuvo una respuesta de grado 5 (sin evidencia de tumor residual invasivo). De acuerdo con Horimoto, Y. y col. 2014 y con Yoshioka, T. y col. 2015, y según los resultados de Ki67 y la respuesta de Miller y Paine de nuestro estudio, se comprueba que las pacientes de nuestro ensayo presentaban inicialmente un pronóstico de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante favorable (Ki67 menor al 35%). Además, tras el tratamiento quimioterápico, se produjo un descenso importante en la expresión de la proteína Ki67, que implica un pronóstico relativamente favorable de supervivencia libre de tumores y que queda apoyado con una respuesta de Miller y Paine de grados 3, 4 y 5, sin ninguna tipo 1 ó 2.

El hecho de encontrarnos ante un estudio de quimioterapia neoadyuvante implica, de forma indirecta, un tamaño tumoral superior o igual a 2 cm o la necesidad de disminuir el volumen tumoral para hacer posible una cirugía conservadora (Kaufmann et al., 2003; Thompson & Moulder-Thompson, 2012). Las pacientes se caracterizaron por un tamaño tumoral de entre 14,7 mm a 40,5 mm, con un tamaño promedio en torno a los 30 mm y, por lo tanto, dentro de los parámetros establecidos para la terapia neoadyuvante.

En lo referente a la elección de la población de estudio, se realizó según la expresión de receptores hormonales: RE y RP (positivos) y Her2 (negativo) después de comprobar que, en la mayor parte de los estudios de cáncer de mama llevados a cabo con HT (sobre células mayoritariamente), éste generaba efectos relevantes incidiendo principalmente sobre células y tumores mamarios hormono-sensibles. De esta forma, sobre células MCF-7 (RE+, RP+ y Her-2 negativo), el HT propicia la muerte celular, induce apoptosis e

inhibe la proliferación (Bouallagui et al., 2011; Han et al., 2009). Sobre estas mismas células, el HT interacciona con las vías de estimulación de crecimiento dependientes de estrógenos probablemente a través de la proteína GPER (G protein-coupled estrogen receptor) y de su unión al RE α , impidiendo la activación de MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), relacionadas con la proliferación celular (Sirianni et al., 2010). Chimento, A. y col. (Chimento et al., 2014) utilizaron un modelo de células RE negativas modificadas (SKBR3 BC) que sobreexpresaban la proteína GPER, para demostrar la implicación del HT a nivel de receptores estrogénicos por vías no clásicas de estimulación del crecimiento por estrógenos. Además de estas propiedades, el estudio llevado a cabo por Menéndez J. y col. 2008, demostró que el HT inhibía la enzima ácido graso sintasa (relacionada con la sobreexpresión de Her-2) en células SKBR3 (Her-2 sobreexpresado) y en MCF-7 modificadas con retrovirus que sobreexpresaban Her-2, (Javier A. Menendez et al., 2008). A pesar de todo, estudios más recientes han demostrado la capacidad del HT de actuar sobre células tumorales de cáncer de mama tanto dependientes como independientes de hormonas, ejerciendo una acción principalmente preventiva gracias a una disminución en la proliferación celular acompañada de un incremento de los niveles de peróxido de hidrógeno (Patrizia Rosignoli, Fuccelli, Sepporta, & Fabiani, 2016). El trabajo llevado a cabo por Granados-Principal y col. (Granados-Principal et al., 2011), demostró la capacidad del HT de disminuir el volumen tumoral y la proliferación celular (medido como porcentaje de Ki67) al mismo nivel que la Adriamicina, en ratas con tumores mamarios inducidos tras la administración de 7,12-dimetilbenzo[a]antraceno (DMBA). Este carcinógeno químico induce la formación de tumores sensibles a hormonas cuando es aplicado en ratas nulíparas (Bland & Copeland, 2007; Briziarelli, 1965; Terenius, 1971). Además, es ampliamente utilizado en el modelo carcinogénico de cáncer de mama y permite la extrapolación con la formación espontánea de carcinomas mamarios en humanos, debido a que los mismos factores que influyen en el riesgo de cáncer de mama humano afectan también a la susceptibilidad de la glándula mamaria de la rata a este carcinógeno (Russo, Tay, & Russo, 1982). En el caso del estudio llevado a cabo por nuestro grupo (Granados-Principal et al., 2011), un informe de expertos del servicio de anatomía patológica del hospital de Jaén indicó que las ratas empleadas en el estudio, efectivamente, presentaron tumores hormono-sensibles. El hecho de ser éste el único estudio llevado a cabo en animales de experimentación a los que se les administraba HT tras una inducción de tumores mamarios sensibles a hormonas por DMBA, unido al gran número de ensayos con HT sobre líneas celulares dependientes de hormonas, hizo seleccionar a la población estudio del estudio (RE y RP positivos, Her2 negativo).

4.3 Efecto de la terapia antitumoral sobre las pacientes con cáncer de mama

4.3.1 La terapia neoadyuvante modifica parámetros de oxidación de lípidos e hidratos de carbono

Entre los objetivos de este estudio se encuentra la evaluación del daño oxidativo a nivel lipídico asociado a la terapia neoadyuvante. Dentro de las variables determinadas para ello, se obtuvieron diferencias exclusivamente asociadas al tratamiento

quimioterápico en la concentración de isoprostanos y lípidos totales plasmáticos. Igualmente, se detectaron diferencias significativas entre el estado inicial y final de las pacientes (asociadas a la terapia antitumoral completa) en los valores de NEFA y AGE.

De acuerdo con la evolución plasmática de lípidos totales, se observó un incremento en la concentración de estas macromoléculas a lo largo del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida. Si bien este aumento se dio de forma ligeramente pronunciada, no superó de forma relevante los valores de referencia (entre 450 y 850 mg/dl) establecidos por Miller y Keane (Miller & Keane, 1996). Estos valores de referencia dependen de cada unidad clínica y otros autores sugieren un límite superior de hasta 1000mg/dl (Devlin, 2004). Según esto, los niveles de lípidos totales se encontraron dentro del rango considerado como clínicamente normal. Por ello, a pesar de que su concentración aumentó a lo largo del tratamiento con antraciclinas, no se consideró clínicamente relevante. Estos resultados son concordantes con los hallados por Alacacioglu A. y col. (Alacacioglu et al., 2013) para una terapia quimioterápica basada en la administración de antraciclinas en cáncer de mama, donde no se obtuvieron evidencias de la alteración del perfil lipídico asociado al tratamiento con antraciclinas.

La peroxidación lipídica es una de las consecuencias del desequilibrio entre compuestos oxidantes y defensa antioxidante. Se ha relacionado con la transformación neoplásica (Hristozov et al., 2001) y con la resistencia al efecto citotóxico de algunos antitumorales, debido a la formación de aductos que interfieren en el ciclo celular e impiden la correcta actuación de los quimioterápicos (Conklin, 2004). Uno de los marcadores más fiables de peroxidación lipídica es la concentración de 8-isoprostanos. Si bien es cierto que de forma global éstas moléculas son caracterizadas en orina, son muchos los estudios relacionados con el cáncer de mama que han medido los niveles de estos compuestos a nivel plasmático como muestra del estado de peroxidación lipídica global del organismo y como marcadores de la progresión tumoral (Basil A. Stoll, 2002). Además, algunos autores han propuesto que, a pesar de encontrar resultados diferentes entre la medición llevada a cabo en orina o plasma, la tendencia de resultados se mantiene (Madian, Diaz-Maldonado, Gao, & Regnier, 2011). El hecho de que la concentración de isoprostanos es mayor en pacientes con cáncer de mama respecto a individuos sanos es un hecho constatado por algunos autores (Mannello et al., 2007). Otros, sin embargo, han demostrado que los niveles de isoprostanos plasmáticos no se ven alterados en pacientes con cáncer de mama (Victorino et al., 2014) o incluso pueden encontrarse en una proporción menor que en individuos sanos, dependiendo del tipo de tumor y su estado (Kedzierska, Olas, Wachowicz, Jeziorski, & Piekarski, 2010; Panis, Victorino, et al., 2012). Observando la evolución de los isoprostanos plasmáticos de nuestro estudio, se puso de manifiesto un descenso significativo a lo largo de la quimioterapia, manteniéndose durante todo este tiempo en niveles inferiores a los basales de las pacientes tras ser diagnosticadas. En el estudio llevado a cabo por Il'yasova D. y col. (Il'yasova et al., 2011), se demostró que una terapia combinada de antraciclinas y ciclofosfamida era capaz de inducir la respuesta antioxidante a las 24h después de haberse producido la administración de los fármacos, como consecuencia de un intento de restablecimiento del

equilibrio redox, siendo insuficiente dicha respuesta antes de ese tiempo. De esta forma, comprobaron que los niveles de isoprostanos, medidos en orina, variaban en función del tiempo, pudiendo disminuir si se daba una respuesta antioxidante potente.

A pesar de que estos estudios centran su atención en ciclos más cortos que los que se llevaron a cabo en nuestro estudio, estas características nos ayudan a explicar la disminución que se encontró en los niveles de isoprostanos plasmáticos en las pacientes sometidas a la terapia neoadyuvante de nuestro ensayo, pues comprobamos un aumento en la capacidad antioxidante total proporcional al descenso sufrido por los isoprostanos durante la terapia con antraciclina y ciclofosfamida. Il'yasova D. y col. (Il'yasova et al., 2010), demostraron que este fenómeno se daba de forma similar cuando la terapia se basaba exclusivamente en la administración de antraciclina como terapia antitumoral. Todo ello permite dilucidar que la disminución en los niveles de isoprostanos plasmáticos puede asociarse al efecto de la quimioterapia neoadyuvante y, más concretamente, al efecto de la epirrubina (combinada con ciclofosfamida) sobre determinadas moléculas intervinientes en el sistema de respuesta antioxidante.

Los ácidos grasos no esterificados (NEFA) son aquellos que están libres en plasma, unidos generalmente a la albúmina. Su destino prioritario es la oxidación y reutilización de los mismos para la síntesis de triglicéridos. Existen numerosos estudios epidemiológicos que han asociado el cáncer de mama y un mayor riesgo de padecerlo, con la obesidad, el sobrepeso y la resistencia a la insulina, que a su vez se ha correlacionado con una mayor producción de ácidos grasos libres (Calle & Kaaks, 2004; B. A. Stoll, 2002). En nuestro estudio se pudo observar que, al inicio del ensayo, las pacientes presentaban unos niveles de NEFA superiores a cuando abandonaron el estudio, produciéndose un descenso significativo como consecuencia de la terapia neoadyuvante completa, hecho que se encuentra en consonancia con el estudio de Calle y Kaaks, 2004. Posteriormente, Zang, Y. y col. (Y. Zhang et al., 2014), en contraste con la teoría anterior, observaron que los niveles de ácidos grasos libres en sangre eran menores en pacientes con cáncer de mama que en individuos sanos. Además, relacionaron el nivel de NEFA con los diferentes estadios tumorales, sugiriendo que se producía un descenso de estas moléculas durante el crecimiento tumoral como consecuencia de una mayor necesidad de aporte energético, que el tumor es capaz conseguir a través de la captación de estas moléculas. Esta teoría entraría en contradicción con lo observado en nuestro estudio, pues una vez desaparecido el tumor a consecuencia de quimioterapia y cirugía, las pacientes registraron una menor concentración plasmática de ácidos grasos libres. A pesar de todo, el estudio anterior es de los pocos hallados en la literatura donde se determinan estas moléculas en pacientes con cáncer de mama, sin relacionarlas con el riesgo de padecerlo. A nivel celular, los ácidos grasos libres se han relacionado con una mayor capacidad de migración celular y de progresión tumoral (Byon et al., 2009), viéndose incrementados durante el cáncer de mama como consecuencia de una sobreexpresión de ácido graso sintasa y otras enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico que alteran la oxidación de ácidos grasos y la lipogénesis (Gong, Dou, & Liang, 2014). Otro estudio llevado a cabo por Kleinfeld, A. y col. (Kleinfeld & Okada, 2005), demostró que existía una elevada concentración de ácidos grasos libres en el tejido adyacente al tumor mamario. Además,

sugirieron que estos NEFA eran capaces de facilitar la evasión tumoral frente al sistema inmune, favoreciendo un crecimiento del tumor. Dada la escasa información sobre la evolución que sufren los ácidos grasos libres durante el cáncer de mama, se puede concluir que podría existir una relación directa entre la enfermedad y los niveles de ácidos grasos libres no esterificados, bien asociada a la producción por el propio tumor o como consecuencia de un desequilibrio previo que derive finalmente en el desarrollo tumoral, pues a la llegada de las pacientes al estudio, los niveles eran estadísticamente superiores a los alcanzados una vez libre de la patología. En este caso, el efecto del tratamiento, tanto quimioterápico con intervención quirúrgica, ejercen un efecto indirecto sobre esta variable, a través de la erradicación del tumor.

Los productos finales de glicación avanzada se caracterizan por ser aductos proteicos y lipídicos que han sufrido una glicosilación no enzimática y una correspondiente oxidación tras un contacto con azúcares (R. Singh et al., 2001). Estos AGE pueden generar un incremento en el estrés oxidativo e inflamación a través de su unión a receptores específicos (RAGE). A pesar de que los tumores tienen aumentadas las vías glicolíticas, pudiendo esto derivar en una mayor proporción de AGE a nivel tisular, se ha escrito muy poco en la literatura sobre su relación con el cáncer, concretamente, con el cáncer de mama (van Heijst et al., 2005). Por el contrario, sí se han asociado con enfermedades de carácter crónico relacionadas con procesos inflamatorios y de estrés oxidativo, como enfermedades neurodegenerativas, diabetes, aterosclerosis o fallos cardíacos (van Heijst et al., 2005), lo que hizo establecer una posible relación aún no descrita entre estos compuestos y el cáncer de mama. Existen numerosos estudios en células que ponen de manifiesto una asociación entre AGE y el proceso carcinogénico (Abe & Yamagishi, 2008; Yamamoto, Yamagishi, Hsu, & Yamamoto, 1996). Van Heijst, JWJ. y col. (van Heijst et al., 2005) pusieron de manifiesto que la expresión de determinados aductos generados (AGE) difería en función del tejido, comprobando por primera vez que se daba un aumento a nivel del tejido tumoral mamario. Como hecho limitante, se debe resaltar que la medida llevada a cabo en nuestro estudio se realizó en plasma, y no sobre el propio tumor ni tejido adyacente. Aunque se ha encontrado que en determinados tipos de tumores existe una mayor expresión de RAGE, no se ha establecido una asociación entre esa expresión y un mayor nivel de AGE en dichos tejidos. Algunos autores incluso pusieron de manifiesto, a través de un estudio retrospectivo, que un incremento en los niveles de esos aductos se relacionaron con un menor riesgo de padecer cáncer de páncreas (Grote et al., 2012), aunque otros habían demostrado previamente que un incremento en los receptores solubles para AGE (sRAGE) bloqueaban su acción directa sobre RAGE, relacionándose con un descenso en el riesgo de padecer cáncer de páncreas (teniendo por tanto una relación inversa aductos-riesgo) (Jiao et al., 2011). Dado que el receptor de estas moléculas se descubre en 1992, hace pensar que aún no se tienen datos suficientemente concluyentes de lo que sucede con estas moléculas y sus receptores. En nuestro estudio, pudimos observar que las pacientes con cáncer de mama presentaban un mayor nivel de AGE a nivel plasmático que cuando se había producido la eliminación del tumor (al final de estudio). Aunque sigue existiendo controversia al respecto, gracias a este trabajo se ponen las primeras evidencias para establecer si estas moléculas tienen

una implicación biológica en el desarrollo y promoción del cáncer de mama, sosteniendo, en base a nuestros resultados, que una eliminación del tumor disminuye los niveles circulantes de AGE.

4.3.2 La terapia neoadyuvante modifica parámetros de oxidación proteica

Dentro de las variables determinadas para cuantificar el daño oxidativo a proteínas, se encontraron diferencias significativas en los niveles de los productos finales de oxidación proteica (AOPP). Estos AOPP son toxinas urémicas creadas durante a consecuencia de un desequilibrio oxidativo. Son producidos por la reacción de las proteínas del plasma con oxidantes clorados y se han considerado como buenos marcadores de estrés oxidativo en patologías que cursan o son causadas como consecuencia del mismo (Capeillere-Blandin et al., 2004; Kaneda et al., 2002). Este hecho hizo pensar en una posible relación aún no definida en profundidad entre cáncer de mama y AOPP, que sí se había establecido para otro tipo de tumores (Imbesi et al., 2013). En nuestro estudio, se observó un incremento en los valores de AOPP a lo largo del tratamiento antitumoral. De esta forma, se encontró que las pacientes presentaron un mayor grado de oxidación proteica al finalizar el estudio. No se encontraron diferencias durante el tratamiento quimioterápico, lo que sugirió que era la terapia neoadyuvante completa la que modificaba sus valores. La determinación de estas moléculas es algo relativamente novedoso, por lo que los estudios llevados a cabo en pacientes con cáncer de mama son aún escasos. De esta forma, (Kilic et al., 2014) relacionaron el cáncer de mama con un incremento en los niveles de AOPP, reflejando que existía una relación entre ambas patologías. Previamente a este estudio, Tesarova, P. y col. (Tesarova et al., 2007) habían asociado una mayor concentración de AOPP plasmática con estadios avanzados del tumor, de tal forma que en los tumores menos avanzados no existían diferencias respecto a individuos sanos. Además, estos autores establecieron una correlación positiva entre los valores de AOPP y AGE en pacientes con cáncer de mama. Posteriormente, otro estudio determinó que los valores de AOPP se veían incrementados en pacientes con cáncer de mama Her2 positivo en comparación con voluntarios sanos. Así mismo, la terapia con Trastuzumab incrementó sus valores (Lemos et al., 2015). Hasta la fecha, no tenemos constancia de la existencia de un estudio en cáncer de mama que evalúe los niveles de AOPP a lo largo del tratamiento antitumoral neoadyuvante. Algunos estudio en animales han demostrado un aumento de AOPP tras la administración de ciclofosfamida para tratar linfomas (Bottari et al., 2015); otros han comprobado un descenso tras una intervención quirúrgica en pacientes con cáncer de tiroides (Kosova et al., 2007). Teniendo en cuenta todo lo anterior, se puede concluir que los niveles de AOPP se incrementan gradualmente como consecuencia de la terapia antitumoral neoadyuvante en su conjunto, y no como consecuencia de la quimioterapia recibida previa intervención quirúrgica. A pesar de que algunos autores hayan sugerido una relación directa entre AOPP y AGE, a través de nuestro estudio se pudo comprobar una relación inversa de ambos parámetros durante la terapia antitumoral completa.

4.3.3 El daño en el ADN de pacientes con cáncer de mama aumenta como consecuencia de la terapia neoadyuvante

A pesar de que no se hallaron diferencias en el daño oxidativo en el ADN de linfocitos aislados, sí se detectó un incremento en los valores plasmáticos de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina. Esta variable se ha postulado con el tiempo como un marcador de daño oxidativo producido a ácidos nucleicos (Farhangkhoe et al., 2003; Morita et al., 2005; Rivera et al., 2006), generada tras la activación de los mecanismos de reparación de la oxidación de bases del ADN (Kinoshita et al., 2002). A pesar de que su estudio se llevó a cabo principalmente sobre muestras de orina, hoy en día se ha establecido una relación perfectamente documentada entre sus niveles plasmáticos y su valor como marcador de estrés oxidativo (Rivera et al., 2006). El primer estudio que tiene en consideración la relación entre alteraciones en el ADN y el cáncer de mama fue el llevado a cabo por Mailins, DC. y Haimanot, R. en 1991 (Malins & Haimanot, 1991). Estos autores comprobaron que las alteraciones en el ADN cursaban con un aumento en los niveles de 8OH medidos en el propio tumor. A raíz de este estudio, son muchos los autores que han asociado una relación positiva entre padecer cáncer de mama y un incremento en la concentración bases hidroxiladas como 8OH, asociándolo a la respuesta hormonal del tumor y a un desequilibrio redox que cursa finalmente con la actuación del radical hidroxilo sobre el material genético, induciendo así la oxidación del mismo (Malins et al., 1993; Matsui et al., 2000; Musarrat et al., 1996; Pande et al., 2012). Otros estudios han revelado que este incremento en los niveles de 8OH está relacionado de forma inversa con estadios avanzados del cáncer de mama (Kuo, Chou, Hu, Wu, & Chen, 2007), aunque estudios posteriores han demostrado ser justamente al contrario (Pande et al., 2012). Algunos autores, sin embargo, han observado que los niveles de 8OH no presentan diferencias entre un tejido mamario normal y uno tumoral (Nagashima et al., 1995). A pesar del elevado número de estudios llevados a cabo para establecer la asociación de las bases hidroxiladas y el cáncer de mama, son muy pocos los que han evaluado cómo se comporta esta variable a lo largo de la terapia antitumoral para esta patología. El estudio realizado por Cho, S. y col. (Cho, Choi, Lee, & Chung, 2009), demostró que los niveles de 8OH urinarios descendían en pacientes de cáncer de mama tras una intervención quirúrgica. Estos autores justificaron el descenso como consecuencia de la eliminación del tumor, cuya presencia implicaba de forma inherente (tal cual han demostrado a la mayoría de los estudios anteriormente citados) un aumento en los valores de 8OH. Dado que en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas a lo largo de la quimioterapia, se puede concebir el hecho de que la erradicación final de tumor implicaría un descenso en los niveles de esta variable. Sin embargo, se produce un incremento de 8OH plasmática, lo que hace intuir la existencia de mecanismos adicionales desconocidos, posiblemente asociados a una acumulación de efectos (consecuencia de la quimioterapia y la cirugía) que impiden una restauración del daño oxidativo en el ADN. A pesar de que los valores de 8OH incrementen, debe tenerse en cuenta el desconocimiento de lo que sucede a largo plazo con esta variable, hecho que aún nos es imposible detectar.

4.3.4 La terapia neoadyuvante modula la defensa antioxidante plasmática

Uno de los aspectos más relevantes en el desarrollo del cáncer de mama es el estado del sistema antioxidante. Como se ha descrito en la introducción, el estrés oxidativo generado por el desequilibrio entre la capacidad antioxidante y los compuestos oxidantes como EROs o ERNs se ha relacionado con todas las etapas del proceso carcinogénico.

En nuestro estudio, la evaluación del sistema de defensa antioxidante durante el tratamiento quimioterápico concluyó con resultados significativos en las variables “capacidad antioxidante total” (TAC) del plasma y en la concentración de vitamina E. Así mismo, tras la valoración de la terapia antitumoral completa (desde el inicio hasta un mes tras la intervención quirúrgica), se observaron diferencias significativas en cuanto a la actividad de SOD y CAT.

Se debe destacar, como punto de partida, que los resultados obtenidos para cada una de las variables son opuestos, aumentando la TAC en aquellos puntos donde la vitamina E se invertía, y viceversa durante la quimioterapia.

De acuerdo con Vera-Ramirez, L. y col. (L. Vera-Ramirez et al., 2011), la capacidad antioxidante total del plasma se relaciona con la supervivencia de las pacientes tras la terapia antitumoral. Algunos autores han comprobado cómo el propio cáncer de mama promueve valores de TAC más bajos que en individuos sanos (Abdel-Salam, Youness, & Hafez, 2011), estando, por tanto, estos pacientes desprotegidos frente al efecto de los quimioterápicos. Además de la patología *per se*, se ha comprobado que la quimioterapia (antraciclinas y ciclofosfamida) es capaz de producir un marcado descenso en los niveles de respuesta antioxidante del plasma (Abdel-Salam et al., 2011; A. C. S. A. Herrera et al., 2012; Sener, Gonenc, Akinci, & Torun, 2007; S Subramaniam, Shyama, Jagadeesan, & Shyamala Devi, 1993). Menores niveles de TAC promueven una menor protección frente al estrés oxidativo, pudiendo, por tanto, considerarse a los valores disminuidos de TAC como causa y consecuencia del propio cáncer. El estudio llevado a cabo por Herrera, C. y col. (Panis, Herrera, et al., 2012), llegó incluso a relacionar el subtipo tumoral “luminal” con una menor capacidad antioxidante del plasma, comparado con tumores Her-2 positivos, triple negativos y controles sanos cuando se administraba quimioterapia con antraciclinas y/o taxanos. Estos autores establecieron incluso una relación directa de TAC con la edad de diagnóstico de las pacientes sometidas a quimioterapia (A. C. S. A. Herrera et al., 2012). Panis, C. y col. (Panis, Herrera, et al., 2012) llevaron a cabo un estudio donde se comprobó que la capacidad antioxidante total del plasma era menor en aquellas pacientes que estaban sometidas a una terapia con antraciclinas, sin quedar comprometida esta variable tras el empleo de taxanos en la terapia antitumoral. A pesar de que la epirrubicina es una de las antraciclinas menos tóxicas del grupo, algunos trabajos llevados a cabo en pacientes con linfoma no Hodgkin muestran que la combinación de epirrubicina y ciclofosfamida promueve una disminución en los niveles de TAC respecto a un grupo control tratados, además de con epirrubicina y ciclofosfamida, con un antioxidante capaz de restaurar la capacidad antioxidante total del plasma de forma significativa (Galletta et al., 2010). Otros autores han estudiado la variación de la capacidad antioxidante del plasma debida a la administración de una terapia combinada para el tratamiento en cáncer de pulmón basada en antraciclinas clásicas, como

adriamicina, conjuntamente con ciclofosfamida, observando el efecto tóxico y supresor de la capacidad antioxidante plasmática de ambas moléculas simultáneamente administradas con vincristina (Erhola, Kellokumpu-Lehtinen, Metsa-Ketela, Alanko, & Nieminen, 1996). En nuestro estudio se pudo observar un punto máximo de TAC que se alcanzaba al finalizar el tratamiento con la combinación farmacológica de epirrubicina y ciclofosfamida. Del mismo modo, se comprobó un descenso de sus valores *a posteriori*, correspondiente a la terapia con taxanos, alcanzando de nuevo los valores encontrados en el estado basal. Los distintos estudios anteriormente citados trasladan la evidencia de que, cuando empleamos antraciclina (clásica o de última generación) o ciclofosfamida de forma aislada, y combinadas o no con taxanos, para el tratamiento del cáncer de mama, se produce un descenso notable en los niveles de la capacidad antioxidante total del plasma, contrariamente a lo que sucede en nuestro estudio. Se debe destacar que los trabajos realizados con pacientes de cáncer de mama se llevaron a cabo sin la combinación de los tres tipos de antitumorales empleados en nuestro estudio. De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro ensayo, se puede comprobar cómo la combinación de ciclofosfamida con epirrubicina promueve un incremento muy marcado en la capacidad antioxidante total del plasma, lo que dota a las pacientes de cierta protección frente al efecto prooxidante generado por los propios quimioterápicos y por el cáncer de mama. En relación a esto, algunos autores han sugerido que, además de niveles elevados de TAC, la peroxidación lipídica juega un papel como marcador pronóstico de supervivencia del cáncer de mama (A. C. S. Herrera et al., 2014). Teniendo en cuenta el incremento sufrido por la TAC a lo largo del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida y la disminución en los niveles de isoprostanos plasmáticos asociados al incremento de la respuesta antioxidante, se puede postular que esta combinación favorece la supervivencia de las pacientes gracias al incremento de dicha TAC y a la consecuente disminución de isoprostanos en plasma, ambos factores reconocidos como marcadores de supervivencia en cáncer de mama. Si a esta combinación, al parecer beneficiosa para el caso del cáncer de mama, se le adicionase un antioxidante de efecto testado, podrían incrementarse los niveles de TAC a lo largo de todo el tratamiento quimioterápico, ejerciendo un efecto extendido durante toda la terapia y ayudando a las pacientes a enfrentarse mejor a los efectos adversos de los fármacos y de la posterior cirugía y convalecencia.

En referencia a los valores de vitamina E y su relación con el cáncer de mama, multitud de estudios han evaluado la implicación dietética de vitamina E con el desarrollo tumoral, así como su posible acción quimio-moduladora cuando se suplementa conjuntamente con distintos fármacos antitumorales. A pesar del elevado número de investigaciones llevadas a cabo para evaluar el riesgo de cáncer de mama asociado a deficiencias nutricionales en vitamina E, existen pocas que hayan determinado los niveles de vitamina E durante el cáncer de mama en humanos y la modificación de sus valores de concentración a lo largo de la terapia antitumoral. Otros estudios se han centrado, sin embargo, en analizar cómo un aumento de vitamina E plasmática (incorporada en forma de suplemento nutricional) incrementa el efecto de diversos antitumorales (principalmente taxanos) sin restarles efecto, potenciando por tanto la actividad de estas

moléculas y permitiendo una menor toxicidad, a consecuencia de una reducción en la dosis efectiva (J. A. Menendez et al., 2001; Shao, Pardini, & Pardini, 1995).

El estudio realizado por Nuñez Martin, C. y col en 1995 (Nunez Martin, Ortiz de Apodaca, Abbad Echevarria, & Fernandez Rodriquez, 1995), trató de demostrar si existían diferencias en cuanto a los niveles de vitaminas liposolubles antioxidantes y otros parámetros relacionados con el perfil lipídico entre individuos sanos y pacientes diagnosticadas con cáncer de mama. Pretendían, además, asociarlo a factores dietéticos concretos que relacionasen dieta y cáncer de mama. Finalmente, sólo hallaron diferencias en los niveles de retinol, sin verse afectados los valores de vitamina E entre pacientes e individuos sanos. En el año 1992, el estudio llevado a cabo por Potischman, N. y col. (Potischman et al., 1992), trató de establecer una relación entre los niveles de vitamina E (entre otros parámetros) y los distintos tratamientos del cáncer de mama. Para ello, evaluaron tanto a mujeres con afecciones benignas de la mama como a pacientes diagnosticadas con cáncer de mama que fueron sometidas a quimioterapia y/o cirugía. Estos autores no hallaron diferencias significativas en las mujeres con lesiones benignas mamarias, pero sí encontraron niveles elevados de α -tocoferol y γ -tocoferol en pacientes con cáncer de mama sometidas a quimioterapia, así como un incremento en la concentración de α -tocoferol en pacientes que recibieron terapia antiestrogénica. De la misma forma, los niveles de γ -tocoferol se vieron incrementados en aquellas pacientes que tras la cirugía no fueron sometidas a quimioterapia. Igualmente, en el estudio llevado a cabo por Danelisen, I. y col. (Danelisen, Palace, Lou, & Singal, 2002) en animales de experimentación que recibían antraciclinas clásicas como terapia antitumoral (Adriamicina), se comprobó que los niveles de α -tocoferol se vieron incrementados por la Adriamicina a nivel hepático y en plasma.

A pesar de que en nuestro caso se centra en un estudio de quimioterapia neoadyuvante y que por las circunstancias iniciales (descritas en material y métodos) referentes al diseño del estudio, no poseemos un grupo control sano, se pudieron observar fluctuaciones en los niveles de vitamina E asociados al tratamiento quimioterápico neoadyuvante. En nuestro estudio, primeramente se observó un descenso en los niveles esta vitamina a lo largo del tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida, para producirse posteriormente un incremento asociado al empleo de taxanos. Se debe destacar que este descenso de vitamina E, y por tanto, de sus efectos antioxidantes, pudieron ser una de las causas del incremento producido en los niveles de capacidad antioxidante total. A pesar de ser un aparente punto contradictorio, un descenso masivo en los niveles circulantes de antioxidantes plasmáticos puede llevar a la inducción de una respuesta antioxidante derivada de la síntesis e incremento en la expresión de determinadas moléculas no determinadas en este estudio (aunque sí englobadas de forma general en la TAC), que contrarresten el efecto del estrés oxidativo generado por la terapia farmacológica. Para evitar esta disminución asociada al tratamiento quimioterápico con antraciclinas y ciclofosfamida, podría ser efectiva una suplementación durante todo el periodo que dure dicha terapia (establecida por el especialista), ayudando a restaurar el sistema dañado antioxidante a consecuencia de los quimioterápicos (Suhail et al., 2012) e incluso evitando el riesgo de cardiotoxicidad asociada a este tipo de fármacos (Finsterer & Ohnsorge, 2013; Sergio Granados-Principal et al., 2014). Esto favorecería, además, la

posterior actuación de los taxanos y un descenso en la sintomatología asociada a los mismos (Samuels, Schiff, & Ben-Arye, 2014).

La actividad Superóxido dismutasa se ha relacionado con la capacidad de respuesta frente a la ERO superóxido. Esta enzima, cataliza la dismutación hasta compuestos menos oxidantes como oxígeno y peróxido de hidrógeno, que posteriormente metabolizará la catalasa hasta oxígeno y agua. En nuestro estudio, no se detectaron diferencias significativas durante el tratamiento quimioterápico, a pesar de que las antraciclinas cursan con un aumento en la producción de superóxido en presencia de oxígeno (Woolston et al., 2012), aunque sí se observaron a lo largo de toda la terapia antitumoral. Se pudo comprobar un descenso significativo asociado a la terapia en su conjunto. Este descenso puede deberse en parte a que la paciente ya no se encuentra sometida al efecto de estrés oxidativo de la quimioterapia y por tanto pueden reestablecerse unos valores más bajos de actividad SOD, lo que puede derivar finalmente en una bajada gradual de la actividad de enzimas antioxidantes como SOD. En este sentido, cabe destacar que la propia patología cursa con unos niveles más elevados de actividad SOD que individuos sanos (Kilic et al., 2014; Portakal et al., 2000; Rajneesh, Manimaran, Sasikala, & Adaikappan, 2008), de tal forma que a medida que se produce la eliminación del tumor, estos niveles vuelven a su estado normal. Esto continua siendo un tema controvertido, pues en función de este desequilibrio, los sistemas antioxidantes pueden elevarse o disminuir considerablemente (Woolston et al., 2012); incluso mutaciones puntuales en el gen SOD-2 podrían afectar a la respuesta al tratamiento, tiempo de recurrencia y supervivencia de las pacientes (Yao et al., 2010).

Algunos autores sugieren que la quimioterapia y la cirugía (en terapias adyuvantes) promueven un descenso en los niveles de respuesta antioxidante, que puede ser beneficioso por no restar efecto antitumoral a los fármacos empleados (que utilizan el estrés oxidativo como mecanismo de acción) (Alacacioglu et al., 2013; Woolston et al., 2012). En el estudio llevado a cabo por Kedzierska, M. y col. (Kedzierska et al., 2013), se pudo comprobar el efecto de la cirugía y de la quimioterapia sobre la actividad de distintas enzimas antioxidantes como SOD. Los autores comprobaron que la actividad SOD no presentaba diferencias entre los pacientes antes y después de la cirugía. Además, pudieron observar que la actividad SOD decrecía durante los primeros ciclos de quimioterapia, pero finalmente se producía un incremento en la misma, probablemente como mecanismo de compensación frente al estrés oxidativo generado por la misma. A diferencia de nuestro estudio, éste se caracterizó por tratarse de una terapia adyuvante. Además, las diferencias que encontraron se dieron a nivel de quimioterapia, mientras que en nuestro trabajo no se encontraron a este nivel. Otros autores, sin embargo, han observado un descenso en los valores de actividad SOD a consecuencia de una terapia antitumoral neoadyuvante de ciclofosfamida, doxorubicina y 5-fluorouracilo, seguida de una mastectomía (G. Singh, Maulik, Jaiswal, Kumar, & Parshad, 2010), de forma similar a lo sucedido en nuestro ensayo, donde se obtuvo un descenso producido como consecuencia de ambas terapias (farmacológica y quirúrgica), sin diferencias significativas durante la quimioterapia. De la misma forma, Ramirez-Exposito, MJ. y col. (Ramirez-Exposito et al., 2014) observaron un descenso en la actividad SOD como

consecuencia de la terapia neoadyuvante. Basándonos en los estudios llevados a cabo en pacientes con cáncer de mama y en base a nuestros resultados, se puede establecer la aproximación de que el efecto de la terapia antitumoral produce un descenso en los niveles de actividad SOD. Este descenso no debe interpretarse como algo negativo, pues las pacientes podrían estar sufriendo una regulación de la actividad antioxidante como consecuencia de la eliminación del tumor, volviendo a unos niveles más bajos, observados de forma muy extendida en aquellos grupos de controles sanos de los estudios anteriormente citados.

De forma similar a lo que sucede con la SOD, los niveles de catalasa sufrieron un descenso significativo a lo largo de la terapia antitumoral, sin encontrar diferencias a lo largo del tratamiento quimioterápico. Panis, C. y col. (Panis, Victorino, et al., 2012) encontraron, en un estudio llevado a cabo en pacientes con cáncer de mama, que la actividad catalasa disminuía en las pacientes respecto a los controles sanos, aunque dicha actividad no se veía modificada según avanzaba la patología. Este trabajo nos aporta una idea inicial de que es el propio cáncer de mama el que ejerce un efecto supresor en la actividad de esta enzima, aunque puede ser que una disminución prolongada a lo largo del tiempo sea capaz de desembocar finalmente en un tumor. Otros autores han establecido que en pacientes con cáncer de mama existe una mayor actividad de enzimas como catalasa o superóxido dismutasa respecto a controles sanos, sugiriendo que este aumento puede deberse a un intento de compensación de niveles de estrés oxidativo elevados asociados al cáncer de mama (Rajneesh et al., 2008). En otro ensayo llevado a cabo por Panis, C., Herrera, AC. y col. 2012, se trató de comprender qué sucedía con la actividad de esta enzima cuando se sometían a las pacientes a la quimioterapia, observando que no se dieron diferencias significativas, de forma similar a lo que sucedió en nuestro estudio, aunque sí encontraron una actividad significativamente mayor en las pacientes sometidas a la quimioterapia respecto a los estadios iniciales del cáncer (Panis, Herrera, et al., 2012). A pesar de estos resultados, como característica limitante se debe señalar que la actividad enzimática fue medida e nivel de eritrocitos y no en plasma, como se realizó en nuestro estudio. En el estudio de Suhail, N. y col. (Suhail et al., 2012), se trató de determinar el sistema antioxidante plasmático de pacientes con cáncer de mama antes y después de la quimioterapia, sometiendo además a un pequeño grupo de población a una suplementación de vitamina E y C. Los autores observaron que la patología en sí misma cursaba con una disminución de los valores de actividad catalasa respecto a controles sanos, y que las pacientes sometidas a la quimioterapia no mostraron diferencias respecto a sus controles, aunque dicha actividad, en las pacientes, fue mayor tras el tratamiento que antes de su administración. De nuevo, ese estudio estaba de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro ensayo al no mostrar diferencias a lo largo del tratamiento quimioterápico. De la misma forma, comprobaron que la suplementación con vitamina C y E aumentaba la actividad catalasa del plasma sin restar efecto antineoplásico, lo cual supone un punto de apoyo para establecer este suministro como una terapia combinada alternativa, que disminuya los efectos secundarios de los quimioterápicos. A pesar de estos datos, otros estudios han demostrado que la quimioterapia es capaz de producir una disminución en la actividad de enzimas

antioxidantes como catalasa o superóxido dismutasa en pacientes con cáncer de mama (Kasapovic, Pejic, Todorovic, Stojiljkovic, & Pajovic, 2008; S. Subramaniam, Subramaniam, & Shyamala Devi, 1994) y en otros tipos de tumores, existiendo por tanto gran controversia al respecto, debido principalmente a la variabilidad de tratamientos empleados, la edad o el estadio tumoral (Bhuvaramurthy, Balasubramanian, & Govindasamy, 1996; Kasapovic et al., 2010; Kasapovic et al., 2008).

Poco se ha escrito acerca de cómo la actividad catalasa a lo largo de un tratamiento neoadyuvante en humanos. A pesar de esta escasez, existe un estudio llevado a cabo por Singh, G. y col. (G. Singh et al., 2010), que corrobora lo observado durante nuestro ensayo. Estos autores observaron que en pacientes con cáncer de mama, tras distintos ciclos de quimioterapia y la realización de una mastectomía, se produjo un descenso en la actividad de enzimas antioxidantes como catalasa o superóxido dismutasa que se caracterizó por su duración a lo largo del tiempo. En este mismo estudio, se comprobó que no existieron diferencias significativas en cuanto a la actividad de estas enzimas a lo largo del tratamiento con ciclofosfamida, doxorubicina y 5-fluorouracilo. Otro estudio llevado a cabo para analizar el efecto de la terapia neoadyuvante en pacientes con cáncer de mama tratadas con epirrubicina y ciclofosfamida, seguida de taxanos, comprobó que dicha terapia producía un descenso global en cuanto a actividad catalasa en pacientes postmenopáusicas (Ramirez-Exposito et al., 2014), relacionando el balance oxidativo con el estado hormonal de las pacientes. Se puede deducir, por tanto, que se genera un cambio en los sistemas antioxidantes enzimáticos en las pacientes de cáncer de mama después de la quimioterapia y la cirugía. A pesar de que los quimioterápicos provocan un incremento en el desequilibrio oxidativo, no se encontraron diferencias significativas en la actividad catalasa. Esto se puede observar como un efecto secundario que curse de forma subclínica con un aumento de EROs como peróxido de hidrógeno o superóxido, que dificulten una actuación adecuada de los sistemas enzimáticos antioxidantes tras un procedimiento traumático como la cirugía.

4.3.5 La quimioterapia neoadyuvante sobreexpresa los niveles plasmáticos de Sfrp4

La Sfrp4 es una proteína de la familia de Secreted frizzled-related protein. Se caracteriza por ser un modulador soluble de la ruta Wnt, esencial en la proliferación, migración, apoptosis, morfología y migración celular. Su determinación se llevó a cabo como consecuencia de la observación previa, por parte del grupo de investigación, de un incremento sustancial en la expresión de Sfrp4 en ratas que habían sido tratadas con HT (Granados-Principal et al., 2011). El hecho de que este estudio fuese el primero en realizarse *in vivo*, que además se llevase a cabo por nuestro grupo de investigación y que fuese por tanto una base fundamental del estudio actual (en pacientes con cáncer de mama), hizo postular la posibilidad de que esta proteína pudiese verse modificada a lo largo del tratamiento con quimioterápicos y/o por el HT.

En este estudio, debido a que la respuesta tumoral de las pacientes fue notablemente exitosa, no se pudo coleccionar suficiente masa tumoral para cubrir un tamaño muestral adecuado y realizar un análisis de la expresión génica y proteica sobre el propio tumor.

Por ese motivo, se procedió a comprobar si esa expresión génica podía relacionarse con los niveles plasmáticos de la proteína propiamente dicha tras la administración oral de HT. Como resultado, se observó que a pesar de encontrar cierta tendencia estadística asociada al HT a lo largo del tiempo, no se obtuvieron resultados significativos que permitiesen asociar este efecto a dicho compuesto, sin embargo, se comprobó que sólo el tratamiento quimioterápico con epirrubicina y ciclofosfamida inducía la expresión de esta proteína.

Los taxanos disminuyeron la concentración de esta proteína sin lograr que alcanzara los niveles basales, manteniéndola en una concentración plasmática elevada. De esta forma, se interpretó como un factor positivo el hecho de que los quimioterápicos fuesen capaces de elevar una proteína capaz de actuar inhibiendo los receptores Frizzled y la ruta Wnt, relacionados con la carcinogénesis en varios tipos de tumores. Esta inhibición la consigue, bien por antagonismo competitivo directo con el ligando natural Wnt, o bien por bloqueo de dichos receptores, promoviendo la inhibición tanto de su ruta canónica como no canónica (Kawano & Kypta, 2003), actuando principalmente a través de la inhibición de la estabilización de β -catenina y APC (Adenomatous polyposis coli) (Karim et al., 2004). Algunos autores han contribuido a calificar al gen que la codifica como gen supresor de tumores (He et al., 2005; Jacob et al., 2012). Para ello, se han realizado estudios de silenciamiento y metilación del gen, debido a la asociación encontrada con mutaciones puntuales del gen y la aparición de tumores. La reexpresión de este gen inducía de nuevo el efecto antitumoral (He et al., 2005). Cambios epigenéticos en los genes que codifican para las distintas proteínas Sfrp se han relacionado con la propia patogénesis de distintos tipos de tumores como leucemias, llegando incluso a postularse como terapias alternativas a las convencionales, terapias moleculares dirigidas a contrarrestar dichas mutaciones (Seeliger, Wilop, Osieka, Galm, & Jost, 2009).

En un estudio llevado a cabo sobre la expresión Sfrp1 (que no presenta efecto antiproliferativo, aunque sí con la apoptosis), se comprobó cómo un ambiente con elevada concentración de estrógenos inducía la expresión de esta proteína, promoviendo un efecto antiapoptótico que facilitaba el desarrollo de neoplasias uterinas (Fukuhara et al., 2002). Debido al escaso número de estudios llevados a cabo con Sfrp4 en humanos, podríamos preguntarnos si este efecto puede darse en otros miembros de la familia de proteínas Sfrp, pudiendo ser regulada su expresión en función de los niveles de estrógenos presentes. Hrzenjak, A. y col. observaron en 2004 una regulación hormonal de Sfrp4 a nivel uterino, aunque concluyeron que debían realizarse futuras comprobaciones por el escaso tamaño muestral del estudio (ensayo sobre enfermedades raras) (Hrzenjak et al., 2004). Horvath, LG. y col. (Lisa G. Horvath et al., 2007), sin embargo, obtuvieron que la cantidad de Sfrp4 a nivel de membrana, en cáncer de próstata, eran marcadores predictivos del cáncer, con independencia de si eran andrógenos dependientes o no. Este aspecto desencadenó un planteamiento importante acerca del estudio de aquellos tumores con una elevada respuesta a hormonas, como por ejemplo, en cáncer de mama.

Berndt, T. y col (Berndt et al., 2003) comprobaron en pacientes con osteomalacia inducida por tumores, que los niveles de esta proteína descendían a consecuencia de la propia patología. En este caso, los valores plasmáticos establecidos para individuos sanos oscilaron en torno a los 35 ng/ml, mientras que en los pacientes se veían reducidos hasta

11 ng/ml. A pesar de que estos resultados no se encontraban normalizados por concentración de proteína y se desconocía el tipo de tumor que presentaban los pacientes, se pudieron comparar con los valores relativos a las pacientes de cáncer de mama de nuestro estudio. Durante la evolución de los niveles de Sfrp4 a lo largo de la terapia antitumoral, se observó un ascenso desde niveles en torno a los 28 ng/ml (sin normalizar por proteína), en el estado basal, hasta concentraciones que superaron los 42 ng/ml (sin normalizar por proteínas) tras el tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida, llegando, por tanto, a superar los valores obtenidos para individuos sanos por Berndt, T. y col. en su estudio. Finalmente, tras el tratamiento con taxanos, se obtuvieron valores alrededor de 35 ng/ml (sin normalizar por proteína), siendo similares a los obtenidos para individuos sanos, asociados a la terapia antitumoral con epirrubicina + ciclofosfamida y taxanos.

Otros estudios han demostrado que tanto la expresión de proteína Sfrp4, como su concentración fue menor en pacientes con cáncer de próstata (L. G. Horvath et al., 2004) y útero (Hrzenjak et al., 2004); respecto a individuos sanos, mostrando un efecto de la propia patología sobre la proteína, además de demostrar que un incremento en los niveles de Sfrp4 repercutían directamente sobre la proliferación celular y desencadenaba un efecto proapoptótico. Incluso, se ha relacionado una menor expresión de esta proteína con tumores de mayor agresividad (Ford et al., 2013; Jacob et al., 2012) conjuntamente con un mayor nivel de Ki67 (Hrzenjak et al., 2004). Algunos estudios llevados a cabo en células tumorales han demostrado una prevalencia diferente de subtipos de receptores para Wnt. De esta forma, terapias dirigidas frente a estos subtipos, podrían desencadenar una respuesta antitumoral a través de la regulación de estos receptores (Carmon & Loose, 2008). Otros autores han postulado que los niveles de Sfrp4 son excelentes marcadores de resistencia a la quimioterapia en tumores ováricos. Un aumento en los niveles de esta proteína produce una mejora en la respuesta quimioterápica y una mayor sensibilidad frente distintos fármacos como cis platino o Adriamicina, siendo por tanto un futuro marcador frente al cáncer de ovario (Saran, Arfuso, Zeps, & Dharmarajan, 2012), glioma (Bhuvanlakshmi, Arfuso, Millward, Dharmarajan, & Warriar, 2015; Sudha Warriar, Balu, Kumar, Millward, & Dharmarajan, 2013) o carcinomas de cuello y cabeza (S. Warriar et al., 2014).

Hasta la fecha, no se han realizado estudios en humanos que contemple cómo se modifican los valores de la proteína Sfrp4 en pacientes con cáncer de mama sometidas a una terapia neoadyuvante. Teniendo en cuenta los resultados hallados y las consideraciones previas discutidas, podemos deducir que los ciclos de quimioterapia, así como la combinación de los distintos fármacos establecidos para las pacientes de nuestro estudio, mejoraron de forma significativa la respuesta antitumoral, a través de la disminución de la proliferación celular y un aumento de la apoptosis de células tumorales. Dado que la propia Sfrp4 ha demostrado su capacidad de ejercer un efecto antitumoral por sus destacables propiedades frente a proliferación celular e inducción de apoptosis en células tumorales, una forma farmacéutica apropiada o un incremento en su síntesis podría incrementar la sensibilidad frente a los fármacos empleados, disminuyendo posiblemente las dosis de los mismos y, con ella, los efectos adversos de la quimioterapia. Este estudio asienta, por tanto, las bases de una posible sobreexpresión de la misma asociada a la combinación de los quimioterápicos empleados. De acuerdo con esta teoría,

deberían llevarse a cabo futuros estudios para determinar bajo qué condiciones específicas del tratamiento quimioterápico se produce el incremento en dicha proteína, así como si esta sobreexpresión hallada está relacionada con una mayor tasa de supervivencia de las pacientes con cáncer de mama.

4.3.6 El tratamiento antitumoral modifica los parámetros bioquímicos de las pacientes con una terapia antitumoral neoadyuvante

Dentro de las variables bioquímicas determinadas como medida de seguimiento y rutina en las pacientes sometidas a la terapia, se pudieron observar diferencias significativas en muchas de ellas. A pesar de esto, se debe resaltar que, pese a haberse obtenido estas diferencias estadísticamente significativas, no todas las variables van a proporcionar información clínicamente relevante respecto a las alteraciones que sufren las pacientes a lo largo del tratamiento, pues en muchos casos, aunque las variables se vieron modificadas, no se situaron fuera de los rangos reconocidos como clínicamente patológicos, considerándose como valores normales de referencia para individuos sanos, de acuerdo con Kratz, A. y col. 2004 y Mejía AG. y col. 2006 (Kratz et al., 2004; Mejía & Ramelli, 2006).

De esta forma, las principales alteraciones clínicamente importantes se hallaron a nivel de proteínas marcadoras de daño hepático como LDH o GPT y a nivel de alteraciones del perfil lipídico como HDL, LDL o colesterol total.

Son muchos los estudios llevados a cabo para determinar si los niveles de glucemia (marcador de hiperinsulinemia) están relacionados o no con el riesgo de sufrir cáncer de mama (Keinan-Boker et al., 2003; Malin et al., 2004). Pese a ser una variable común y fácilmente detectable, no son muchos los estudios que describan si existe asociación o no entre estos valores y el efecto de los quimioterápicos en la terapia antitumoral frente al cáncer de mama. En nuestro trabajo, los niveles de glucosa plasmática, aunque se incrementaron en el tiempo como consecuencia del tratamiento quimioterápico, no superaron los valores de referencia normales establecidos para esta variable en plasma. Estos resultados van acordes a los obtenidos en el estudio llevado a cabo por Bonanni, B. y col. (Bonanni et al., 2012), donde trataron de comprobar un efecto antitumoral de la metformina en pacientes de cáncer de mama (con un 85% de receptores hormonales positivos), no diabéticas y sometidas a quimioterapia y cirugía. En el estudio de Bonanni, B. y col. 2012, los niveles de glucosa de las pacientes a las que no se les administró metformina (controles), presentaron valores similares a los obtenidos en nuestro estudio, comprobando que la quimioterapia no modifica los valores de esta variable. Otros estudio similar con los mismos objetivos referentes a la metformina como fármaco con dualidad de efectos, llevado a cabo por Niraula, S. y col. (Niraula et al., 2012), comprobó que los niveles de glucosa se mantenían constantes en pacientes con cáncer de mama (de nuevo con un 85% de la población con receptores hormonales positivos), sometidas a quimioterapia neoadyuvante. Este estudio sólo hizo una valoración puntual de las pacientes que no tomaban metformina a lo largo de la terapia neoadyuvante, pero los valores son similares a los recogidos en nuestro ensayo y a los establecidos para el estudio

anterior de Bonanni, B. y col. 2012. Para pacientes con cáncer de mama que finalizaron una terapia antitumoral (neoadyuvante o no), se pudieron observar unos niveles de glucosa prácticamente iguales a los obtenidos por Niraula, S. y col. 2012 (Goodwin et al., 2015). En otros estudios, se pudo comprobar que algunos pacientes sometidos a terapia antitumoral neoadyuvante presentaban, aunque en muy baja proporción, aumentos significativos en los niveles de glucosa en sangre, aunque este tipo de efectos secundarios se asociaron a fármacos no empleados en nuestro estudio, como prednisona (Ellis et al., 1986). De acuerdo con los resultados obtenidos a través de nuestro trabajo, y en función de los rangos de concentración observados en la literatura para la variable de glucosa plasmática, se puede descartar una alteración de sus niveles plasmáticos a consecuencia de la quimioterapia neoadyuvante, siendo el incremento sufrido a lo largo del tiempo un efecto no relevante a nivel clínico.

Otro de los parámetros importantes determinados para evaluar la seguridad del tratamiento, y para hacer un seguimiento de la funcionalidad renal de las pacientes, es la creatinina. Esta molécula nos da idea de cómo está funcionando el riñón en estas pacientes y de si se está produciendo un aumento en el catabolismo proteico. Este parámetro se vuelve mucho más relevante cuando encontramos ciertas patologías concomitantes (que no hemos clasificado para este estudio) como, por ejemplo, diabetes descontrolada, bastante común en una población que suele ser de edad avanzada (por las propias características etiológicas del cáncer de mama). En nuestro caso, los niveles de creatinina se mantuvieron constantes y ligeramente descendentes durante todo el tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida, produciéndose únicamente un incremento significativo tras el inicio de la terapia con taxanos. La vida media de la epirrubicina (independiente a la dosis), no se ha relacionado con alteraciones en los niveles de creatinina sérica (Jakobsen et al., 1991), indicando, por tanto, que este fármaco no está implicado en alteraciones en sus niveles, afirmación que ponen de manifiesto los resultados de nuestro estudio. En algunos fármacos concretos del grupo de taxanos, se han encontrado reacciones adversas de frecuencia rara de incremento de creatinina plasmática, como se describe en la ficha técnica de Paclitaxel (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS). Ministerio de Sanidad, 2014). A pesar de que en nuestro ensayo se encontraron diferencias significativas, no se produjo un incremento que se desviara del rango de valores normales para creatinina en un individuo sano, de acuerdo con los manuales anteriormente descritos de Kratz, A. y col. 2004 y Mejía, AG. y col. 2006. A medida que aumenta la creatinina en sangre, disminuye el filtrado glomerular. Según nuestros resultados, podemos afirmar que los niveles de filtración glomerular no estaban clínicamente alterados y que no se produjo una inducción del catabolismo proteico a consecuencia de los taxanos, así como por el efecto de epirrubicina, ciclofosfamida o la propia enfermedad. Existen varios estudios que tratan de determinar las relaciones farmacocinéticas y de farmacodinamia de los taxanos, descartando una asociación entre algunos fármacos de este grupo con el aclaramiento de la creatinina o a través de resultados clínicamente irrelevantes. Además, los autores de estos ensayos contribuyen, de esta forma, a conocer la toxicidad o necesidad de regulación de la dosis asociada o no a la creatinina y a su aclaramiento (por aumentar la vida media de los fármacos, su

distribución, eliminación etc.) (N. Chen et al., 2014), pero no establecen relación causa-efecto entre la administración de estos fármacos y la modificación de los niveles séricos de creatinina como en nuestro estudio. Aun así, permite conocer en cierta forma que la funcionalidad del riñón no se encuentra modificada por estos principios activos. Para el caso de docetaxel, Dimopoulos, MA. y col. (Dimopoulos et al., 1998), establecieron que en pacientes de carcinoma urotelial, una vez administrado el fármaco, se producía una mejora en los niveles de funcionalidad renal, evitando así el empleo de fármacos combinados de mayor toxicidad como cisplatino.

De forma similar a lo que sucede con los niveles de creatinina plasmática, la concentración de electrolitos como el potasio, se ve estadísticamente modificada a lo largo de la terapia neoadyuvante. El tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida generó un descenso estadísticamente significativo respecto al estado basal. Posteriormente, los taxanos indujeron un incremento en su concentración hasta alcanzar los mismos niveles que obtuvieron las pacientes al inicio del estudio. Como se ha comentado anteriormente, a pesar de las fluctuaciones sufridas, los niveles de potasio se mantuvieron dentro de los valores normales establecidos para un individuo sano (Kratz et al., 2004; Mejía & Ramelli, 2006), careciendo por tanto de la relevancia clínica esperada. Generalmente, la determinación de potasio en sangre se realiza para conocer el funcionamiento renal, la actividad cardíaca, alcalosis y acidosis metabólicas, o para evaluar afecciones relacionadas con la conducción nerviosa. La cuantificación de potasio en sangre es altamente relevante debido al gran efecto cardiotoxico producido por la administración de antraciclina y por su combinación con ciclofosfamida. Dentro de este grupo, se han desarrollado distintos fármacos que han sido capaces de disminuir estos efectos secundarios, como es el caso de epirrubicina frente a su precursor adriamicina. La ciclofosfamida se caracteriza por ser un fármaco con efectos antidiuréticos, que alteran el balance electrolítico (DeVita, Lawrence, & Rosenberg, 2008). A pesar de ello, los niveles de potasio en sangre no sólo no incrementaron, sino que también se vieron ligeramente disminuidos a lo largo del tratamiento con ciclofosfamida y epirrubicina, corroborando que, en nuestro estudio, la administración de esta terapia combinada no alteró el equilibrio electrolítico de las pacientes. Sin embargo, deben evaluarse los niveles de enzimas como LDH para corroborar si hay daño cardíaco o si, por el contrario, no se ve afectado. Respecto a los niveles de potasio sérico tras la terapia con taxanos, se pudo comprobar que las pacientes alcanzaban los niveles obtenidos al inicio del estudio, volviendo estos resultados a ser clínicamente poco relevantes.

Los niveles de bilirrubina total, al igual que otras enzimas determinadas en nuestro estudio, como GOT o GPT, indican cómo se está alterando el hígado durante el tratamiento quimioterápico. Al igual que con las variables bioquímicas anteriormente descritas, los niveles de bilirrubina total sufrieron fluctuaciones a lo largo del tratamiento quimioterápico. Hoy en día, la determinación de diferentes test de funcionalidad hepática han adquirido gran relevancia para evaluar la morbimortalidad asociada a los pacientes de cáncer (X. Liu et al., 2015; Liu et al., 2014). En nuestro caso, los niveles con los que comenzaron las pacientes el ensayo fueron los más elevados de toda la terapia antitumoral. Tal es así que, durante el tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida, se

produjo una disminución en sus valores, hecho que contrasta con el estudio llevado a cabo por Payne, J. y col. en 2002 (Payne, 2002), donde constató un incremento en los niveles de bilirrubina total a lo largo del tratamiento con doxorrubicina y ciclofosfamida, o con los hallados por Hirvikoski, P. y col. (Hirvikoski, Kumpulainen, & Johansson, 1997), que no encontraron diferencias significativas en los niveles de bilirrubina total de pacientes pre y post-tratamiento adyuvante con ciclofosfamida combinada. Esto puede significar que diferentes antraciclinas ejercen efectos distintos sobre este marcador bioquímico. Posteriormente, la concentración de bilirrubina total sufrió un incremento estadísticamente significativo a consecuencia del tratamiento con taxanos, que elevaron de nuevo sus valores hasta niveles cercanos a los basales, aunque dentro de los niveles normales para un individuo sano. Algunos autores relacionaron, tras el tratamiento con Paclitaxel, un incremento de bilirrubina asociado de forma directa a la edad de los pacientes sometidos a dicha terapia (Lichtman et al., 2012). En nuestro estudio se encontraron diferencias entre las pacientes desde la llegada al estudio hasta un mes finalizada la cirugía correspondiente tras la quimioterapia neoadyuvante. Los niveles de bilirrubina total se vieron disminuidos hasta alcanzar valores idénticos a los obtenidos tras el tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida. Aunque estos valores soportaron cambios ascendentes y descendentes, se encontraron dentro de los valores de referencia para un individuo sano, a lo largo del tratamiento completo en el cáncer de mama (desde el inicio hasta un mes tras la cirugía). Liu, X. y col. (X. Liu et al., 2015), en un ensayo llevado a cabo para evaluar la relación de la supervivencia global de pacientes de cáncer de mama no metastásicas con distintos parámetros bioquímicos de funcionalidad hepática, observaron que las pacientes con una mayor concentración de bilirrubina total presentaban una mejor tasa de supervivencia a los 5 años que aquellas que presentaban niveles de bilirrubina total inferiores a 0,2mg/dl, hecho que podría relacionarse con una disminución en el efecto antioxidante no enzimático asociado a la bilirrubina a consecuencia de la quimioterapia neoadyuvante (Ramirez-Exposito et al., 2014). En nuestro estudio se pudo comprobar cómo los niveles de bilirrubina total fueron siempre mayores a 0,33 mg/dl, lo que nos indicaría una mejor respuesta global al tratamiento a lo largo del tiempo: el hecho de no ser valores elevados, supone a su vez cierta protección hepática. Al finalizar la terapia antitumoral, las pacientes concluyeron el estudio con niveles dentro del rango normal para un individuo sano, y de acuerdo con la afirmación propuesta por Liu, X. y col. 2015, cierto incremento en sus valores va a relacionarse una mayor supervivencia durante los siguientes 5 años. Payne, J. y col. (Payne, Held, Thorpe, & Shaw, 2008) observaron cierta tendencia en el incremento de los niveles de bilirrubina total como respuesta a un ejercicio moderado. De acuerdo con estos dos planteamientos, debería tenerse en cuenta, al finalizar la terapia antitumoral, el fomento de la práctica de ejercicio moderado que permita mejorar los parámetros de funcionalidad hepática (como la bilirrubina total) y, con ellos, la supervivencia de las pacientes, dentro de un intervalo de seguridad hepática.

Otro de los parámetros determinados para evaluar la funcionalidad hepática fue la concentración de fosfatasa alcalina. Para esta variable, se encontraron diferencias significativas a lo largo del tratamiento quimioterápico, tanto con epirrubicina y

ciclofosfamida como con taxanos, produciéndose un incremento gradual a lo largo de toda la terapia neoadyuvante. De la misma forma, este incremento se mantuvo a lo largo del tratamiento, extendiéndose estos valores hasta un mes tras la intervención quirúrgica de las pacientes. Se halló, por tanto, un incremento global desde que las pacientes iniciaron el estudio hasta que lo finalizaron completamente. A pesar de que se dieron diferencias significativas, la funcionalidad hepática no se vio afectada a nivel de esta enzima, pues sus valores se mantuvieron a lo largo del tiempo dentro de los valores de referencia para un individuo sano. Uno de los primeros estudios llevados a cabo en pacientes con cáncer de mama donde se empleaba adriamicina, 5-fluorouracilo y ciclofosfamida en combinación, observó que las pacientes que recibían terapia adyuvante con estos tres fármacos podían presentar alteraciones hepáticas (algunas de carácter subclínico) medidas como fosfatasa alcalina o LDH (Larroquette, Hortobagyi, Buzdar, & Holmes, 1986). El estudio se extendía en el tiempo hasta un año después de finalizar el tratamiento, concluyendo que esas afecciones podían prolongarse hasta un año después de haber finalizado la terapia antitumoral. En nuestro caso, se pudo observar un patrón similar, aunque aún no tenemos datos a largo plazo que permitan evaluar la funcionalidad hepática tras un periodo mayor a un mes tras el fin del tratamiento completo. Otro estudio, llevado a cabo por Amadori, D. y col. (Amadori et al., 2011), demostró que la combinación de fármacos como doxorrubicina y paclitaxel son seguros a nivel de alteraciones hepáticas, de forma similar a lo que sucede en nuestro estudio. Las conclusiones de este ensayo mostraron que solamente en 4,4% de las pacientes presentaron alguna alteración (no severa) de la fosfatasa alcalina; por ello, se debe reseñar que el estudio estaba basado en pacientes metastásicas de cáncer de mama, con expresión de Her2 positiva, por lo que recibían un inhibidor de Her2 y una antraciclina diferentes a la empleada en nuestro estudio. Pese a ello, la evaluación de la combinación antraciclinas-taxanos como terapia antitumoral mostró resultados de seguridad hepática similares a los obtenidos en nuestro caso. Existe escasez de estudios que evalúen cómo se modifica la fosfatasa alcalina a lo largo del tratamiento combinado de epirrubicina y ciclofosfamida con taxanos en pacientes con cáncer de mama, a excepción de algún caso clínico publicado como *case report* (Ishizuna, Ninomiya, Ogawa, & Tsuji, 2014), que presentó hepatotoxicidad asociada a epirrubicina y ciclofosfamida, pero no a paclitaxel. El hecho de ser un caso aislado, le dota de exiguo valor clínico y no puede emplearse como fuente fiable. Basándonos en los resultados de otras variables de funcionalidad hepática, se puede descartar un daño hepático con validez clínica que pueda asociarse a la terapia antitumoral empleada en nuestro estudio. De la misma forma, transcurrido un mes desde el final de la terapia, los niveles, aunque elevados, siguen dentro de los valores de referencia, descartando, de forma global, una afección hepática en estas pacientes.

Los valores de GGT se determinaron como medida habitual de evaluación del daño hepático o en vías biliares. Esta enzima se determinó junto con otro grupo de enzimas y moléculas que nos ayudan a evaluar la funcionalidad hepática y el posible daño que puedan sufrir las pacientes a lo largo de la enfermedad o del tratamiento quimioterápico en el hígado. Al igual que ha sucedido con otras variables bioquímicas, las modificaciones que ha ido sufriendo la GGT a lo largo de todo el tratamiento antitumoral, se han situado

dentro de los valores de referencia de este parámetro, para un individuo sano. En nuestro caso, se pudo observar un incremento en los niveles de esta enzima tras el tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida, disminuyendo progresivamente a lo largo del tratamiento con taxanos. A pesar de esta disminución asociada al final de la quimioterapia (T3), se pudo observar un aumento global desde que las pacientes llegaron al estudio respecto a cómo finalizaron el mismo al mes de la intervención quirúrgica (T6), con un pico máximo obtenido tras la administración de epirrubicina y ciclofosfamida. Un incremento en los valores de esta enzima, se ha relacionado con un mayor riesgo de desarrollo de cáncer de mama (Strasak et al., 2008). Algunos autores incluso han concretado que la mayor incidencia de cáncer de mama corresponde a mujeres premenopáusicas con elevado nivel de GGT (Fentiman & Allen, 2010). Pese a ello, su relación con esta patología aun es controvertida, ya que muchos estudios no han tenido en cuenta el estado hormonal de las participantes ni la ingesta de alcohol, o simplemente no han obtenido una asociación definida para GGT y riesgo de padecer cáncer de mama (Van Hemelrijck et al., 2011). Así mismo, la GGT se ha relacionado con la promoción tumoral y la respuesta a la quimioterapia en el cáncer de mama avanzado (Staudigl et al., 2015). Lox, C. y col. (Lox, Ronaghan, & Cobos, 1998), asociaron un aumento en los valores de GGT a la inhibición de estrógenos hepáticos promovido por tamoxifeno en paciente de cáncer de mama tratadas con dicho fármaco. Este estudio difiere significativamente del nuestro, puesto que no encontramos valores de GGT fuera del rango normal para un individuo sano, constatando que la evolución de la patología no se relaciona con un aumento en los niveles de GGT clínicamente relevantes. A pesar de la escasez de estudios que evalúen los niveles de GGT en cáncer de mama ya establecido (y no con su incidencia), Panis, C. y col. (Panis, Victorino, et al., 2012) obtuvieron unos resultados muy importantes en cuanto a la estimación de GGT y los distintos estadios del cáncer de mama, encontrando que la concentración de esta enzima aumentaban a medida que avanzaba la patología. Verificaron un aumento de GGT en los estadios iniciales, aunque dentro de los límites de referencia normales, mostrando por tanto un carácter subclínico asociado a GGT y cáncer de mama temprano. Así mismo, los niveles de GGT se elevaron de forma patológica en pacientes con cáncer de mama avanzado, demostrando una asociación positiva entre GGT y cáncer de mama. En nuestro caso, se produce un incremento gradual a lo largo del tiempo asociado al efecto de la propia terapia neoadyuvante, aunque debe indicarse que no es tan agudo como el establecido por Panis, C. Victorino, VJ. y col. 2012. Por otra parte, Bojko, P. y col. (Bojko et al., 2012), observaron que, tras una terapia metronómica de ciclofosfamida en pacientes con cáncer (75% con cáncer de mama avanzado o metastásico), que habían recibido distintos tipos de terapias quimioterápicas previas frente a las que presentaron resistencia, se obtuvieron valores elevados de GGT en el 8% de los pacientes. Un 4% con un grado leve o moderado, y un 4% con elevado grado. De acuerdo con nuestros resultados, se produjo un incremento en los niveles de GGT, que podrían asociarse en parte a la ciclofosfamida, a pesar de que en el estudio de Bojko, P. y col. 2012 no se expusieron los valores de concentración de GGT en plasma, lo que nos genera cierta dificultad en la comparación de ambos estudios. Los resultados obtenidos por Hirvikoski, PP. y col. (Hirvikoski et al., 1997) en un estudio de terapia adyuvante con ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, mitoxantrona y metotrexato,

reflejan un aumento significativo de los niveles de GGT, aunque dentro de los valores de referencia antes y tras el tratamiento adyuvante. La diferencia principal respecto a nuestro estudio es el tipo de terapia recibida y los fármacos empleados en la misma. Aun así, se puede concluir que la ciclofosfamida puede ser la causante de la elevación que sufren las pacientes de nuestro trabajo durante el tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida. Finalmente, un estudio llevado a cabo por Quintanella-Fandino, M. y col. (Quintanella-Fandino et al., 2014) en pacientes de cáncer de mama Her2 negativos y sometidas a terapia combinada de nintedanib con paclitaxel seguida de Adriamicina y ciclofosfamida, comprobó que, dependiendo del rango de dosis establecido, los niveles de GGT aumentaban en mayor o menor grado. A la dosis efectiva más baja, el 16,7% de las pacientes experimentó un grado 2 de toxicidad para GGT. Al aumentar la dosis de paclitaxel y el inhibidor de la angiogénesis, la toxicidad asociada aumentaba de grado en el 66% de las pacientes. Al tratarse de un estudio piloto, su mayor inconveniente es su tamaño muestral tan bajo que impide extrapolar de forma global estos resultados y comprarlos con los obtenidos para los valores de GGT en nuestro ensayo.

Dentro del grupo de variables determinadas para evaluar el daño hepático, encontramos la enzima GPT o ALT, que se valora de forma complementaria a otras enzimas para determinar la funcionalidad hepática. En nuestro caso, se pudieron observar diferencias significativas a lo largo del tratamiento quimioterápico, así como a lo largo de toda la terapia antitumoral. De acuerdo con los resultados obtenidos, los valores de GPT se elevaron de forma consistente durante el tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida hasta alcanzar el límite superior de referencia establecido para una mujer sana en 35 U/L, exactamente el valor al que se llegó tras el tratamiento combinado de epirrubicina y ciclofosfamida. Aunque posteriormente, con el inicio del tratamiento con taxanos, se produjo cierta tendencia a la disminución, éstos no fueron capaces de sofocar el daño hepático producido, manteniéndose los valores de GPT cercanos al límite superior para una mujer sana. Teniendo en consideración los resultados globales del tratamiento, se produjo un incremento gradual de GPT a lo largo de la terapia antitumoral completa. De esta forma, las pacientes llegaron al estudio con los niveles más bajos de GPT y fueron incrementándose en la quimioterapia, aunque, al final del tratamiento, los valores de GPT se encontraron dentro de niveles normales para una mujer sana, alejados del límite superior de dicho rango. Existen algunos trabajos que han relacionado la expresión del gen codificante de GPT con el riesgo de padecer cáncer de mama (King, Go, Elston, Lynch, & Petrakis, 1980; Tejerina, 1992), y sólo algunos ensayos expuestos en la literatura científica han determinado cómo se modifica a lo largo de la propia patología y no por el tratamiento asociado a la misma o por metástasis a hígado o hueso, que alteran notablemente sus valores.

El estudio llevado a cabo por Panis, C. y col. (Panis, Victorino, et al., 2012), comprobó que los niveles de GPT (ALT) en pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos no presentaban diferencias significativas respecto a los valores determinados en el grupo control, compuesto por mujeres sanas. De forma similar a como sucede en nuestro estudio, los niveles de ambos grupos (controles y pacientes en estadios iniciales) se encontraron dentro del límite normal alto. No ocurría lo mismo en pacientes con cáncer

de mama en estadios avanzados, donde los niveles de daño hepático asociados a esta determinación se veían bastante aumentados. Esto demuestra, por tanto, un efecto de la propia patología en sus estadios más avanzados, respecto al valor de GPT. A pesar de la similitud del estudio, se debe de tener en cuenta que las pacientes de nuestro estudio partían de niveles más bajos de daño hepático y alcanzaron, tras la quimioterapia con epirrubicina y ciclofosfamida, niveles similares a los determinados por Panis, C. Victorino, VC. y col. 2012, para mujeres sanas y en estadios iniciales. En referencia al efecto hepatotóxico de la quimioterapia, se ha comprobado que la ciclofosfamida, en combinación con pemetrexed, es capaz de aumentar los niveles de ALT a dosis bajas (400 mg) en pacientes con avanzado estado de cáncer de mama (Dittrich et al., 2006). A pesar de esto, se debe resaltar que no es posible asociar el efecto a un único fármaco de esa terapia combinada, lo que dificulta, en nuestro estudio, la asociación de un incremento de ALT con la ciclofosfamida, y que la toxicidad asociada, de acuerdo con lo expuesto por los autores, descendió a las tres semanas. Otro estudio llevado a cabo en pacientes con cáncer de mama sometidos a terapia combinada (pre y post operatoria), de 5-fluorouracilo, epirrubicina y ciclofosfamida, conjuntamente con FSK0808 (análogo de filgrastin para evitar infecciones causadas por la neutropenia generada por los quimioterápicos), constató un incremento en los niveles de ALT en un 8,7% de las pacientes, aunque de nuevo no pueda asociarse al efecto de un único fármaco de la terapia antitumoral (Sagara et al., 2013). De forma similar, el estudio realizado por Quintela-Fandino, M. y col. (Quintela-Fandino et al., 2014), observó un aumento significativo en ALT al aumentar la dosis de quimioterápicos empleados (nintedanib con paclitaxel semanal, seguido por adriamicina y ciclofosfamida) en pacientes con cáncer de mama, presentando la limitación de un bajo tamaño muestral y de la incapacidad de asociarse a un fármaco concreto a su combinación, pues la determinación de los parámetros se hizo al final del estudio y no de forma secuencial al tratamiento que recibían las pacientes. Tras el análisis de estos trabajos, se puede comprobar que todos contenían ciclofosfamida en su terapia. Este hecho induce a pensar en el efecto de este fármaco sobre los niveles de ALT de las pacientes, produciendo un posible daño hepático, pues en nuestro estudio también se produjo un incremento sustancial en dichos niveles tras la administración de éste quimioterápico, a pesar de no ser clínicamente relevantes. Teniendo en cuenta el punto final de nuestro estudio, se comprueba que la alteración hepática no es sólo subclínica, sino que además es reversible, pues una vez finalizada la terapia combinada, se produjo un descenso en los niveles de esta enzima, como se pudo observar al mes de haber finalizado la terapia tumoral.

Tal y como se ha comentado anteriormente, el daño a nivel hepático no se comprueba únicamente tras la determinación sanguínea de un sólo parámetro. Otra de las variables a tener en cuenta es la concentración de la enzima GOT (AST). Esta proteína se encuentra en grandes cantidades en hígado, corazón y músculo. Su determinación nos aporta, conjuntamente con la determinación de otras moléculas, una idea significativa de la existencia de un daño hepático o cardiaco, bien a consecuencia del cáncer de mama o debido al tratamiento para su erradicación. En nuestro estudio se pudo comprobar un incremento significativo de AST durante la quimioterapia con epirrubicina y

ciclofosfamida, así como durante el tratamiento con taxanos. Además, se produjo un incremento gradual a lo largo de toda la terapia antitumoral, de tal forma que las pacientes registraron los valores más bajos de AST a la llegada al estudio y fueron incrementándose durante el tratamiento quimioterápico, estabilizándose posteriormente durante el resto del tratamiento hasta un mes tras la intervención quirúrgica. A pesar de que sus valores se incrementaron en el tiempo, se situaron siempre dentro de los límites de referencia establecidos para un individuo sano, sin alcanzar en ningún caso el límite superior (al menos 1,25 veces menor al valor máximo de referencia). De forma general, se observó un comportamiento similar de esta enzima con el registrado para ALT. Así, Panis, C. y col. (Panis, Herrera, et al., 2012), comprobaron un comportamiento parecido de esta molécula durante el cáncer de mama. Estos autores evidenciaron un aumento de AST a medida que la patología promocionaba. Respecto a un grupo control de mujeres sanas, las pacientes con estadios iniciales de cáncer de mama no registraron un incremento significativo para AST (que se situó cercano al límite superior de referencia), sin embargo, las pacientes con un cáncer de mama avanzado, presentaban niveles estadísticamente mayores que el grupo sano, con valores considerados patológicos para esta enzima, probablemente por haberse producido metástasis hacia el hígado. Algunos de los estudios citados previamente determinaron tanto los niveles de AST como ALT durante el tratamiento con quimioterápicos combinados en cáncer de mama. De esta forma, Sagara, Y. y col. (Sagara et al., 2013), observaron un incremento en los niveles de AST en el 5,8% de las pacientes de cáncer de mama sometidas a 5-fluorouracilo, epirrubicina y ciclofosfamida, conjuntamente con FSK0808 (análogo de filgrastin). Así mismo, Quintanella-Fandino, M. y col. (Quintanella-Fandino et al., 2014), comprobaron que tras la administración de las dosis más elevadas propuestas en su estudio para los fármacos nintedanib con paclitaxel (semanal), seguido por Adriamicina y ciclofosfamida, se produjo un incremento significativo y severo de AST, de forma dosis dependiente. Debido a que esa dosis sólo se empleó en tres individuos, la escasez de información nos permite sacar como conclusión que, de forma aislada, la combinación de estos fármacos puede producir un incremento en el parámetro de hepatotoxicidad AST. Sessa, C. y col. (Sessa et al., 2009) observaron un incremento en el daño hepático, medido como un índice de AST/ALT, de grado de toxicidad ≤ 2 en un 94% y de grado ≥ 3 en el 8% de pacientes de cáncer de mama y con carcinoma de tejidos blandos en estadios avanzados (pudiendo haberse diseminado a hígado), tras el tratamiento con doxorubicina y trabectedina. Según los autores de este estudio, la hepatotoxicidad observada se presentó de forma reversible. La complejidad de comparación de este estudio frente al nuestro radica en el tipo de tratamiento, así como en el de las pacientes, indicando únicamente que la posible hepatotoxicidad asociada a antraciclinas combinadas con trabectedina.

El estudio llevado a cabo por Kim, W. y col. (W. Y. Kim et al., 2011), trató de comprobar si existía diferencias de toxicidad asociada a distintos taxanos (docetaxel o paclitaxel) durante una terapia combinada con Adriamicina y ciclofosfamida. Estos autores encontraron cierto grado de hepatotoxicidad asociada a la terapia antitumoral combinada, encontrando una tendencia (aunque no diferencia significativa) entre emplear paclitaxel o docetaxel. Según sus resultados, en pacientes con cáncer de mama sin metástasis distantes, sometidas a una u otra terapia adyuvante, hallaron elevados los

niveles de AST (de cualquier grado) para un 17,1 % de los pacientes con paclitaxel y para un 10,5% de los pacientes con docetaxel. En la mayoría de los estudios anteriores, se determinó si existió hepatotoxicidad o no, asociada a distintos niveles de AST en sangre, sin exponer los valores determinados para esta variable. Además, tanto los fármacos empleados como el tipo de quimioterapia recibida distan bastante de nuestro estudio, lo que limita posibles comparaciones certeras. En nuestro caso, se pudo observar una elevación temporal de los niveles de AST a consecuencia del tratamiento con quimioterápicos, pero, de la misma forma que han indicado otros autores en la literatura, parecer ser reversible, pues cuando las pacientes abandonan nuestro estudio, lo hicieron con niveles de AST menores que para los hallados durante la fase quimioterápica. DeVita, VT. y col. (DeVita et al., 2008) apoyan la idea de que el daño hepático producido por diversos fármacos antitumorales (especialmente 5-Fluorouracilo), es de carácter reversible, disminuyendo con el paso de las semanas. A pesar de todo, los valores que obtuvimos se mantuvieron siempre dentro de la normalidad, no pudiendo asociar, por tanto, un tratamiento con una situación patológica.

Hasta ahora, todas las variables determinadas para comprobar el daño hepático se habían encontrado dentro de los niveles normales para un individuo sano, aun habiendo encontrado diferencias significativas dentro de los puntos temporales del estudio (asociados a distintas fases del tratamiento). Dentro de este grupo de variables, podemos encontrar los valores de LDH. Esta enzima indica si se está sufriendo algún daño tisular, principalmente a nivel cardiaco, hepático, renal y muscular. Las antraciclinas (principalmente doxorubicina, aunque también la empleada en nuestro estudio, epirubicina) presentan un efecto cardiotoxico perfectamente definido en la literatura científica (Akpek et al., 2015; Florescu, Magda, Enescu, Jinga, & Vinereanu, 2014; Sergio Granados-Principal et al., 2014; Varga, Ferdinandy, Liaudet, & Pacher, 2015). Esta enzima aporta una idea del efecto del tratamiento y si es necesaria una regulación de la dosis empleada para evitar la cardiotoxicidad irreversible que se genera de forma dosis-dependiente. En nuestro estudio se pudo observar que las pacientes sufrieron un incremento en los valores plasmáticos de LDH desde su llegada al estudio hasta un mes tras la intervención quirúrgica, sufriendo fluctuaciones significativas a lo largo de toda la terapia antitumoral. Debemos destacar el incremento observado durante el tratamiento con epirubicina y ciclofosfamida, que supuso la máxima concentración de esta enzima para todo el tratamiento antitumoral, pese a no ser estadísticamente significativa respecto al nivel basal. En nuestro ensayo, las pacientes registraron durante todo el tratamiento, unos niveles de LDH superiores a los estandarizados como valores de referencia para un individuo sano, aunque estos niveles no estén perfectamente estandarizados en la literatura y existan múltiples valores considerados como normales. De acuerdo con la Health Illustrated Encyclopedia de A.D.A.M. (A.D.A.M. Health, 1997-2016), los niveles considerados como normales para LDH alcanzan un límite superior de 333UI/L, considerando, por tanto, este nivel como máximo para un individuo sano, aunque otros autores y laboratorios consideran otros valores en función del método empleado para determinarlo. Teniendo en cuenta que existe una asociación entre los quimioterápicos empleados y un efecto cardiotoxico, que esta enzima es empleada para determinar cardio

y/o hepatotoxicidad y que el resto de parámetros empleados para evaluar la funcionalidad hepática se encontraban dentro de los parámetros normales para un individuo sano, podemos presuponer que la elevación registrada en los valores de LDH está relacionada con un posible daño cardíaco y no con alteraciones hepáticas. De forma general, esta enzima controla la conversión de piruvato a lactato en el proceso glicolítico celular.

Las células tumorales emplean mínimamente la generación de energía a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial, utilizando principalmente la glicolisis aeróbica que cursa con una elevada formación de lactato (Efecto Warburg) (Warburg, 1956). La LDH juega por tanto un papel crucial en el desarrollo de las células tumorales, crecimiento y mantenimiento de distintos tipos de tumores, pudiendo incluso relacionarse con la resistencia a distintos fármacos como taxanos (Goldman, Kaplan, & Hall, 1964; Zhou et al., 2010). Así mismo, se ha podido relacionar, a través de la formación de lactato, con el pronóstico, posibilidad de metástasis distantes o con la supervivencia de los pacientes (Walenta & Mueller-Klieser, 2004). Según esta información, existe una relación entre LDH, cáncer de mama y el efecto de los quimioterápicos y sobre los quimioterápicos. De acuerdo con esto, unos valores de partida elevados en pacientes con cáncer de mama es un resultado esperable, pues se ha observado que se relaciona directamente con el desarrollo tumoral. Panis, C. y col. (Panis, Herrera, et al., 2012) comprobaron, en un estudio llevado a cabo en pacientes con cáncer de mama en estadios avanzados, que los niveles de LDH aumentaban respecto a un grupo control sano, a pesar de que estos autores no hallaron diferencias significativas entre ambos grupos. En el mismo estudio, se evaluó el efecto de doxorubicina y paclitaxel sobre LDH, observando un aumento tras la administración con ambos quimioterápicos. El paclitaxel incrementó significativamente los valores de LDH respecto a los controles y a las pacientes en estadios avanzados de cáncer de mama, demostrando un efecto pre-hemolítico de paclitaxel que ya se había establecido previamente *in vitro*, relacionado con la forma de infusión del mismo (i.v.). En este caso, los efectos del paclitaxel coinciden con los obtenidos en nuestro estudio, pues a pesar de que el mayor incremento observado se diese a nivel del tratamiento combinado de epirrubicina y ciclofosfamida, las diferencias significativas las encontramos únicamente asociadas al efecto de los taxanos.

Yang, RX. y col. (Yang et al., 2012) observaron que en función de cómo se administrase la epirrubicina, las pacientes con cáncer de mama registraban mayor o menor cambio en los niveles de LDH. De acuerdo con estos autores, cuando la epirrubicina se administra de forma intravenosa, la LDH sufre un incremento significativo respecto al estado previo a la administración. A pesar de que este aumento se asoció a la epirrubicina, los niveles que contemplaron Yang, RX. y col. 2012, no se aproximaron a los valores hallados en nuestro estudio ni sobrepasaron los niveles de referencia normales establecidos, aunque sugieren la posibilidad de mejorar el perfil cardiotóxico asociados a estos fármacos mediante la administración continuada con una micro bomba, que podría emplearse en estudios futuros para mejorar la funcionalidad cardíaca.

Otros autores como Jones, S. y col. (Jones et al., 2009) han postulado que una sustitución en la terapia combinada de doxorubicina y ciclofosfamida por docetaxel más ciclofosfamida mejora la supervivencia general de las pacientes a 7 años, debido en parte a las alteraciones cardíacas provocadas por las antraciclinas. Así mismo, una combinación

de epirrubicina y paclitaxel mostró, en pacientes con cáncer de mama avanzado, una disminución severa en la cardiotoxicidad asociada a las antraciclinas (Luck et al., 1997; White et al., 2000). De acuerdo con esto, podría darse una mejora en los niveles de LDH (que hemos asociado a cardiotoxicidad) si empleásemos esta combinación de taxanos y ciclofosfamida previa a las antraciclinas o una asociación de paclitaxel y epirrubicina, aunque desconocemos si esto supondría un desequilibrio en otras moléculas descritas anteriormente. Como se ha ido desgranando, dichas moléculas se mantuvieron en niveles muy aceptables gracias a la combinación escogida para nuestro estudio, que ha sido a su vez contemplada como una terapia segura y con efectos cardiotóxicos muy limitados, con pocos casos severos, de acuerdo con lo descrito por Erman, M. y col. (Erman et al., 2005). Estos autores observaron cómo afectaba la combinación de epirrubicina, ciclofosfamida y 5-fluorouracilo, seguido de paclitaxel, a la toxicidad en pacientes con cáncer de mama. A pesar de la similitud de población y terapia, se debe resaltar que la combinación inicial incluía 5-fluorouracilo, lo que difiere de nuestra combinación farmacológica, a pesar de que el 5-fluorouracilo es un fármaco altamente tóxico. De forma global, la cardiotoxicidad producida durante las terapias de primera línea de acción frente a tumores como el cáncer de mama, se ha asociado de forma global a las antraciclinas. A pesar de que la epirrubicina presenta importantes ventajas frente al daño cardíaco asociado a doxorubicina (Italian Multicentre Breast Study with et al., 1988), con la misma eficacia antitumoral (Khasraw et al., 2012), algunos autores han estudiado si una terapia basada en epirrubicina inducía lesiones cardíacas en pacientes con cáncer de mama, comprobando que, a pesar de haber supuesto un mayor número de alteraciones del ventrículo izquierdo, finalmente se resolvían e igualaban a una terapia sin epirrubicina, sugiriendo una baja incidencia de alteraciones y riesgos cardíacos (Fumoleau et al., 2006). Este efecto asociado a la epirrubicina podría extrapolarse a nuestro estudio, pues, a pesar de que se comprobó un aumento significativo de LDH durante el tratamiento de epirrubicina, las pacientes concluyeron el estudio con valores menores que los registrados durante la quimioterapia y cercanos a los valores basales, que se situaron alrededor del límite superior normal para LDH, lo que podría sugerir un efecto reversible de este fármaco sobre la funcionalidad cardíaca.

De forma general, podemos concluir indicando que la terapia actual de fármacos combinados frente al cáncer de mama ha superado con creces los problemas de seguridad encontrados clásicamente para terapias monofarmacológicas, hecho que ha permitido disminuir dosis de distintos fármacos e incluso alterar los distintos tipos de combinaciones para dirigirlos frente a determinados tipos de tumores resistentes a algunos fármacos, siendo, en muchos casos, igual de efectivas (Chow et al., 2013). Según los resultados obtenidos para nuestro ensayo, la combinación elegida en nuestro estudio ha demostrado que, aunque las pacientes presentaron ligeros incrementos de LDH, que hemos asociado a un efecto cardiotóxico, este presentó un efecto reversible transcurrido un mes desde la intervención quirúrgica, puesto que los niveles de LDH iban decreciendo, encontrándose al mismo nivel que los basales (que fueron los más bajos del estudio), hecho que ha sido en parte contrastado con lo descrito en otros estudios clínicos anteriormente citados. Hasta la fecha, no podemos establecer si los valores de LDH

continuaron decreciendo, pues aún no se han recogido las muestras asociadas a la supervivencia a los cinco años de las pacientes tratadas en este estudio, pese a tener una ligera aproximación de lo sucedido al finalizar el estudio completamente. De acuerdo con lo descrito en estudios cuya terapia y población era similar a la nuestra, podemos esperar que la supervivencia de las pacientes sea suficientemente alta como para aseverar la seguridad de la terapia escogida en nuestro estudio, al menos en materia de toxicidad cardiaca y hepatotoxicidad (demostrada como clínicamente nula en apartados anteriores).

Dentro del grupo de variables bioquímicas, encontramos las determinadas para valorar el perfil lipídico de las pacientes. La primera de ellas es la concentración de lipoproteínas HDL-c circulantes en plasma, encargada de transportar el colesterol desde los tejidos hacia el hígado para su posterior transformación y eliminación formando parte de la bilis. Esta lipoproteína tiene, por tanto, un efecto positivo en la eliminación del colesterol circulante en sangre, por lo que un nivel elevado promueve un menor riesgo cardiovascular asociado a la disminución de la acumulación de colesterol en arterias. De acuerdo con la US National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines (National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection & Treatment of High Blood Cholesterol in, 2002), unos niveles inferiores a 40mg/dl de HDL se han asociado a un incremento en el riesgo cardiovascular, de la misma forma que unos valores superiores a 60 mg/dl lo disminuyen significativamente gracias a su participación directa contra la aterogénesis. De esta forma, existe una relación global entre una disminución en los niveles de HDL y el aumento en los valores de LDL y triglicéridos, hecho que se ha denominado comúnmente la “triada lipídica”. En nuestro estudio, se pudieron observar diferencias significativas a lo largo de la terapia con los distintos quimioterápicos. Así, las pacientes registraban los mayores niveles de HDL a la llegada al estudio, produciéndose un descenso a lo largo de la terapia antitumoral con epirrubicina y ciclofosfamida, que se mantuvo hasta el final del tratamiento con taxanos. A pesar de que se produjo una disminución durante el tratamiento quimioterápico, los niveles de las pacientes se encontraron en todo momento dentro del rango óptimo para esta variables, establecido entre 40 y 60 mg/dl, llegando a ser ligeramente superior durante la primera etapa del tratamiento y prácticamente en el límite superior tras la administración de taxanos, por lo que su fluctuación no puede considerarse clínicamente patológica.

Las lipoproteínas LDL son las encargadas de distribuir el colesterol hacia los tejidos. Estas van a tener una relación directa con el riesgo de aterosclerosis, de tal forma que sus niveles recomendables deben situarse óptimamente por debajo de 100mg/dl, considerándose un valor límite alto 159mg/dl. Las LDL y los triglicéridos presentaron un comportamiento similar a lo largo del estudio. De esta forma, se produjo un incremento significativo durante el tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida, que se mantuvo a lo largo del tratamiento con taxanos. De forma general, durante todo el estudio hubo un incremento en sus valores como consecuencia de la quimioterapia y de la intervención quirúrgica. La concentración de LDL alcanzó el límite superior tras el tratamiento con epirrubicina y ciclofosfamida y transcurrido un mes desde la intervención quirúrgica. Del mismo modo, los triglicéridos alcanzaron su máximo en estos mismos puntos temporales,

aunque se mantuvieron durante toda la terapia dentro de los valores de referencia. Si a estas moléculas les unimos la determinación de colesterol total, se puede observar que no se encontraron diferencias a lo largo del tratamiento quimioterápico, pero sí se hallaron entre el punto inicial y final del estudio. Durante todo el tratamiento, el colesterol total sufrió un incremento similar al observado para LDL y triglicéridos, situándose éste fuera del límite superior óptimo, aunque con valores cercanos a la normalidad.

Algunos estudios observaron que, durante el cáncer, se produce un incremento en los niveles de colesterol total y de LDL, con excepción del cáncer de mama, donde se produce un descenso de los mismos, acompañado de un incremento en la concentración de HDL-c, hecho que nuestro estudio pone de manifiesto. Este aumento de HDL-c depende del estadio tumoral, la edad, el estado hormonal o el incremento de TNF α generado por la activación de macrófagos en respuesta al tumor (Rzymowska, 1999; S. Subramaniam, Marar, & Devi, 1991). En el estudio llevado a cabo por Rzymowska, J. (Rzymowska, 1999), la terapia combinada de ciclofosfamida con 5-fluorouracilo y metotrexato generó una disminución en los valores de HDL, de la misma forma que se observó en nuestro estudio, aunque la combinación farmacológica empleada fue diferente. Algunos autores han sugerido que la quimioterapia en sí no afecta al perfil lipídico, sino que lo hace a través de una disfunción ovárica indirecta post-tratamiento, que suprime la síntesis de estrógenos e induce de forma paralela un incremento en la concentración de lípidos circulantes en forma de LDL, colesterol total y triglicéridos (Kailajarvi, Ahokoski, Virtanen, Salminen, & Irjala, 2000; Rzymowska, 1999; Saarto, Blomqvist, Ehnholm, Taskinen, & Elomaa, 1996), que puede equilibrarse, de acuerdo con otros autores, (Gupta et al., 2006; Vehmanen, Saarto, Blomqvist, Taskinen, & Elomaa, 2004), con la administración de tamoxifeno.

Distintos estudios han revisado la asociación entre determinados fármacos antitumorales y un elevado desequilibrio metabólico en las pacientes que logran superar la patología, mostrando un carácter persistente en el tiempo que puede desencadenar alteraciones cardiovasculares, diabetes o resistencia a la insulina, que finalmente puedan desembocar en recidiva (de Haas et al., 2010; Hewitt, Rowland, & Yancik, 2003). Por otro lado, el ensayo realizado por Alacacioglu, A. y col. (Alacacioglu et al., 2013) no encontró diferencias significativas en el perfil lipídico de pacientes con cáncer de mama que recibieron una terapia adyuvante de ciclofosfamida, docetaxel y epirrubicina, a pesar de encontrar cierta tendencia a la disminución de HDL durante dicho tratamiento. En ese estudio, los valores de HDL tanto de partida, como a lo largo del tratamiento quimioterápico de las pacientes, fueron menores a los del nuestro, sugiriendo que tal vez la cirugía previa promueva una alteración en los valores de HDL, que se situaban cercanos al límite inferior, pudiendo promover indirectamente un mayor riesgo cardiovascular.

Los niveles de triglicéridos de nuestro estudio se encontraron en un nivel mucho más bajo que el determinado por Alacacioglu, A. y col., 2013, siendo, sin embargo, los niveles de LDL y colesterol total, similares en ambos estudios pre y post tratamiento. Bicakli, DH. Y col. (Bicakli et al., 2016) propusieron recientemente que la terapia adyuvante combinada de docetaxel, doxorubicina y ciclofosfamida contribuye a aumentar el riesgo de síndrome metabólico, principalmente en pacientes premenopáusicas, debido a que dicha terapia disminuye los niveles de HDL y aumenta

los valores de LDL y triglicéridos. Estos resultados concuerdan perfectamente con los obtenidos en nuestro estudio. A pesar de ello, se debe resaltar que, tanto la antraciclina empleada como la combinación de fármacos empleados, no fue idéntica. A esto le acompaña el hecho de que los valores de HDL que presentaban las pacientes de nuestro estudio estuvieron siempre cercanos o por encima del rango superior establecido (menor riesgo cardiovascular), y que los valores de LDL que se alcanzaron en nuestro estudio no fueron tan elevados como los determinados por Bicakli, DH. y col. 2016, aunque los niveles de triglicéridos en nuestro estudio fueron significativamente próximos a los determinados por estos autores. Todo ello permite postular que, una combinación de epirrubicina y ciclofosfamida, seguida de una terapia con taxanos, podrían dirigir a las pacientes hacia un trastorno metabólico, aunque en menor medida que cuando se administran tres quimioterápicos al mismo tiempo.

Estos hechos deben contrastarse con determinaciones futuras que permitan establecer si las pacientes finalmente desarrollaron algún tipo de trastorno metabólico que pueda asociarse al efecto de los quimioterápicos sobre el perfil lipídico. Un estudio similar (Sharma et al., 2016), donde se emplearon dos terapias diferentes consistentes en, por un lado, ciclofosfamida y doxorubicina seguida de paclitaxel, y por otro epirrubicina, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, seguido de docetaxel, demostró que se producía un descenso en los niveles de HDL y un aumento de LDL en las pacientes respecto a un grupo control sano. A través de este mismo estudio, se evaluó el efecto de estos quimioterápicos a nivel celular, concluyendo que la doxorubicina era capaz de disminuir los niveles de HDL a través de la disminución de ApoA1. Además, este fármaco, conjuntamente con paclitaxel, promovía un aumento en los niveles de LDL a través de un aumento en ApoB y una disminución de los receptores de LDL. Finalmente, el estudio llevado a cabo por Kim, S. y col. (S.-B. Kim, Kok, Thuan, Chao, & Shen, 2015), comprobó cómo una terapia frente al cáncer de mama basada en taxanos (docetaxel), generaba un incremento en los niveles de LDL y colesterol total, acompañado de un descenso en los valores de HDL.

Teniendo en cuenta los estudios anteriores y de acuerdo con nuestros resultados, se puede establecer una relación entre la alteración de los parámetros del perfil lipídico y la terapia antitumoral. Si bien es cierto que los estudios descritos previamente difieren del nuestro en cuanto a los fármacos empleados, las combinaciones de los mismos y el efecto de una terapia neoadyuvante. Por ello, es importante hacer un seguimiento del perfil lipídico de la paciente a lo largo del tratamiento quimioterápico, pues, como se ha podido comprobar, sus efectos pueden prolongarse en el tiempo y generar una alteración metabólica severa que puede influir, incluso, en el riesgo de recidivas. Aunque no poseemos datos más allá del mes tras la intervención quirúrgica, sí se ha observado un incremento significativo en los niveles de colesterol total y LDL que superan los valores de referencia establecidos para un individuo sano, aunque oscilan en intervalos considerados cercanos a la normalidad. Dichos valores deberían de ser controlados en un futuro para tratar de establecer una relación certera entre el efecto de los quimioterápicos y el perfil lipídico a largo plazo, permitiendo establecer una intervención farmacológica,

nutricional o con ejercicio físico aeróbico a lo largo o al final del tratamiento, con el objetivo de disminuir dichas alteraciones metabólicas y evitar así posibles complicaciones futuras de las pacientes. Este hecho ya ha sido contemplado por algunos investigadores, que han diseñado programas de intervención física que mejoran las capacidades de las pacientes y permitan revertir los efectos producidos por los tratamientos (Dieli-Conwright et al., 2014). Otros autores sugieren que, para que los efectos generados en este tipo de pacientes se reviertan mediante el ejercicio físico, es necesaria una adherencia superior al 90% y una duración prolongada en el tiempo, hecho que podría ser limitante en este tipo de intervenciones (Guinan et al., 2013). De forma similar, una intervención con metformina a lo largo del tratamiento quimioterápico ha demostrado (como ya se ha planteado en apartados previos), una mejora en la respuesta antitumoral. Además, esta intervención farmacológica reduce los niveles de colesterol total y LDL en pacientes con cáncer de mama, obesas y/o con sobrepeso, mejorando por tanto el perfil lipídico de las mismas y ejerciendo un efecto dual (Kalinsky et al., 2014). Este efecto dual también ha sido propuesto por Garwood, E. y col. (Garwood et al., 2010) para la fluvastatina, que mejora el perfil lipídico de las pacientes con cáncer de mama y, además, promueve una disminución en la proliferación celular y un aumento de la apoptosis, cuando se administra en el periodo periquirúrgico.

CONCLUSIONES

1. A través de este estudio, se comprueba por primera vez en humanos que, en el tratamiento neoadyuvante frente al cáncer de mama, el Hidroxitirosol no ejerce efectos clínicamente relevantes durante la quimioterapia basada en epirrubicina y ciclofosfamida, seguida de taxanos, ni a lo largo del tratamiento antitumoral completo. La terapia antitumoral en sí misma no produce alteraciones daño oxidativo a ácidos nucleicos, por lo que el Hidroxitirosol no ejerce ningún efecto beneficioso sobre el daño oxidativo en ADN de linfocitos aislados. Así mismo, el Hidroxitirosol no interfiere en el metabolismo de las purinas ni del colesterol y no modifica significativamente los electrolitos plasmáticos ni las enzimas asociadas al daño hepático y muscular. De la misma forma, aunque produce un aumento global de la defensa antioxidante asociada a Superóxido dismutasa, éste carece de interés clínico al no poder asociarse a un punto temporal concreto.
2. Una terapia combinada con epirrubicina puede inducir un mecanismo de respuesta del sistema antioxidante plasmático, como sucede con la capacidad antioxidante total del plasma tras la administración de epirrubicina y ciclofosfamida, de forma tiempo dependiente, y con el objetivo de contrarrestar el efecto prooxidante que generan este grupo de fármacos a nivel sistémico. Este mecanismo de compensación antioxidante, asociado a dicha combinación, es el causante indirecto de una disminución de los niveles de isoprostanos plasmáticos durante la quimioterapia neoadyuvante.
3. Los niveles de ácidos grasos no esterificados y los productos finales de glicosilación avanzada mantienen una relación con el cáncer de mama, descrita por primera vez gracias a la puesta en marcha de este estudio. Dicha asociación, se debe, bien a la propia producción tumoral o bien como consecuencia de un desequilibrio previo que derive finalmente en el desarrollo de la patología, pues a la llegada de las pacientes al estudio, los niveles de ambas variables fueron estadísticamente superiores a los alcanzados una vez libre de la enfermedad, relacionándose así directamente con la erradicación del tumor en su conjunto y no con la quimioterapia o la intervención quirúrgica de forma aislada. Contrariamente, los productos finales de oxidación proteica y 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, mantienen una relación inversa con el cáncer de mama y con el progreso de la terapia antitumoral neoadyuvante, aumentando a medida que se erradica el tumor.
4. La terapia antitumoral neoadyuvante altera el sistema de defensa antioxidante a distintos niveles. Algunas de estas modificaciones se deben al efecto prooxidante de los quimioterápicos, como el descenso de vitamina E producido por su papel neutralizador de radicales libres, o el incremento de la capacidad antioxidante total del plasma como mecanismo de compensación a un desequilibrio redox. Otras

modificaciones, sin embargo, no se ven afectadas por el efecto quimioterapia, sino al efecto de la terapia antitumoral en su conjunto, como el descenso de actividad propiciado en Superóxido dismutasa y Catalasa como consecuencia indirecta del restablecimiento del equilibrio redox al eliminar el tumor.

5. Este estudio describe por primera vez en pacientes con cáncer de mama que la quimioterapia neoadyuvante empleada promueve un aumento en los niveles plasmáticos de la proteína Secreted Frizzled-Related Protein 4, asociada con un descenso en la proliferación de células tumorales y un incremento en su apoptosis. La combinación de epirrubicina y ciclofosfamida, seguida de taxanos, se presenta como una terapia óptima que mejora significativamente la respuesta antitumoral a través del incremento en esta proteína, sentando las bases sobre futuras combinaciones con esta proteína o con fármacos que promuevan su síntesis y potencien sus efectos antitumorales.
6. La terapia antitumoral neoadyuvante no produce alteraciones plasmáticas clínicamente relevantes en los parámetros bioquímicos generales ni en los relacionados con la funcionalidad renal y hepática. Sin embargo, en lo referente al perfil lipídico, la terapia antitumoral altera el metabolismo del colesterol, siendo importante su valoración y normalización con el objetivo de disminuir alteraciones metabólicas severas y recidivas. En lo referente al daño cardiaco, la terapia antitumoral propicia un daño leve o moderado, asociado tanto a la quimioterapia como al tratamiento completo, de carácter reversible, demostrando las notables ventajas de la terapia combinada escogida en este estudio en cuanto a términos de seguridad y eficacia.

CONCLUSIONS

1. Through this study, it is found for the first time in humans that, in neoadjuvant therapy against breast cancer, Hydroxytyrosol not exert clinically relevant effects during chemotherapy based on epirubicin and cyclophosphamide, followed by taxanes, or along the complete antitumor treatment. Antineoplastic therapy itself produces no alterations of oxidative damage to nucleic acids, so that hydroxytyrosol exerts no beneficial effect on oxidative damage in DNA of isolated lymphocytes. Likewise, the Hydroxytyrosol not interfere with purine metabolism or cholesterol and does not significantly change plasma electrolytes and liver enzymes and associated muscle damage. In the same way, although the Hydroxytyrosol produces an overall increase in the antioxidant defence associated with Superoxide dismutase, this increase has no clinical interest because it cannot be associated with a particular time point.
2. Combination therapy with epirubicin may induce a compensation mechanism of the plasma antioxidant system, as happen with the total antioxidant capacity of plasma after administration of epirubicin and cyclophosphamide, in a time-dependent form, in order to counteract the prooxidant effect generated by this group of drugs. This antioxidant compensation mechanism, associated with the combination described, is the indirect causative of reduced plasma isoprostanes levels during neoadjuvant chemotherapy.
3. The levels of free fatty acids and advanced glycation end products have a direct relationship with breast cancer, firstly described by the implementation of this study. This association can be due to a tumour production or to a previous imbalance which finally leads to the development of the disease, because when patients started the study, levels of both variables were statistically higher than those achieved once free of disease. It is thus directly related to the eradication of the tumour after the whole antitumor therapy and not with chemotherapy or surgery. Conversely, the advanced oxidation protein products and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, have an inverse relationship with breast cancer and with the progress of neoadjuvant antitumor therapy, increasing when the tumour is eradicated.
4. Neoadjuvant antitumor therapy disrupts/impairs the antioxidant defence system at different levels. Some of these changes are due to the prooxidant effect of chemotherapeutic agents, as happen with vitamin E which decreases its levels as result of its role as scavenger of free radicals, or as happen with the increase in total antioxidant capacity of plasma as a compensation mechanism to a redox imbalance. However, other modifications are not affected by the chemotherapy, but they are caused by the whole antitumor therapy, as the decline in Superoxide dismutase and catalase activities as an indirect consequence of the restore of redox balance when the tumour is removed.

5. This study describes for the first time, in patients with breast cancer, that the neoadjuvant chemotherapy combination employed causes an increase in plasma levels of Secreted Frizzled-Related Protein 4, associated with a decrease in tumour cell proliferation and increased apoptosis. The combination of epirubicin and cyclophosphamide followed by taxanes, is presented as an optimal therapy that significantly enhances the antitumor response of patients through the increase in this protein, opening new research possibilities for future combinations with this protein or drugs that promote its synthesis and enhance their antitumor effects.

6. Neoadjuvant antitumor therapy does not produce clinically relevant plasma biochemical alterations in the general parameters and those related to kidney and liver function. However, regarding lipid profile, antitumor therapy alters cholesterol metabolism, being therefore very important its valuation and standardization, with the aim of reducing severe metabolic disturbances and recurrences. With respect to heart damage, antitumor therapy favours a mild or moderate reversible damage, associated with both chemotherapy and full treatment, showing the remarkable benefits of combined therapy chosen in this study as to terms of safety and effectiveness.

ANEXOS

ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE

Ensayo Clínico aleatorizado sobre el papel del hidroxitirosol en la modulación del estrés oxidativo en sangre y muestra de tumor de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama

Código del estudio: EC_HT_nQT

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Naturaleza, Importancia e Implicaciones para el donante/paciente

Introducción.

Para que usted pueda decidir si desea participar en el estudio, debe tener conocimiento suficiente de los posibles riesgos y beneficios; este proceso se conoce con el nombre de Consentimiento Informado (CI). Usted sólo debe firmar el CI si ha comprendido en su totalidad la naturaleza y las diferentes etapas del estudio clínico, si consiente en participar y si conoce todos sus derechos y obligaciones como participante en este estudio clínico. Por tanto, le rogamos que se tome el tiempo necesario para leer detenidamente la siguiente información y pregunte con libertad todas las dudas que le surjan.

1. ¿Qué es y qué se persigue con este estudio?

La Unidad de Gestión Clínica (UGC) de Oncología Médica, Anatomía Patológica y la Unidad de Mama del Complejo Hospitalario de Jaén llevarán cabo un estudio de investigación clínica para evaluar la modulación de la expresión génica de marcadores relacionados con el cáncer de mama, estatus oxidativo plasmático y tumoral y perfil lipídico, además de los cambios que se puedan derivar en el tratamiento quimioterapéutico, cirugía, cicatrización y bienestar físico y psicológico de la paciente, tras la ingesta diaria de 15 mg de hidroxitirosol (sustancia con efecto antioxidante proveniente del aceite de oliva).

En las últimas dos décadas ha aumentado enormemente el interés por la relación existente entre la alimentación y la salud. De ahí, la necesidad de realizar estudios de investigación sobre el papel de determinados alimentos que contienen nutrientes o compuestos bioactivos con una capacidad biológica capaz de modular la evolución de determinados procesos fisiopatológicos.

En este estudio se prevé que participen 70 personas, que serán seleccionadas por la UGC de Oncología Médica, diagnosticadas de cáncer de mama y que recibirán tratamiento quimioterapéutico neoadyuvante (previo a la cirugía).

2. Cómo se realiza el estudio.

2.1. Tratamiento que se administra.

En este Ensayo Clínico unos pacientes tomarán 15 mg diarios de hidroxitirosol, extraídos mediante métodos mecánicos y no químicos, directamente del aceite de oliva, mientras que otras pacientes tomarán sólo el excipiente que sirve de base para hacer las cápsulas (placebo). Debe tener muy claro que **ni usted ni el médico** que le proporciona las cápsulas **sabrán** lo que contienen.

La sustancia administrada **NO ES UN FÁRMACO**, sino un suplemento dietético autorizado por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

2.2. Visitas y procedimientos del estudio.

Primera intervención. En la primera visita que tendrá lugar en la consulta de oncología se le informará acerca de la existencia de este ensayo clínico y se le hará entrega de un folleto informativo.

Segunda intervención. En la segunda consulta de Oncología, deberá haber decidido si va a participar o no, y proceder en caso afirmativo a la firma del CI. En caso que decida participar, se le asignará el suplemento dietético o placebo para su toma diaria, se le realizará una analítica sanguínea, una encuesta nutricional y una encuesta de bienestar y salud mental.

Tercera intervención. Tendrá lugar a la mitad del tratamiento neoadyuvante (quinto ciclo de tratamiento), donde se le realizará una analítica sanguínea y encuesta de bienestar y salud mental.

Cuarta intervención. Tendrá lugar el día previo a la cirugía y se le realizará una analítica sanguínea.

Quinta intervención. Tendrá lugar el día posterior a la cirugía donde se le realizará una analítica sanguínea.

Sexta intervención. Tendrá lugar 7 días después de la cirugía, donde se le realizará una analítica sanguínea, una encuesta de bienestar y salud mental y se valorará el progreso de la cicatrización.

Séptima intervención. Es la última intervención y tendrá lugar transcurrido un mes de la cirugía. Se le realizará una última extracción de sangre, una encuesta nutricional y se valorará el progreso de la cicatrización.

Las fechas concertadas para cada visita le serán recordadas por el sistema protocolizado que posee la UGC de Oncología Médica.

3. ¿Cuáles son los beneficios esperables y los riesgos potenciales de este

estudio?

3.1. Beneficios.

Se considera que el consumo de extractos ricos en antioxidantes puede ser beneficioso para usted, ya que estos nutrientes podrían mejorar el tratamiento de distintos tipos de cáncer, como el de mama o colon. Sin embargo, debe saber que es posible no obtener los resultados esperados.

3.2. Riesgos.

Los extractos de hidroxitirosol son extraídos del aceite de oliva, siendo un componente habitual de nuestra dieta. Se han realizado gran cantidad de estudios científicos, tanto en animales como en humanos, que demuestran que su consumo no implica riesgo alguno. Además, la cantidad de antioxidantes que aportan las cápsulas no conllevan ningún riesgo para su salud, ya que la toxicidad asociada a elevadas dosis de antioxidantes solubles en agua es infrecuente al ser excretados rápidamente del organismo.

4. Donación de tejidos y/o células.

El Ensayo Clínico implica la obtención de material biológico; para ello, el Complejo Hospitalario de Jaén dispone de un Banco de Tumores con la finalidad de recoger, procesar y almacenar muestras de tejidos, células y/o fluidos humanos procedentes de pacientes con tumores. Estas muestras constituyen una pieza clave en el desarrollo de la actividad asistencial, docente e investigadora del hospital, pero al mismo tiempo pueden servir para promocionar la investigación oncológica entre hospitales y centros de investigación tanto de ámbito nacional como internacional, en temas tan diversos como la prevención, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. Durante la intervención diagnóstica/quirúrgica/terapéutica a la que ha sido o va a ser sometida, se tomarán muestras de sus tejidos y/o células para el correcto diagnóstico histopatológico de su enfermedad.

Si usted acepta la donación de sus tejidos y/o células sobrantes al Banco de Tumores, debe saber:

- En ningún caso usted recibirá ninguna compensación económica ni otros beneficios por donar sus tejidos y/o células excedentes, sin embargo, si las investigaciones tuvieran éxito, podría ayudar en el futuro a pacientes que padecen la misma enfermedad que usted u otras enfermedades similares
- La donación de sus tejidos y/o células excedentes en ningún caso supondrá un riesgo añadido para su salud.
- Las muestras de los tejidos y/o células no serán vendidos o distribuidos a terceros con fines comerciales.
- Las muestras de sus tejidos y/o células excedentes se conservarán en el Banco de Tumores durante el plazo establecido en la legislación y estarían disponibles para futuras investigaciones relacionadas con el estudio. Si estas futuras investigaciones

incluyen la realización de pruebas adicionales con sus muestras de tejidos y/o células se le **volverá a solicitar un nuevo consentimiento informado.**

- Toda la información sobre sus datos personales y de salud serán incorporados y tratados en una base de datos informatizada del Centro. Toda la información que se obtenga será tratada con carácter confidencial, cumpliendo con las garantías que establece la ley de Protección de Datos de carácter Personal y la legislación sanitaria.
- Asimismo, se le informa que tiene la posibilidad de ejercer los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición al tratamiento de datos de carácter personal, en los términos previstos en la normativa aplicable. Además, la cesión a otros centros de investigación de sus muestras de tejidos y/o células excedentes o de la información contenida en las bases de datos vinculada a las mismas y a su estado de salud, se realizarán mediante un procedimiento de disociación por el que se generará un código de identificación que impida que se le pueda identificar directa o indirectamente. No se transmitirá fuera del Centro ninguna información que pueda identificarle personalmente.
- Si en cualquier momento decidiera revocar el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras de tejidos y/o células que no se hayan utilizado en la investigación, será destruida y no será utilizada en ninguna investigación después de la fecha en que haya retirado su consentimiento, si bien, los datos obtenidos de sus muestras hasta ese momento seguirán formando parte de la investigación.

5. Revisión de Documentos Originales, Confidencialidad y Protección de Datos de Carácter Personal.

Comprende y consiente que con el fin de garantizar la fiabilidad de los datos recogidos en este estudio, será preciso que representantes de los distintas Unidades de Gestión Clínica del Complejo Hospitalario de Jaén, y eventualmente, las Autoridades Sanitarias y/o miembros del Comité Ético de Investigación Clínica, tengan acceso a su historia clínica, comprometiéndose a la más estricta confidencialidad.

De acuerdo con la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, los datos personales que se le requieran serán los estrictamente necesarios para cubrir los objetivos del estudio. En ninguno de los informes del estudio aparecerá su nombre, y su identidad no será revelada a persona alguna salvo para cumplir con los fines del estudio, en caso de urgencia médica o requerimiento legal. Cualquier información de carácter personal que pueda ser identificable será conservada y procesada bajo condiciones de seguridad, con el propósito de determinar los resultados del estudio. Estos podrán ser comunicados a las Autoridades Sanitarias, y eventualmente a la comunidad científica a través de congresos y/o publicaciones.

Si sus datos son utilizados para otros objetivos, primero se disociarán, es decir, toda la información que permita identificarle se eliminará y se procesará de forma que no se pueda conocer su identidad.

Una vez que se conozcan los resultados de este estudio, éstos podrán ser utilizados para redactar un documento relativo a su valor, con fines varios como publicaciones en revistas médicas o presentación en congresos.

Implicaciones para el donante/paciente

La donación / participación es totalmente voluntaria.

- Debe saber que en cualquier momento puede revocar su participación, comunicándose a su médico, sin necesidad de dar ninguna razón. En este caso, se le preguntará si su decisión está relacionada con algún acontecimiento adverso.
- Tanto si no quiere participar como si decide abandonar el estudio, será tratado según la práctica clínica habitual.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.
- Todos los datos de carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.

Riesgos de la investigación para el donante/paciente

No existen riesgos asociados a la inclusión de usted en este Ensayo Clínico. (Explicado anteriormente en el apartado beneficios/riesgos)

CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

< ENSAYO CLÍNICO ALEATORIZADO SOBRE EL PAPEL DEL HIDROXITIRO SOL EN LA MODULACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN SANGRE Y EN MUESTRAS DE TUMOR, DE PACIENTES DIAGNOSTICADAS DE CÁNCER DE MAMA.>

Yo (Nombre y Apellidos):

.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)
- He podido hacer preguntas sobre el estudio < ENSAYO CLÍNICO ALEATORIZADO A TRIPLE CIEGO SOBRE EL PAPEL DEL HIDROXITIRO SOL EN LA MODULACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN SANGRE Y EN MUESTRAS DE TUMOR DE PACIENTES DIAGNÓSTICADAS DE CÁNCER DE MAMA. REPERCUSIÓN EN LA

RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA NEODAYUVANTE, COMPLICACIONES Y BIENESTAR FÍSICO Y MENTAL EN EL COMPLEJO HOSPITALARIO DE JAÉN>.

- He recibido suficiente información sobre el estudio < ENSAYO CLÍNICO ALEATORIZADO A TRIPLE CIEGO SOBRE EL PAPEL DEL HIDROXITIRO SOL EN LA MODULACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN SANGRE Y EN MUESTRAS DE TUMOR DE PACIENTES DIAGNÓSTICADAS DE CÁNCER DE MAMA. REPERCUSIÓN EN LA RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA NEODAYUVANTE, COMPLICACIONES Y BIENESTAR FÍSICO Y MENTAL EN EL COMPLEJO HOSPITALARIO DE JAÉN>. He hablado con el profesional sanitario informador:
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- **Deseo** ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Sí

No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el *proyecto titulado* < ENSAYO CLÍNICO ALEATORIZADO A TRIPLE CIEGO SOBRE EL PAPEL DEL HIDROXITIRO SOL EN LA MODULACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN SANGRE Y EN MUESTRAS DE TUMOR DE PACIENTES DIAGNÓSTICADAS DE CÁNCER DE MAMA. REPERCUSIÓN EN LA RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA NEODAYUVANTE, COMPLICACIONES Y BIENESTAR FÍSICO Y MENTAL EN EL COMPLEJO HOSPITALARIO DE JAÉN>.

Firma del paciente

Firma del profesional

(o representante legal en su caso)

sanitario informador

Nombre y apellidos:.....

Nombre y apellidos:

Fecha:

Fecha:

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.D.A.M. Health, Inc. (1997-2016, 24/02/2014). Examen de deshidrogenasa láctica, 2016, from <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003471.htm>
- Abdel-Salam, Omar M. E., Youness, Eman R., & Hafez, Hafez F. (2011). The antioxidant status of the plasma in patients with breast cancer undergoing chemotherapy. *Open Journal of Molecular and Integrative Physiology*, Vol.01No.03, 7.
- Abe, Riichiro, & Yamagishi, Sho-ichi. (2008). AGE-RAGE system and carcinogenesis. *Current pharmaceutical design*, 14(10), 940-945.
- Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS). Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. (2014, 2014). Ficha técnica Paclitaxel Hospira, from http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/66311/FT_66311.pdf
- Akpek, Mahmut, Ozdogru, Ibrahim, Sahin, Omer, Inanc, Mevlude, Dogan, Ali, Yazici, Cevat, et al. (2015). Protective effects of spironolactone against anthracycline-induced cardiomyopathy. *European journal of heart failure*, 17(1), 81-89.
- Alacacioglu, A., Kebapcilar, L., Onder Pamuk, B., Sop, G., Kucukiravul, C., Bozkaya, G., et al. (2013). Oxidative and antioxidative status after anthracyclinebased chemotherapy in breast cancer patients. *Journal of B U ON : official journal of the Balkan Union of Oncology*, 18(3), 614-618.
- Amadori, D., Milandri, C., Comella, G., Saracchini, S., Salvagni, S., Barone, C., et al. (2011). A phase I/II trial of non-pegylated liposomal doxorubicin, docetaxel and trastuzumab as first-line treatment in HER-2-positive locally advanced or metastatic breast cancer. *European Journal of Cancer*, 47(14), 2091-2098.
- Arbiser, Jack L., Petros, John, Klafter, Robert, Govindajaran, Baskaran, McLaughlin, Elizabeth R., Brown, Lawrence F., et al. (2002). Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), 715-720.
- Arbor Assays, LLC. (2011-2015). DetectX®Superoxide Dismutase (SOD)Colorimetric Activity Kit Protocol Junio 2015. from <http://www.arborassays.com/documentation/inserts/K028-H1.pdf>
- Arbor Assays, LLC. (2012-2015). DetectX®Catalase Colorimetric Activity Kit Protocol, from <http://www.arborassays.com/documentation/inserts/K033-H1.pdf>
- Aunon-Calles, D., Canut, L., & Visioli, F. (2013). Toxicological evaluation of pure hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol*, 55, 498-504.
- Ayyasamy, Vanniarajan, Owens, Kjerstin M., Desouki, Mohamed Mokhtar, Liang, Ping, Bakin, Andrei, Thangaraj, Kumarasamy, et al. (2011). Cellular model of Warburg effect identifies tumor promoting function of UCP2 in breast cancer and its suppression by genipin. *PLoS one*, 6(9), e24792.
- Bajpayee, Mahima, Pandey, Alok Kumar, Parmar, Devendra, Mathur, Neeraj, Seth, Prahlad K., & Dhawan, Alok. (2005). Comet assay responses in human lymphocytes are not influenced by the menstrual cycle: a study in healthy Indian females. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 565(2), 163-172.
- Ballester, M. (1996). [Anti-oxidants, free radicals, and health. A chemical, organic, and physical approach].Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico. *Medicina clinica*, 107(13), 509-515.
- Bartoli, G. M., Giannattasio, B., Palozza, P., & Cittadini, A. (1988). Superoxide dismutase depletion and lipid peroxidation in rat liver microsomal membranes: correlation with liver carcinogenesis. *Biochimica et biophysica acta*, 966(2), 214-221.
- Bayram, Banu, Ozcelik, Beraat, Grimm, Stefanie, Roeder, Thomas, Schrader, Charlotte, Ernst, Insa M. A., et al. (2012). A diet rich in olive oil phenolics reduces oxidative stress in the

- heart of SAMP8 mice by induction of Nrf2-dependent gene expression. *Rejuvenation research*, 15(1), 71-81.
- Beledo, J.F., Simón, J.A.A., & Martínez, Á.M. (2013). *Farmacología humana*: Elsevier Health Sciences Spain.
- Berndt, Theresa, Craig, Theodore A., Bowe, Ann E., Vassiliadis, John, Reczek, David, Finnegan, Richard, et al. (2003). Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent. *The Journal of clinical investigation*, 112(5), 785-794.
- Bernini, R., Gilardini Montani, M. S., Merendino, N., Romani, A., & Velotti, F. (2015). Hydroxytyrosol-Derived Compounds: A Basis for the Creation of New Pharmacological Agents for Cancer Prevention and Therapy. *J Med Chem*.
- Bernini, R., Merendino, N., Romani, A., & Velotti, F. (2013). Naturally occurring hydroxytyrosol: synthesis and anticancer potential. *Current medicinal chemistry*, 20(5), 655-670.
- Bhatti, Parveen, Sigurdson, Alice J., Thomas, Cynthia B., Iwan, Allison, Alexander, Bruce H., Kampa, Diane, et al. (2008). No evidence for differences in DNA damage assessed before and after a cancer diagnosis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 17(4), 990-994.
- Bhuvanalakshmi, G., Arfuso, Frank, Millward, Michael, Dharmarajan, Arun, & Warriar, Sudha. (2015). Secreted frizzled-related protein 4 inhibits glioma stem-like cells by reversing epithelial to mesenchymal transition, inducing apoptosis and decreasing cancer stem cell properties. *PloS one*, 10(6), e0127517.
- Bhuvaramurthy, V., Balasubramanian, N., & Govindasamy, S. (1996). Effect of radiotherapy and chemoradiotherapy on circulating antioxidant system of human uterine cervical carcinoma. *Molecular and cellular biochemistry*, 158(1), 17-23.
- Bicakli, D. H., Varol, U., Degirmenci, M., Tunali, D., Cakar, B., Durusoy, R., et al. (2016). Adjuvant chemotherapy may contribute to an increased risk for metabolic syndrome in patients with breast cancer. *J Oncol Pharm Pract*, 22(1), 46-53.
- Biganzoli, L., Aapro, M., Loibl, Sibylle, Wildiers, Hans, & Brain, Etienne. (2016). Taxanes in the treatment of breast cancer: Have we better defined their role in older patients? A position paper from a SIOG Task Force. *Cancer Treatment Reviews*, 43, 19-26.
- Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., & Saija, A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 51(8), 971-974.
- Bland, K.I., & Copeland, E.M. (2007). *La mama: manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*: Editorial Médica Panamericana.
- Bleiweiss, Ira J. (2013). Pathology of breast cancer, *UpToDate*.
- Bojko, Peter, Schimmel, Gudrun, Bosse, Daniel, & Abenhardt, Wolfgang. (2012). Metronomic oral cyclophosphamide in patients with advanced solid tumors. *Onkologie*, 35(1-2), 35-38.
- Bonadonna, G., Gianni, L., Santoro, A., Bonfante, V., Bidoli, P., Casali, P., et al. (1993). Drugs ten years later: epirubicin. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 4(5), 359-369.
- Bonanni, Bernardo, Puntoni, Matteo, Cazzaniga, Massimiliano, Pruneri, Giancarlo, Serrano, Davide, Guerrieri-Gonzaga, Aliana, et al. (2012). Dual effect of metformin on breast cancer proliferation in a randomized presurgical trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(21), 2593-2600.
- Boskou, D. (2008). *Olive Oil: Minor Constituents and Health*: CRC Press.
- Bottari, Nathieli B., Munhoz, Thiago D., Torbitz, Vanessa D., Tonin, Alexandre A., Anai, Leticia A., Semolin, Livia M. S., et al. (2015). Oxidative stress in dogs with multicentric lymphoma: Effect of chemotherapy on oxidative and antioxidant biomarkers. *Redox report : communications in free radical research*, 20(6), 267-274.

- Bouallagui, Zouhaier, Han, Junkuy, Isoda, Hiroko, & Sayadi, Sami. (2011). Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 49(1), 179-184.
- Briziarelli, Giuliano. (1965). Effects of dosage and time of administration of testosterone propionate on 7,12-dimethylbenzanthracene mammary carcinogenesis in the rat. [journal article]. *Zeitschrift für Krebsforschung*, 66(6), 517-522.
- Brown, N. S., & Bicknell, R. (2001). Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, 3(5), 323-327.
- Byon, Chang Hyun, Hardy, Robert W., Ren, Changchun, Ponnazhagan, Selvarangan, Welch, Danny R., McDonald, Jay M., et al. (2009). Free fatty acids enhance breast cancer cell migration through plasminogen activator inhibitor-1 and SMAD4. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 89(11), 1221-1228.
- Cairns, R. A., Harris, I., McCracken, S., & Mak, T. W. (2011). Cancer cell metabolism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 76, 299-311.
- Calderon-Montano, Jose Manuel, Madrona, Andres, Burgos-Moron, Estefania, Orta, Manuel Luis, Mateos, Santiago, Espartero, Jose Luis, et al. (2013). Selective cytotoxic activity of new lipophilic hydroxytyrosol alkyl ether derivatives. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(21), 5046-5053.
- Calle, Eugenia E., & Kaaks, Rudolf. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature reviews Cancer*, 4(8), 579-591.
- Camargo, Antonio, Ruano, Juan, Fernandez, Juan M., Parnell, Laurence D., Jimenez, Anabel, Santos-Gonzalez, Monica, et al. (2010). Gene expression changes in mononuclear cells in patients with metabolic syndrome after acute intake of phenol-rich virgin olive oil. *BMC genomics*, 11, 253.
- Camps, D. (2010). *Bioquímica del estrés Oxidativo*: Lulu Enterprises Incorporated.
- Capeillere-Blandin, Chantal, Gausson, Valerie, Descamps-Latscha, Beatrice, & Witko-Sarsat, Veronique. (2004). Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. *Biochimica et biophysica acta*, 1689(2), 91-102.
- Carluccio, Maria Annunziata, Siculella, Luisa, Ancora, Maria Assunta, Massaro, Marika, Scoditti, Egeria, Storelli, Carlo, et al. (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(4), 622-629.
- Carmon, Kendra S., & Loose, David S. (2008). Secreted frizzled-related protein 4 regulates two Wnt7a signaling pathways and inhibits proliferation in endometrial cancer cells. *Molecular cancer research : MCR*, 6(6), 1017-1028.
- Castaner, Olga, Covas, Maria-Isabel, Khymenets, Olha, Nyssonen, Kristiina, Konstantinidou, Valentini, Zunft, Hans-Franz, et al. (2012). Protection of LDL from oxidation by olive oil polyphenols is associated with a downregulation of CD40-ligand expression and its downstream products in vivo in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 95(5), 1238-1244.
- Catalan, U., Lopez de Las Hazas, M. C., Rubio, L., Fernandez-Castillejo, S., Pedret, A., de la Torre, R., et al. (2015). Protective effect of hydroxytyrosol and its predominant plasmatic human metabolites against endothelial dysfunction in human aortic endothelial cells. *Mol Nutr Food Res*.
- Cayman Chemical, Company. (2015). DNA/RNA Oxidative Damage ELISA Kit Protocol, from <https://www.caymanchem.com/pdfs/589320.pdf>
- Cell Biolabs, Inc. (2013-2015). Product Manual OxiSelect™ Advanced Glycation End Product (AGE) Competitive ELISA Kit, from <http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-817-advanced-glycation-age-competitive-elisa-kit.pdf>

- Cicerale, Sara, Conlan, Xavier A., Sinclair, Andrew J., & Keast, Russell S. J. (2009). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(3), 218-236.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (1996). Breast cancer and hormonal contraceptives: further results. *Contraception*, 54(3 Suppl), 1S-106S.
- Conklin, K. A. (2004). Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integr Cancer Ther*, 3(4), 294-300.
- Cornwell, David G., & Ma, Jiyan. (2008). Nutritional benefit of olive oil: the biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(19), 8774-8786.
- Covas, Maria-Isabel, de la Torre, Karina, Farre-Albaladejo, Magi, Kaikkonen, Jari, Fito, Montserrat, Lopez-Sabater, Carmen, et al. (2006). Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free radical biology & medicine*, 40(4), 608-616.
- Crisante, F., Taresco, V., Donelli, G., Vuotto, C., Martinelli, A., D'Ilario, L., et al. (2015). Antioxidant Hydroxytyrosol-Based Polyacrylate with Antimicrobial and Antiadhesive Activity Versus Staphylococcus Epidermidis. *Adv Exp Med Biol*.
- Crook, T. R., Souhami, R. L., & McLean, A. E. (1986). Cytotoxicity, DNA cross-linking, and single strand breaks induced by activated cyclophosphamide and acrolein in human leukemia cells. *Cancer research*, 46(10), 5029-5034.
- Chan, S., Davidson, N., Juozaityte, E., Erdkamp, F., Pluzanska, A., Azarnia, N., et al. (2004). Phase III trial of liposomal doxorubicin and cyclophosphamide compared with epirubicin and cyclophosphamide as first-line therapy for metastatic breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 15(10), 1527-1534.
- Chandel, N. S., McClintock, D. S., Feliciano, C. E., Wood, T. M., Melendez, J. A., Rodriguez, A. M., et al. (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. *J Biol Chem*, 275(33), 25130-25138.
- Charles, M. A., Fontbonne, A., Thibult, N., Claude, J. R., Warnet, J. M., Rosselin, G., et al. (2001). High plasma nonesterified fatty acids are predictive of cancer mortality but not of coronary heart disease mortality: results from the Paris Prospective Study. *Am J Epidemiol*, 153(3), 292-298.
- Charoenprasert, Suthawan, & Mitchell, Alyson. (2012). Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(29), 7081-7095.
- Chen, Nianhang, Li, Yan, Ye, Ying, Palmisano, Maria, Chopra, Rajesh, & Zhou, Simon. (2014). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of nab-paclitaxel in patients with solid tumors: disposition kinetics and pharmacology distinct from solvent-based paclitaxel. *Journal of clinical pharmacology*, 54(10), 1097-1107.
- Chen, Sining, & Parmigiani, Giovanni. (2007). Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(11), 1329-1333.
- Chimento, Adele, Casaburi, Ivan, Rosano, Camillo, Avena, Paola, De Luca, Arianna, Campana, Carmela, et al. (2014). Oleuropein and hydroxytyrosol activate GPER/ GPR30-dependent pathways leading to apoptosis of ER-negative SKBR3 breast cancer cells. *Molecular nutrition & food research*, 58(3), 478-489.
- Cho, Sung-Hee, Choi, Man Ho, Lee, Won-Yong, & Chung, Bong Chul. (2009). Evaluation of urinary nucleosides in breast cancer patients before and after tumor removal. *Clinical biochemistry*, 42(6), 540-543.
- Chow, Louis W. C., Tung, Stewart Y., Ng, Ting-Ying, Im, Seock-Ah, Lee, Min-Hyuk, Yip, Adrian Y. S., et al. (2013). Concurrent celecoxib with 5-fluorouracil/epirubicin/cyclophosphamide

- followed by docetaxel for stages II - III invasive breast cancer: the OOTR-N001 study. *Expert opinion on investigational drugs*, 22(3), 299-307.
- Christian, Mildred S., Sharper, Valerie A., Hoberman, Alan M., Seng, John E., Fu, Lijie, Covell, Donna, et al. (2004). The toxicity profile of hydrolyzed aqueous olive pulp extract. *Drug and chemical toxicology*, 27(4), 309-330.
- Chu, Fong-Fong, Esworthy, R. Steven, Chu, Peiguo G., Longmate, Jeffrey A., Huycke, Mark M., Wilczynski, Sharon, et al. (2004). Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes. *Cancer research*, 64(3), 962-968.
- D'Angelo, S., Manna, C., Migliardi, V., Mazzoni, O., Morrica, P., Capasso, G., et al. (2001). Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 29(11), 1492-1498.
- Dai, Q., & Zhu, X. (2009). F2-isoprostanes and Metabolite, and Breast Cancer Risk. *N Am J Med Sci (Boston)*, 2(3), 106-108.
- Danelisen, Igor, Palace, Vince, Lou, Huiquan, & Singal, Pawan K. (2002). Maintenance of myocardial levels of vitamin A in heart failure due to adriamycin. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 34(7), 789-795.
- de Azambuja, E., Cardoso, F., de Castro, G., Jr., Colozza, M., Mano, M. S., Durbecq, V., et al. (2007). Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *British journal of cancer*, 96(10), 1504-1513.
- de Bock, Martin, Derraik, Jose G. B., Brennan, Christine M., Biggs, Janene B., Morgan, Philip E., Hodgkinson, Steven C., et al. (2013). Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. *PLoS one*, 8(3), e57622.
- de Bock, Martin, Thorstensen, Eric B., Derraik, Jose G. B., Henderson, Harold V., Hofman, Paul L., & Cutfield, Wayne S. (2013). Human absorption and metabolism of oleuropein and hydroxytyrosol ingested as olive (*Olea europaea* L.) leaf extract. *Molecular nutrition & food research*, 57(11), 2079-2085.
- de Haas, Esther C., Oosting, Sjoukje F., Lefrandt, Joop D., Wolffenbuttel, Bruce Hr, Sleijfer, Dirk Th, & Gietema, Jourik A. (2010). The metabolic syndrome in cancer survivors. *The Lancet Oncology*, 11(2), 193-203.
- de la Torre, R. (2008). Bioavailability of olive oil phenolic compounds in humans. *Inflammopharmacology*, 16(5), 245-247.
- de la Torre, R., Covas, M. I., Pujadas, M. A., Fito, M., & Farre, M. (2006). Is dopamine behind the health benefits of red wine? *Eur J Nutr*, 45(5), 307-310.
- de Roos, Baukje, Zhang, Xuguang, Rodriguez Gutierrez, Guillermo, Wood, Sharon, Rucklidge, Garry J., Reid, Martin D., et al. (2011). Anti-platelet effects of olive oil extract: in vitro functional and proteomic studies. *European journal of nutrition*, 50(7), 553-562.
- Dell'Agli, Mario, Maschi, Omar, Galli, Germana V., Fagnani, Rossana, Dal Cero, Esther, Caruso, Donatella, et al. (2008). Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase. *The British journal of nutrition*, 99(5), 945-951.
- Della Ragione, Fulvio, Cucciolla, Valeria, Criniti, Vittoria, Indaco, Stefania, Borriello, Adriana, & Zappia, Vincenzo. (2002). Antioxidants induce different phenotypes by a distinct modulation of signal transduction. *FEBS letters*, 532(3), 289-294.
- Desai, Neil, Trieu, Vuong, Yao, Zhiwen, Louie, Leslie, Ci, Sherry, Yang, Andrew, et al. (2006). Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(4), 1317-1324.
- Devi, P Uma. (2004). Basics of carcinogenesis. *Health administrator*, 17(1), 16-24.

- DeVita, V.T., Lawrence, T.S., & Rosenberg, S.A. (2008). *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology*: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- Devlin, T.M. (2004). *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*: Reverté.
- Dhalla, N. S., Temsah, R. M., & Netticadan, T. (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of hypertension*, 18(6), 655-673.
- Diaz-Castro, Javier, Florido, Jesus, Kajarabille, Naroa, Prados, Sonia, de Paco, Catalina, Ocon, Olga, et al. (2015). A new approach to oxidative stress and inflammatory signaling during labour in healthy mothers and neonates. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015, 178536.
- Dieli-Conwright, Christina M., Mortimer, Joanne E., Schroeder, E. Todd, Courneya, Kerry, Demark-Wahnefried, Wendy, Buchanan, Thomas A., et al. (2014). Randomized controlled trial to evaluate the effects of combined progressive exercise on metabolic syndrome in breast cancer survivors: rationale, design, and methods. *BMC cancer*, 14, 238.
- Dimopoulos, M. A., Deliveliotis, C., Mouloupoulos, L. A., Papadimitriou, C., Mitropoulos, D., Anagnostopoulos, A., et al. (1998). Treatment of patients with metastatic urothelial carcinoma and impaired renal function with single-agent docetaxel. *Urology*, 52(1), 56-60.
- Dittrich, C., Petruzelka, L., Vodvarka, P., Gneist, M., Janku, F., Kysela, T., et al. (2006). A phase I study of pemetrexed (ALIMTA) and cyclophosphamide in patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*, 12(23), 7071-7078.
- Dominguez-Perles, R., Aunon, D., Ferreres, F., & Gil-Izquierdo, A. (2015). Gender differences in plasma and urine metabolites from Sprague-Dawley rats after oral administration of normal and high doses of hydroxytyrosol, hydroxytyrosol acetate, and DOPAC. *Eur J Nutr*.
- Droge, Wulf. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
- EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), "anti-inflammatory properties" (ID 1882), "contributes to the upper respiratory tract health" (ID 3468), "can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract" (3779), and "contributes to body defences against external agents" (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9(4), 25.
- Elejalde Guerra, J.I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18(6).
- Ellis, M. E., Weiss, R. B., Korzun, A. H., Rice, M. A., Norton, L., Perloff, M., et al. (1986). Hyperglycemic complications associated with adjuvant chemotherapy of breast cancer. A cancer and leukemia group B (CALGB) study. *American journal of clinical oncology*, 9(6), 533-536.
- Engstrom, M. J., Opdahl, S., Hagen, A. I., Romundstad, P. R., Akhlen, L. A., Haugen, O. A., et al. (2013). Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 140(3), 463-473.
- Erhola, M., Kellokumpu-Lehtinen, P., Metsa-Ketela, T., Alanko, K., & Nieminen, M. M. (1996). Effects of anthracyclin-based chemotherapy on total plasma antioxidant capacity in small cell lung cancer patients. *Free radical biology & medicine*, 21(3), 383-390.
- Erman, Mustafa, Baltali, Esmen, Karaoglu, Aziz, Abali, Huseyin, Engin, Huseyin, Ozisik, Yavuz, et al. (2005). A phase II study on the safety and efficacy of 5-fluorouracil, epirubicin,

- cyclophosphamide (FEC) followed by paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. *Cancer investigation*, 23(3), 215-221.
- Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Rosignoli, P., Servili, M., Montedoro, G. F., & Morozzi, G. (2002). Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 11(4), 351-358.
- Fabiani, Roberto, Rosignoli, Patrizia, De Bartolomeo, Angelo, Fucelli, Raffaella, & Morozzi, Guido. (2008). 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. *The Journal of nutrition*, 138(1), 42-48.
- Farhangkhoe, Hana, Khan, Zia A., Mukherjee, Suranjana, Cukiernik, Mark, Barbin, Yousef P., Karmazyn, Morris, et al. (2003). Heme oxygenase in diabetes-induced oxidative stress in the heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 35(12), 1439-1448.
- Fentiman, I. S., & Allen, D. S. (2010). gamma-Glutamyl transferase and breast cancer risk. *British journal of cancer*, 103(1), 90-93.
- Fernandez-Avila, C., Montes, R., Castellote, A. I., Chisaguano, A. M., Fito, M., Covas, M. I., et al. (2015). Fast determination of virgin olive oil phenolic metabolites in human high-density lipoproteins. *Biomedical chromatography : BMC*, 29(7), 1035-1041.
- Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., García-Parrilla, M. C., Puertas, B., & Cantos-Villar, E. (2012). Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry*, 130(4), 797-813.
- Findlay, B., Tonkin, K., Crump, M., Norris, B., Trudeau, M., Blackstein, M., et al. (2007). A dose escalation trial of adjuvant cyclophosphamide and epirubicin in combination with 5-fluorouracil using G-CSF support for premenopausal women with breast cancer involving four or more positive nodes. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 18(10), 1646-1651.
- Finsterer, Josef, & Ohnsorge, Peter. (2013). Influence of mitochondrion-toxic agents on the cardiovascular system. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 67(3), 434-445.
- Fito, M., Cladellas, M., de la Torre, R., Marti, J., Munoz, D., Schroder, H., et al. (2008). Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: a randomized, crossover, controlled trial. *European journal of clinical nutrition*, 62(4), 570-574.
- Florescu, Maria, Magda, Lucia Stefania, Enescu, Oana Aurelia, Jinga, Dan, & Vinereanu, Dragos. (2014). Early detection of epirubicin-induced cardiotoxicity in patients with breast cancer. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography*, 27(1), 83-92.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine*, 285(21), 1182-1186.
- Fontham, Elizabeth T. H. (2008). *Cancer Epidemiology and Prevention*. Third Edition: Edited by David Schottenfeld and Joseph F. Fraumeni, Jr. *American Journal of Epidemiology*, 168(4), 469.
- Ford, Caroline E., Jary, Eve, Ma, Sean Si Qian, Nixdorf, Sheri, Heinzelmann-Schwarz, Viola A., & Ward, Robyn L. (2013). The Wnt gatekeeper SFRP4 modulates EMT, cell migration and downstream Wnt signalling in serous ovarian cancer cells. *PloS one*, 8(1), e54362.
- Foster, D., Spruill, L., Walter, K. R., Nogueira, L. M., Fedarovich, H., Turner, R. Y., et al. (2014). AGE metabolites: a biomarker linked to cancer disparity? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 23(10), 2186-2191.
- Fukuhara, Ken, Kariya, Masatoshi, Kita, Masato, Shime, Hiroaki, Kanamori, Takanobu, Kosaka, Chika, et al. (2002). Secreted frizzled related protein 1 is overexpressed in uterine leiomyomas, associated with a high estrogenic environment and unrelated to

- proliferative activity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(4), 1729-1736.
- Fumoleau, P., Roche, H., Kerbrat, P., Bonneterre, J., Romestaing, P., Fargeot, P., et al. (2006). Long-term cardiac toxicity after adjuvant epirubicin-based chemotherapy in early breast cancer: French Adjuvant Study Group results. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 17(1), 85-92.
- Galceran, Jaume; Ameijide, Alberto; Carulla, Marià; Mateos, Antonio; Quirós, José Ramón; Alemán, Araceli; Rojas, Dolores; Torrella, Ana; Chico, Matilde; Vicente, Marisa; Díaz, José María; Larrañaga, Nerea; Marcos-Gragera, Rafael; Sánchez, María José; Perucha, Josefina; Ramos, Maria; Navarro, Carmen; Ardanaz, Eva; Bigorra, Jàmnica; Rodrigo, Pilar; Peris Bonet, Rafael. (2014, 2014). Estimaciones de la incidencia y la supervivencia del cáncer en España y su situación en Europa, 2016, from file:///C:/Users/Mario/Desktop/444_Estimaciones_Incidencia_y_Supervi_Cancer_en_Espa_na_2014_DEF_DEF.pdf
- Galetta, Fabio, Franzoni, Ferdinando, Cervetti, Giulia, Regoli, Francesco, Fallahi, Poupak, Tocchini, Leonardo, et al. (2010). In vitro and in vivo study on the antioxidant activity of dexrazoxane. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 64(4), 259-263.
- Galluzzi, Lorenzo, Senovilla, Laura, Zitvogel, Laurence, & Kroemer, Guido. (2012). The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nature reviews Drug discovery*, 11(3), 215-233.
- Garwood, Elisabeth R., Kumar, Anjali S., Baehner, Frederick L., Moore, Dan H., Au, Alfred, Hylton, Nola, et al. (2010). Fluvastatin reduces proliferation and increases apoptosis in women with high grade breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 119(1), 137-144.
- Ge, Yingzi, Domschke, Christoph, Stoiber, Natalija, Schott, Sarah, Heil, Joerg, Rom, Joachim, et al. (2012). Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 61(3), 353-362.
- Gherzi, Davina, Willson, Melina L., Chan, Matthew Ming Ki, Simes, John, Donoghue, Emma, & Wilcken, Nicholas. (2015). Taxane-containing regimens for metastatic breast cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*, 6, CD003366.
- GLOBOCAM, IARC;. (2012, 2014). ESTIMATED INCIDENCE BY AGE, SPAIN - FEMALE, from http://globocan.iarc.fr/old/age-specific_table_r.asp?selection=182724&title=Spain&sex=2&type=0&stat=0&window=1&sort=0&submit=%C2%A0Execute
- Godoy-Caballero, M. P., Acedo-Valenzuela, M. I., & Galeano-Diaz, T. (2012). Simple quantification of phenolic compounds present in the minor fraction of virgin olive oil by LC-DAD-FLD. *Talanta*, 101, 479-487.
- Goldman, R. D., Kaplan, N. O., & Hall, T. C. (1964). LACTIC DEHYDROGENASE IN HUMAN NEOPLASTIC TISSUES. *Cancer research*, 24, 389-399.
- Gong, Y., Dou, L. J., & Liang, J. (2014). Link between obesity and cancer: role of triglyceride/free fatty acid cycling. *European review for medical and pharmacological sciences*, 18(19), 2808-2820.
- Gonzalez-Santiago, M., Martin-Bautista, E., Carrero, J. J., Fonolla, J., Baro, L., Bartolome, M. V., et al. (2006). 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*, 188(1), 35-42.
- Goodwin, Pamela J., Parulekar, Wendy R., Gelmon, Karen A., Shepherd, Lois E., Ligibel, Jennifer A., Hershman, Dawn L., et al. (2015). Effect of Metformin vs Placebo on Weight and Metabolic Factors in NCIC CTG MA.32. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(3).

- Gorlach, A. (2009). Regulation of HIF-1alpha at the transcriptional level. *Curr Pharm Des*, 15(33), 3844-3852.
- Gradishar, William J., Tjulandin, Sergei, Davidson, Neville, Shaw, Heather, Desai, Neil, Bhar, Paul, et al. (2005). Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(31), 7794-7803.
- Granados-Principal, S., El-Azem, N., Pamplona, R., Ramirez-Tortosa, C., Pulido-Moran, M., Vera-Ramirez, L., et al. (2014). Hydroxytyrosol ameliorates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with breast cancer. *Biochem Pharmacol*, 90(1), 25-33.
- Granados-Principal, Sergio, El-Azem, Nuri, Pamplona, Reinald, Ramirez-Tortosa, Cesar, Pulido-Moran, Mario, Vera-Ramirez, Laura, et al. (2014). Hydroxytyrosol ameliorates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with breast cancer. *Biochemical pharmacology*, 90(1), 25-33.
- Granados-Principal, Sergio, Quiles, Jose L., Ramirez-Tortosa, Cesar, Camacho-Corencia, Pedro, Sanchez-Rovira, Pedro, Vera-Ramirez, Laura, et al. (2011). Hydroxytyrosol inhibits growth and cell proliferation and promotes high expression of sfrp4 in rat mammary tumours. *Molecular nutrition & food research*, 55 Suppl 1, S117-126.
- Granados-Principal, Sergio, Quiles, Jose L., Ramirez-Tortosa, Cesar L., Ochoa-Herrera, Julio, Perez-Lopez, Patricia, Pulido-Moran, Mario, et al. (2012). Squalene ameliorates atherosclerotic lesions through the reduction of CD36 scavenger receptor expression in macrophages. *Molecular nutrition & food research*, 56(5), 733-740.
- Granados-Principal, Sergio, Quiles, Jose L., Ramirez-Tortosa, Cesar L., Sanchez-Rovira, Pedro, & Ramirez-Tortosa, M. Carmen. (2010). Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutrition reviews*, 68(4), 191-206.
- Grote, Verena A., Nieters, Alexandra, Kaaks, Rudolf, Tjonneland, Anne, Roswall, Nina, Overvad, Kim, et al. (2012). The associations of advanced glycation end products and its soluble receptor with pancreatic cancer risk: a case-control study within the prospective EPIC Cohort. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 21(4), 619-628.
- Grune, T., Reinheckel, T., & Davies, K. J. (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11(7), 526-534.
- Guinan, E., Hussey, J., Broderick, J. M., Lithander, F. E., O'Donnell, D., Kennedy, M. J., et al. (2013). The effect of aerobic exercise on metabolic and inflammatory markers in breast cancer survivors--a pilot study. *Support Care Cancer*, 21(7), 1983-1992.
- Gupta, Sapna, Tandon, V. R., Kapoor, B., Gupta, A., Gupta, G. D., & Khajuria, V. (2006). Effects of tamoxifen therapy on plasma lipid profile in patients of breast cancer. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 54, 183-186.
- Guyton, K. Z., & Kensler, T. W. (1993). Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Br Med Bull*, 49(3), 523-544.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (2006). *Free Radicals in Biology and Medicine* (4th ed.). Oxford: Clarendon Press.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 35(Pt 5), 1147-1150.
- Han, Junkyu, Talorete, Terence P. N., Yamada, Parida, & Isoda, Hiroko. (2009). Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology*, 59(1), 45-53.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, Douglas, & Weinberg, Robert A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.

- Hashimoto, Tsuneichi, Ibi, Masakazu, Matsuno, Kuniharu, Nakashima, Shingo, Tanigawa, Toru, Yoshikawa, Toshikazu, et al. (2004). An endogenous metabolite of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylethanol, acts as a unique cytoprotective agent against oxidative stress-induced injury. *Free radical biology & medicine*, 36(5), 555-564.
- He, Biao, Lee, Amie Y., Dadfarmay, Sina, You, Liang, Xu, Zhidong, Reguart, Noemi, et al. (2005). Secreted frizzled-related protein 4 is silenced by hypermethylation and induces apoptosis in beta-catenin-deficient human mesothelioma cells. *Cancer research*, 65(3), 743-748.
- Head, E., Liu, J., Hagen, T. M., Muggenburg, B. A., Milgram, N. W., Ames, B. N., et al. (2002). Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. *Journal of neurochemistry*, 82(2), 375-381.
- Hecht, Fabio, Pessoa, Carolina F., Gentile, Luciana B., Rosenthal, Doris, Carvalho, Denise P., & Fortunato, Rodrigo S. (2016). The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. [journal article]. *Tumor Biology*, 1-11.
- Heilman, Jacqueline, Anyangwe, Njwen, Tran, Nga, Edwards, James, Beilstein, Paul, & Lopez, Jose. (2015). Toxicological evaluation of an olive extract, H35: Subchronic toxicity in the rat. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 84, 18-28.
- Herrera, A. C. S. A., Panis, C., Victorino, V. J., Campos, F. C., Colado-Simao, A. N., Cecchini, A. L., et al. (2012). Molecular subtype is determinant on inflammatory status and immunological profile from invasive breast cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 61(11), 2193-2201.
- Herrera, Ana Cristina S., Victorino, Vanessa J., Campos, Fernanda C., Verenitach, Beatriz D., Lemos, Lauana T., Aranome, Adriano M. F., et al. (2014). Impact of tumor removal on the systemic oxidative profile of patients with breast cancer discloses lipid peroxidation at diagnosis as a putative marker of disease recurrence. *Clinical breast cancer*, 14(6), 451-459.
- Hewitt, Maria, Rowland, Julia H., & Yancik, Rosemary. (2003). Cancer survivors in the United States: age, health, and disability. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*, 58(1), 82-91.
- Hirvikoski, P. P., Kumpulainen, E. J., & Johansson, R. T. (1997). Hepatic toxicity caused by adjuvant CMF/CNF in breast cancer patients and reversal by tamoxifen. *Breast cancer research and treatment*, 44(3), 269-274.
- Horimoto, Yoshiya, Arakawa, Atsushi, Tanabe, Masahiko, Sonoue, Hiroshi, Igari, Fumie, Senuma, Koji, et al. (2014). Ki67 expression and the effect of neo-adjuvant chemotherapy on luminal HER2-negative breast cancer. *BMC cancer*, 14, 550.
- Hortobagyi, G. N., Yap, H. Y., Kau, S. W., Fraschini, G., Ewer, M. S., Chawla, S. P., et al. (1989). A comparative study of doxorubicin and epirubicin in patients with metastatic breast cancer. *American journal of clinical oncology*, 12(1), 57-62.
- Horton, N. D., Mamiya, B. M., & Kehr, J. P. (1997). Relationships between cell density, glutathione and proliferation of A549 human lung adenocarcinoma cells treated with acrolein. *Toxicology*, 122(1-2), 111-122.
- Horvath, L. G., Henshall, S. M., Kench, J. G., Saunders, D. N., Lee, C. S., Golovsky, D., et al. (2004). Membranous expression of secreted frizzled-related protein 4 predicts for good prognosis in localized prostate cancer and inhibits PC3 cellular proliferation in vitro. *Clin Cancer Res*, 10(2), 615-625.
- Horvath, Lisa G., Lelliott, Jayne E., Kench, James G., Lee, C. Soon, Williams, Elizabeth D., Saunders, Darren N., et al. (2007). Secreted frizzled-related protein 4 inhibits proliferation and metastatic potential in prostate cancer. *The Prostate*, 67(10), 1081-1090.
- Hristozov, D., Gadjeva, V., Vlaykova, T., & Dimitrov, G. (2001). Evaluation of oxidative stress in patients with cancer. *Archives of physiology and biochemistry*, 109(4), 331-336.

- Hrzenjak, Anđelko, Tipl, Michaela, Kremser, Marie-Luise, Strohmeier, Bettina, Guelly, Christian, Neumeister, Doris, et al. (2004). Inverse correlation of secreted frizzled-related protein 4 and beta-catenin expression in endometrial stromal sarcomas. *The Journal of pathology*, 204(1), 19-27.
- Hsu, T. C., Young, M. R., Cmarik, J., & Colburn, N. H. (2000). Activator protein 1 (AP-1)- and nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med*, 28(9), 1338-1348.
- Hwang, Eun-Sun, & Bowen, Phyllis E. (2007). DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: its measurement and modulation by diet and environment. *Critical reviews in food science and nutrition*, 47(1), 27-50.
- Il'yasova, Dora, Kennedy, Kelly, Spasojevic, Ivan, Wang, Frances, Tolun, Advije A., Base, Karel, et al. (2011). Individual responses to chemotherapy-induced oxidative stress. *Breast cancer research and treatment*, 125(2), 583-589.
- Il'yasova, Dora, Spasojevic, Ivan, Wang, Frances, Tolun, Advije A., Base, Karel, Young, Sarah P., et al. (2010). Urinary biomarkers of oxidative status in a clinical model of oxidative assault. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 19(6), 1506-1510.
- Imbesi, Selene, Musolino, Caterina, Allegra, Alessandro, Saija, Antonella, Morabito, Fortunato, Calapai, Gioacchino, et al. (2013). Oxidative stress in oncohematologic diseases: an update. *Expert review of hematology*, 6(3), 317-325.
- Irigoyen, M. A., Garcia, F. V., Iturriagagoitia, A. C., Beroiz, B. I., Martinez, M. S., & Guillen Grima, F. (2011). [Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics]. *An Sist Sanit Navar*, 34(2), 219-233.
- Ishii, K., Zhen, L. X., Wang, D. H., Funamori, Y., Ogawa, K., & Taketa, K. (1996). Prevention of mammary tumorigenesis in acatalasemic mice by vitamin E supplementation. *Japanese journal of cancer research : Gann*, 87(7), 680-684.
- Ishizuna, Kazuo, Ninomiya, Jun, Ogawa, Toshihisa, & Tsuji, Eiichi. (2014). Hepatotoxicity induced by trastuzumab used for breast cancer adjuvant therapy: a case report. *Journal of medical case reports*, 8, 417.
- Italian Multicentre Breast Study with Epirubicin, Ambrosini, G., Balli, M., Garusi, G., Demicheli, R., Jirillo, A., et al. (1988). Phase III randomized study of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide v fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in advanced breast cancer: an Italian multicentre trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 6(6), 976-982.
- Jackson, A. L., & Loeb, L. A. (2001). The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res*, 477(1-2), 7-21.
- Jacob, Francis, Ukegjini, Kristjan, Nixdorf, Sheri, Ford, Caroline E., Olivier, Jake, Caduff, Rosmarie, et al. (2012). Loss of secreted frizzled-related protein 4 correlates with an aggressive phenotype and predicts poor outcome in ovarian cancer patients. *PloS one*, 7(2), e31885.
- Jakobsen, P., Steiness, E., Bastholt, L., Dalmark, M., Lorenzen, A., Petersen, D., et al. (1991). Multiple-dose pharmacokinetics of epirubicin at four different dose levels: studies in patients with metastatic breast cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 28(1), 63-68.
- Javier Arias, María Ángeles Aller, José Ignacio Arias, Laureano Lorente. (1999). *Fisiopatología quirúrgica: traumatismos, infecciones, tumores*: Tebar.
- Jiao, Li, Weinstein, Stephanie J., Albanes, Demetrius, Taylor, Philip R., Graubard, Barry I., Virtamo, Jarmo, et al. (2011). Evidence that serum levels of the soluble receptor for advanced glycation end products are inversely associated with pancreatic cancer risk: a prospective study. *Cancer research*, 71(10), 3582-3589.

- Jones, Stephen, Holmes, Frankie Ann, O'Shaughnessy, Joyce, Blum, Joanne L., Vukelja, Svetislava J., McIntyre, Kristi J., et al. (2009). Docetaxel With Cyclophosphamide Is Associated With an Overall Survival Benefit Compared With Doxorubicin and Cyclophosphamide: 7-Year Follow-Up of US Oncology Research Trial 9735. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(8), 1177-1183.
- Kailajarvi, M., Ahokoski, O., Virtanen, A., Salminen, E., & Irjala, K. (2000). Alterations in laboratory test results during adjuvant breast cancer treatment. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, 38(5), 443-451.
- Kalinsky, Kevin, Crew, Katherine D., Refice, Susan, Xiao, Tong, Wang, Antai, Feldman, Sheldon M., et al. (2014). Presurgical trial of metformin in overweight and obese patients with newly diagnosed breast cancer. *Cancer investigation*, 32(4), 150-157.
- Kaneda, Hideaki, Taguchi, Junichi, Ogasawara, Ken, Aizawa, Tadanori, & Ohno, Minoru. (2002). Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 162(1), 221-225.
- Karim, Rooshdiya, Tse, Gary, Putti, Thomas, Scolyer, Richard, & Lee, Soon. (2004). The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers. *Pathology*, 36(2), 120-128.
- Kasapovic, Jelena, Pejic, Snezana, Stojiljkovic, Vesna, Todorovic, Ana, Radosevic-Jelic, Ljiljana, Saicic, Zorica S., et al. (2010). Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages after chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide. *Clinical biochemistry*, 43(16-17), 1287-1293.
- Kasapovic, Jelena, Pejic, Snezana, Todorovic, Ana, Stojiljkovic, Vesna, & Pajovic, Snezana B. (2008). Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages. *Cell biochemistry and function*, 26(6), 723-730.
- Kaufmann, Manfred, von Minckwitz, Gunter, Smith, Roy, Valero, Vicente, Gianni, Luca, Eiermann, Wolfgang, et al. (2003). International expert panel on the use of primary (preoperative) systemic treatment of operable breast cancer: review and recommendations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(13), 2600-2608.
- Kawano, Yoshiaki, & Kypta, Robert. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *Journal of cell science*, 116(Pt 13), 2627-2634.
- Kedzierska, Magdalena, Glowacki, Rafal, Czernek, Urszula, Szydłowska-Pazera, Katarzyna, Potemski, Piotr, Piekarski, Janusz, et al. (2013). Changes in plasma thiol levels induced by different phases of treatment in breast cancer; the role of commercial extract from black chokeberry. *Molecular and cellular biochemistry*, 372(1-2), 47-55.
- Kedzierska, Magdalena, Olas, Beata, Wachowicz, Barbara, Jeziorski, Arkadiusz, & Piekarski, Janusz. (2010). The lipid peroxidation in breast cancer patients. *General physiology and biophysics*, 29(2), 208-210.
- Keinan-Boker, Lital, Bueno De Mesquita, H. Bas, Kaaks, Rudolf, Van Gils, Carla H., Van Noord, Paul A. H., Rinaldi, Sabina, et al. (2003). Circulating levels of insulin-like growth factor I, its binding proteins -1,-2, -3, C-peptide and risk of postmenopausal breast cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 106(1), 90-95.
- Khasraw, Mustafa, Bell, Richard, & Dang, Chau. (2012). Epirubicin: Is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. *The Breast*, 21(2), 142-149.
- Khayyal, M. T., el-Ghazaly, M. A., Abdallah, D. M., Nassar, N. N., Okpanyi, S. N., & Kreuter, M. H. (2002). Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME induced hypertension in rats. *Arzneimittelforschung*, 52(11), 797-802.
- Kilic, Nedret, Yavuz Taslipinar, Mine, Guney, Yildiz, Tekin, Ercument, & Onuk, Erhan. (2014). An investigation into the serum thioredoxin, superoxide dismutase, malondialdehyde, and advanced oxidation protein products in patients with breast cancer. *Annals of surgical oncology*, 21(13), 4139-4143.

- Killeen, M. J., Linder, M., Pontoniere, P., & Crea, R. (2014). NF-kappabeta signaling and chronic inflammatory diseases: exploring the potential of natural products to drive new therapeutic opportunities. *Drug Discov Today*, 19(4), 373-378.
- Kim, Sung-Bae, Kok, Yau Tsz, Thuan, Tran Van, Chao, Tsu-Yi, & Shen, Zhen Zhou. (2015). Safety Results of Docetaxel-(Taxotere)-Based Chemotherapy in Early Breast Cancer Patients of Asia-Pacific Region: Asia-Pacific Breast Initiative II. *Journal of breast cancer*, 18(4), 356-364.
- Kim, Woo Young, Woo, Sang Uk, Seo, Jae Hong, Son, Gil Soo, Lee, Jae Bok, & Bae, Jeoung Won. (2011). Toxicities, dose reduction and delay of docetaxel and paclitaxel chemotherapy in breast cancer without distant metastases. *Journal of cancer research and therapeutics*, 7(4), 412-415.
- King, M. C., Go, R. C., Elston, R. C., Lynch, H. T., & Petrakis, N. L. (1980). Allele increasing susceptibility to human breast cancer may be linked to the glutamate-pyruvate transaminase locus. *Science (New York, N Y)*, 208(4442), 406-408.
- Kinoshita, Anna, Wanibuchi, Hideki, Imaoka, Susumu, Ogawa, Motome, Masuda, Chikayoshi, Morimura, Keiichirou, et al. (2002). Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine and cell-cycle arrest in the rat liver via generation of oxidative stress by phenobarbital: association with expression profiles of p21(WAF1/Cip1), cyclin D1 and Ogg1. *Carcinogenesis*, 23(2), 341-349.
- Kirkland, David, Edwards, James, Woehrle, Tina, & Beilstein, Paul. (2015). Investigations into the genotoxic potential of olive extracts. *Mutation research Genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 777, 17-28.
- Klaunig, J. E., Wang, Z., Pu, X., & Zhou, S. (2011). Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 254(2), 86-99.
- Klaunig, James E., & Kamendulis, Lisa M. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 44, 239-267.
- Klaunig, James E., Kamendulis, Lisa M., & Hocevar, Barbara A. (2010). Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic pathology*, 38(1), 96-109.
- Kleinfeld, Alan M., & Okada, Clifford. (2005). Free fatty acid release from human breast cancer tissue inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated killing. *Journal of lipid research*, 46(9), 1983-1990.
- Koo, Kyung Ah, Kim, Seung Hyun, Oh, Tae Hwan, & Kim, Young Choong. (2006). Acteoside and its aglycones protect primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced excitotoxicity. *Life sciences*, 79(7), 709-716.
- Kosova, Funda, Cetin, Bahadir, Akinci, Melih, Aslan, Sabahattin, Ari, Zeki, Sepici, Aylin, et al. (2007). Advanced oxidation protein products, ferrous oxidation in xylenol orange, and malondialdehyde levels in thyroid cancer. *Annals of surgical oncology*, 14(9), 2616-2620.
- Kountouri, A. M., Mylona, A., Kaliora, A. C., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): impact on plasma antioxidant status in humans. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 14(10), 659-667.
- Kratz, Alexander, Ferraro, Maryjane, Sluss, Patrick M., & Lewandrowski, Kent B. (2004). Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Laboratory reference values. *The New England journal of medicine*, 351(15), 1548-1563.
- Kuo, H. W., Chou, S. Y., Hu, T. W., Wu, F. Y., & Chen, D. J. (2007). Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and genetic polymorphisms in breast cancer patients. *Mutat Res*, 631(1), 62-68.
- Kyriazis, Joannis D., Aligiannis, Nektarios, Polychronopoulos, Panagiotis, Skaltsounis, Alexios-Leandros, & Dotsika, Eleni. (2013). Leishmanicidal activity assessment of olive tree

- extracts. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 20(3-4), 275-281.
- Lam, S. W., Jimenez, C. R., & Boven, E. (2014). Breast cancer classification by proteomic technologies: current state of knowledge. *Cancer Treat Rev*, 40(1), 129-138.
- Larroquette, C. A., Hortobagyi, G. N., Buzdar, A. U., & Holmes, F. A. (1986). Subclinical hepatic toxicity during combination chemotherapy for breast cancer. *Jama*, 256(21), 2988-2990.
- Laurent, Alexis, Nicco, Carole, Chereau, Christiane, Goulvestre, Claire, Alexandre, Jerome, Alves, Arnaud, et al. (2005). Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer research*, 65(3), 948-956.
- Leger, C. L., Carbonneau, M. A., Michel, F., Mas, E., Monnier, L., Cristol, J. P., et al. (2005). A thromboxane effect of a hydroxytyrosol-rich olive oil wastewater extract in patients with uncomplicated type I diabetes. *European journal of clinical nutrition*, 59(5), 727-730.
- Lemos, L. G. T., Victorino, V. J., Herrera, A. C. S. A., Aranome, A. M. F., Cecchini, A. L., Simao, A. N. C., et al. (2015). Trastuzumab-based chemotherapy modulates systemic redox homeostasis in women with HER2-positive breast cancer. *International immunopharmacology*, 27(1), 8-14.
- Li, Yao-Ping, Tian, Fu-Guo, Shi, Peng-Cheng, Guo, Ling-Yun, Wu, Hai-Ming, Chen, Run-Qi, et al. (2014). 4-Hydroxynonenal promotes growth and angiogenesis of breast cancer cells through HIF-1alpha stabilization. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 15(23), 10151-10156.
- Lichtman, S. M., Hurria, A., Cirrincione, C. T., Seidman, A. D., Winer, E., Hudis, C., et al. (2012). Paclitaxel efficacy and toxicity in older women with metastatic breast cancer: combined analysis of CALGB 9342 and 9840. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 23(3), 632-638.
- Liu, Fang, Qu, Hua, Li, Yingjie, Tang, Qian, Yang, Zesong, Wang, Hang, et al. (2015). Relationship between serum secreted frizzled-related protein 4 levels and the first-phase of glucose-stimulated insulin secretion in individuals with different glucose tolerance. *Endocrine journal*, 62(8), 733-740.
- Liu, Xiaoan, Meng, Qing H., Ye, Yuanqing, Hildebrandt, Michelle A. T., Gu, Jian, & Wu, Xifeng. (2015). Prognostic significance of pretreatment serum levels of albumin, LDH and total bilirubin in patients with non-metastatic breast cancer. *Carcinogenesis*, 36(2), 243-248.
- Liu, Zhengtao, Ning, Huaijun, Que, Shuping, Wang, Linlin, Qin, Xue, & Peng, Tao. (2014). Complex association between alanine aminotransferase activity and mortality in general population: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *PLoS one*, 9(3), e91410.
- Lockyer, Stacey, Corona, Giulia, Yaqoob, Parveen, Spencer, Jeremy P. E., & Rowland, Ian. (2015). Secoiridoids delivered as olive leaf extract induce acute improvements in human vascular function and reduction of an inflammatory cytokine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *The British journal of nutrition*, 114(1), 75-83.
- Loong, Herbert H., Chan, Alvita C. Y., & Wong, Ashley C. Y. (2016). Evolving Evidence of the Efficacy and Safety of nab-Paclitaxel in the Treatment of Cancers with Squamous Histologies. *Journal of Cancer*, 7(3), 268-275.
- Lord, Christopher J., & Ashworth, Alan. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, 481(7381), 287-294.
- Lox, C., Ronaghan, C., & Cobos, E. (1998). Blood chemistry profiles in menopausal women administered tamoxifen for breast cancer. *General pharmacology*, 30(1), 121-124.
- Luck, H. J., Thomssen, C., du Bois, A., Lisboa, B. W., Untch, M., Kuhnle, H., et al. (1997). Preliminary results of a phase II study of epirubicin and paclitaxel as first-line

- treatment in patients with metastatic breast cancer. *Seminars in oncology*, 24(1 Suppl 3), S13-16.
- Mª del Carmen Ramirez-Tortose, Mario Pulido-Moran, Sergio Granados, Jose J. Gaforio and Jose L. Quiles. (2014). Hydroxytyrosol as a Component of the Mediterranean Diet and Its Role in Disease Prevention. In V.R. Watson Preedy, R.R. (Ed.), *The Mediterranean Diet: An Evidence-Based Approach* (Vol. 1, pp. 205-215): Elsevier Science.
- Madian, Ashraf G., Diaz-Maldonado, Naomi, Gao, Qiang, & Regnier, Fred E. (2011). Oxidative stress induced carbonylation in human plasma. *Journal of proteomics*, 74(11), 2395-2416.
- Madondo, Mutsa Tatenda, Quinn, Michael, & Plebanski, Magdalena. (2016). Low dose cyclophosphamide: Mechanisms of T cell modulation. *Cancer treatment reviews*, 42, 3-9.
- Malin, Alecia, Dai, Qi, Yu, Herbert, Shu, Xiao-Ou, Jin, Fan, Gao, Yu-Tang, et al. (2004). Evaluation of the synergistic effect of insulin resistance and insulin-like growth factors on the risk of breast carcinoma. *Cancer*, 100(4), 694-700.
- Malins, D. C., & Haimanot, R. (1991). Major alterations in the nucleotide structure of DNA in cancer of the female breast. *Cancer research*, 51(19), 5430-5432.
- Malins, D. C., Holmes, E. H., Polissar, N. L., & Gunselman, S. J. (1993). The etiology of breast cancer. Characteristic alteration in hydroxyl radical-induced DNA base lesions during oncogenesis with potential for evaluating incidence risk. *Cancer*, 71(10), 3036-3043.
- Manach, Claudine, Scalbert, Augustin, Morand, Christine, Remesy, Christian, & Jimenez, Liliانا. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
- Manna, C., Della Ragione, F., Cucciolla, V., Borriello, A., D'Angelo, S., Galletti, P., et al. (1999). Biological effects of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil endowed with antioxidant activity. *Adv Exp Med Biol*, 472, 115-130.
- Manna, C., Galletti, P., Maisto, G., Cucciolla, V., D'Angelo, S., & Zappia, V. (2000). Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS letters*, 470(3), 341-344.
- Mannello, F., Tonti, G. A., Pagliarani, S., Benedetti, S., Canestrari, F., Zhu, W., et al. (2007). The 8-epimer of prostaglandin F(2alpha), a marker of lipid peroxidation and oxidative stress, is decreased in the nipple aspirate fluid of women with breast cancer. *Int J Cancer*, 120(9), 1971-1976.
- Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation research*, 424(1-2), 83-95.
- Marrugat, Jaume, Covas, Maria-Isabel, Fito, Montserrat, Schroder, Helmut, Miro-Casas, Elisabet, Gimeno, Eva, et al. (2004). Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation--a randomized controlled trial. *European journal of nutrition*, 43(3), 140-147.
- Mateos, R., Pereira-Caro, G., Saha, S., Cert, R., Redondo-Horcajo, M., Bravo, L., et al. (2011). Acetylation of hydroxytyrosol enhances its transport across differentiated Caco-2 cell monolayers. *Food Chemistry*, 125(3), 865-872.
- Matsui, A., Ikeda, T., Enomoto, K., Hosoda, K., Nakashima, H., Omae, K., et al. (2000). Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer letters*, 151(1), 87-95.
- Medina, Eduardo, Brenes, Manuel, Romero, Concepcion, Garcia, Aranzazu, & de Castro, Antonio. (2007). Main antimicrobial compounds in table olives. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(24), 9817-9823.
- Medina, Eduardo, de Castro, Antonio, Romero, Concepcion, & Brenes, Manuel. (2006). Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant

- oils: correlation with antimicrobial activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(14), 4954-4961.
- Mehrabi, Sharifeh, Partridge, Edward E., Seffens, William, Yao, Xuebiao, & Aikhionbare, Felix O. (2014). Oxidatively modified proteins in the serous subtype of ovarian carcinoma. *BioMed research international*, 2014, 585083.
- Mejía, G.Á., & Ramelli, M.Á. (2006). *Interpretación clínica del laboratorio*: Editorial Medica Panamericana Sa de.
- Mencalha, Andre, Victorino, Vanessa Jacob, Cecchini, Rubens, & Panis, Carolina. (2014). Mapping oxidative changes in breast cancer: understanding the basic to reach the clinics. *Anticancer research*, 34(3), 1127-1140.
- Menendez, J. A., del Mar Barbacid, M., Montero, S., Sevilla, E., Escrich, E., Solanas, M., et al. (2001). Effects of gamma-linolenic acid and oleic acid on paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 37(3), 402-413.
- Menendez, Javier A., Vazquez-Martin, Alejandro, Colomer, Ramon, Brunet, Joan, Carrasco-Pancorbo, Alegria, Garcia-Villalba, Rocio, et al. (2007). Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC cancer*, 7, 80.
- Menendez, Javier A., Vazquez-Martin, Alejandro, Oliveras-Ferraros, Cristina, Garcia-Villalba, Rocio, Carrasco-Pancorbo, Alegria, Fernandez-Gutierrez, Alberto, et al. (2008). Analyzing effects of extra-virgin olive oil polyphenols on breast cancer-associated fatty acid synthase protein expression using reverse-phase protein microarrays. *International journal of molecular medicine*, 22(4), 433-439.
- Milanowska, Kaja, Krwawicz, Joanna, Papaj, Grzegorz, Kosinski, Jan, Poleszak, Katarzyna, Lesiak, Justyna, et al. (2011). REPAIRtoire--a database of DNA repair pathways. *Nucleic acids research*, 39(Database issue), D788-792.
- Miller, B.F., & Keane, C.B. (1996). *Miller/Keane diccionario enciclopédico de enfermería*: Médica Panamericana.
- Minuti, Lucio, Pellegrino, Roberto Maria, & Tesei, Ilaria. (2006). Simple extraction method and gas chromatography-mass spectrometry in the selective ion monitoring mode for the determination of phenols in wine. *Journal of chromatography A*, 1114(2), 263-268.
- Mizejewski, G. J. (1999). Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N Y)*, 222(2), 124-138.
- Modica-Napolitano, Josephine S., & Singh, Keshav K. (2004). Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion*, 4(5-6), 755-762.
- Morillas-Ruiz, Juana María. (2010). *Los antioxidantes en la prevención del estrés oxidativo en la actividad física* (Vol. 1). Spain: Editorial Planeta.
- Morita, Hirohiko, Ikeda, Hisao, Haramaki, Nobuya, Eguchi, Hiroyuki, & Imaizumi, Tsutomu. (2005). Only two-week smoking cessation improves platelet aggregability and intraplatelet redox imbalance of long-term smokers. *Journal of the American College of Cardiology*, 45(4), 589-594.
- Mozaffarieh, M., Schoetzau, A., Sauter, M., Grieshaber, M., Orgul, S., Golubnitschaja, O., et al. (2008). Comet assay analysis of single-stranded DNA breaks in circulating leukocytes of glaucoma patients. *Molecular vision*, 14, 1584-1588.
- Muller, J. M., Cahill, M. A., Rupec, R. A., Baeuerle, P. A., & Nordheim, A. (1997). Antioxidants as well as oxidants activate c-fos via Ras-dependent activation of extracellular-signal-regulated kinase 2 and Elk-1. *Eur J Biochem*, 244(1), 45-52.
- Munzone, Elisabetta, & Colleoni, Marco. (2015). Clinical overview of metronomic chemotherapy in breast cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, 12(11), 631-644.

- Musarrat, J., Arezina-Wilson, J., & Wani, A. A. (1996). Prognostic and aetiological relevance of 8-hydroxyguanosine in human breast carcinogenesis. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 32A(7), 1209-1214.
- Nagai, H., Noguchi, T., Takeda, K., & Ichijo, H. (2007). Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J Biochem Mol Biol*, 40(1), 1-6.
- Nagashima, M., Tsuda, H., Takenoshita, S., Nagamachi, Y., Hirohashi, S., Yokota, J., et al. (1995). 8-hydroxydeoxyguanosine levels in DNA of human breast cancer are not significantly different from those of non-cancerous breast tissues by the HPLC-ECD method. *Cancer Lett*, 90(2), 157-162.
- National Cancer Institute. (2016, 2015). Dictionary of cancer and diseases, 2016, from <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>
- National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, & Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. (2002). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, 106(25), 3143-3421.
- Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L., & Matrisian, L. M. (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(5), 1135-1149.
- Neumann, Carola A., Krause, Daniela S., Carman, Christopher V., Das, Shampa, Dubey, Devendra P., Abraham, Jennifer L., et al. (2003). Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature*, 424(6948), 561-565.
- Niraula, Saroj, Dowling, Ryan J. O., Ennis, Marguerite, Chang, Martin C., Done, Susan J., Hood, Nicky, et al. (2012). Metformin in early breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study. *Breast cancer research and treatment*, 135(3), 821-830.
- Nishida, Naoyo, Yano, Hirohisa, Nishida, Takashi, Kamura, Toshiharu, & Kojiro, Masamichi. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management*, 2(3), 213-219.
- Nourazarian, Ali Reza, Kangari, Parisa, & Salmaninejad, Arash. (2014). Roles of oxidative stress in the development and progression of breast cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 15(12), 4745-4751.
- Nunez Martin, C., Ortiz de Apodaca, A., Abbad Echevarria, C., & Fernandez Rodriguez, E. (1995). [Serum levels of vitamin A (retinol), vitamin E (alpha-tocopherol), cholesterol and triglycerides in women with breast cancer. The relationship to some food habits].
- Niveles sericos de vitamina A (retinol), vitamina E (alfa-tocoferol) colesterol y trigliceridos en mujeres con cancer de mama. Relacion con algunos habitos alimentarios. *Nutricion hospitalaria*, 10(2), 104-109.
- Olier Gárate, C; Jara Sánchez, C; Romero Laorden, N; Moreno Elola-Olaso, C; Nogales Escoriza, R.M. (2009). Epidemiología y factores pronósticos del cáncer de mama. *Revisiones en cáncer*, 23(1), 1-9.
- Olive, Peggy L., & Banath, Judit P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature protocols*, 1(1), 23-29.
- Oliveras-Lopez, Maria-Jesus, Molina, Jose Joaquin Muros, Mir, Marina Villalon, Rey, Encarnacion Fontao, Martin, Francisco, & de la Serrana, Herminia Lopez-Garcia. (2013). Extra virgin olive oil (EVOO) consumption and antioxidant status in healthy institutionalized elderly humans. *Archives of gerontology and geriatrics*, 57(2), 234-242.
- Osawa, T., Davies, D., & Hartley, J. A. (2011). Mechanism of cell death resulting from DNA interstrand cross-linking in mammalian cells. *Cell death & disease*, 2, e187.

- Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalter, B., & Bartsch, H. (2000). Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical chemistry*, 46(7), 976-988.
- Pai, V. B., & Nahata, M. C. (2000). Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug safety*, 22(4), 263-302.
- Panal Cusati, Mariana, Herrera de la Muela, María, Hardisson Hernaez, David, Choqueneira Dionisio, Milagros, Román Guindo, Ana, & de Santiago Garcia, Francisco Javier. (2014). Correlación entre la expresión de Ki67 con factores clásicos pronósticos y predictivos en el cáncer de mama precoz. [10.1016/j.senol.2014.07.005]. *Revista de Senología y Patología Mamaria*, 27(04), 163-169.
- Pande, Deepti, Negi, Reena, Karki, Kanchan, Khanna, Seema, Khanna, Ranjana S., & Khanna, H. D. (2012). Oxidative damage markers as possible discriminatory biomarkers in breast carcinoma. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 160(6), 411-418.
- Panis, C., Herrera, A. C., Victorino, V. J., Campos, F. C., Freitas, L. F., De Rossi, T., et al. (2012). Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*, 133(1), 89-97.
- Panis, C., Victorino, V. J., Herrera, A. C. S. A., Freitas, L. F., De Rossi, T., Campos, F. C., et al. (2012). Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 133(3), 881-888.
- Pavri, R. S., Gupta, A. D., Baxi, A. J., & Advani, S. H. (1983). Further evidence for oxidative damage to hemoglobin and red cell membrane in leukemia. *Leukemia research*, 7(6), 729-733.
- Payne, Judith K. (2002). The trajectory of fatigue in adult patients with breast and ovarian cancer receiving chemotherapy. *Oncology nursing forum*, 29(9), 1334-1340.
- Payne, Judith K., Held, Joanne, Thorpe, Josh, & Shaw, Heather. (2008). Effect of exercise on biomarkers, fatigue, sleep disturbances, and depressive symptoms in older women with breast cancer receiving hormonal therapy. *Oncology nursing forum*, 35(4), 635-642.
- Perez-Mana, Clara, Farre, Magi, Pujadas, Mitona, Mustata, Cristina, Menoyo, Esther, Pastor, Antoni, et al. (2015). Ethanol induces hydroxytyrosol formation in humans. *Pharmacological research*, 95-96, 27-33.
- Portakal, O., Ozkaya, O., Erden Inal, M., Bozan, B., Kosan, M., & Sayek, I. (2000). Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. *Clinical biochemistry*, 33(4), 279-284.
- Potischman, N., Byers, T., Houghton, L., Root, M., Nemoto, T., & Campbell, T. C. (1992). Effects of breast cancer treatments on plasma nutrient levels: implications for epidemiological studies. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 1(7), 555-559.
- Procopio, A., Alcaro, S., Nardi, M., Oliverio, M., Ortuso, F., Sacchetta, P., et al. (2009). Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of oleuropein and its semisynthetic derivatives as cyclooxygenase inhibitors. *J Agric Food Chem*, 57(23), 11161-11167.
- Pryor, W. A. (2000). Forum on oxidative stress status (OSS) and its measurement. *Free Radic Biol Med*, 29(5), 387.
- Quintela-Fandino, M., Urruticoechea, A., Guerra, J., Gil, M., Gonzalez-Martin, A., Marquez, R., et al. (2014). Phase I clinical trial of nintedanib plus paclitaxel in early HER-2-negative breast cancer (CNIO-BR-01-2010/GEICAM-2010-10 study). *British journal of cancer*, 111(6), 1060-1064.

- Quirantes-Pine, R., Zurek, G., Barrajon-Catalan, E., BaSsmann, C., Micol, V., Segura-Carretero, A., et al. (2013). A metabolite-profiling approach to assess the uptake and metabolism of phenolic compounds from olive leaves in SKBR3 cells by HPLC-ESI-QTOF-MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 72, 121-126.
- Rabbani, Azra, Finn, Ron M., & Ausio, Juan. (2005). The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 27(1), 50-56.
- Rafehi, Haloom, Smith, Andrea J., Balcerczyk, Aneta, Ziemann, Mark, Ooi, Jenny, Loveridge, Shanon J., et al. (2012). Investigation into the biological properties of the olive polyphenol, hydroxytyrosol: mechanistic insights by genome-wide mRNA-Seq analysis. *Genes & nutrition*, 7(2), 343-355.
- Rajneesh, C. P., Manimaran, A., Sasikala, K. R., & Adaikappan, P. (2008). Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. *Singapore medical journal*, 49(8), 640-643.
- Ramanujan, V. Krishnan. (2014). Metabolic imaging in multiple time scales. *Methods (San Diego, Calif)*, 66(2), 222-229.
- Ramirez-Exposito, M. J., Sanchez-Lopez, E., Cueto-Urena, C., Duenas, B., Carrera-Gonzalez, P., Navarro-Cecilia, J., et al. (2014). Circulating oxidative stress parameters in pre- and post-menopausal healthy women and in women suffering from breast cancer treated or not with neoadjuvant chemotherapy. *Exp Gerontol*, 58, 34-42.
- Ramirez-Tortosa, M. Carmen, Granados, Sergio, Ramirez-Tortosa, Cesar L., Ochoa, Julio J., Camacho, Pedro, Garcia-Valdes, Luz, et al. (2008). Oxidative stress status in liver mitochondria and lymphocyte DNA damage of atherosclerotic rabbits supplemented with water soluble coenzyme Q10. *BioFactors (Oxford, England)*, 32(1-4), 263-273.
- Ramirez-Tortose MC, Pulido Moran M, Granados S, Gaforio JJ and Quiles JL. (2014). Hydroxytyrosol as a Component of the Mediterranean Diet and Its Role in Disease Prevention. In V.R. Watson Preedy, R.R. (Ed.), *The Mediterranean Diet: An Evidence-Based Approach* (Vol. 1, pp. 205-215): Elsevier Science.
- Ray, Paul D., Huang, Bo-Wen, & Tsuji, Yoshiaki. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*, 24(5), 981-990.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology & medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Reeves, G. K., Pirie, K., Green, J., Bull, D., Beral, V., Million Women Study, Collaborators, et al. (2009). Reproductive factors and specific histological types of breast cancer: prospective study and meta-analysis. *British journal of cancer*, 100(3), 538-544.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*, 49(11), 1603-1616.
- Richard, Nathalie, Arnold, Sabine, Hoeller, Ulrich, Kilpert, Claus, Wertz, Karin, & Schwager, Joseph. (2011). Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages. *Planta medica*, 77(17), 1890-1897.
- Rios-Arrabal, Sandra, Artacho-Cordon, Francisco, Leon, Josefa, Roman-Marinetto, Elisa, Del Mar Salinas-Asensio, Maria, Calvente, Irene, et al. (2013). Involvement of free radicals in breast cancer. *SpringerPlus*, 2, 404.
- Rivera, Miguel, Roselló-Lletí, Esther, García de Burgos, Fernando, Bertomeu, Vicente, Payá, Rafael, Cortés, Raquel, et al. (2006). Valores de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina y de peroxidación lipídica en pacientes con insuficiencia cardiaca. [10.1157/13095783]. *Revista Española de Cardiología*, 59(11), 1140-1145.

- Rodriguez-Morato, Jose, Xicota, Laura, Fito, Montse, Farre, Magi, Dierssen, Mara, & de la Torre, Rafael. (2015). Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *20*(3), 4655-4680.
- Roowi, Suri, Mullen, William, Edwards, Christine A., & Crozier, Alan. (2009). Yoghurt impacts on the excretion of phenolic acids derived from colonic breakdown of orange juice flavanones in humans. *Molecular nutrition & food research*, *53 Suppl 1*, S68-75.
- Rosignoli, P., Fuccelli, R., Sepporta, M. V., & Fabiani, R. (2015). In vitro chemo-preventive activities of hydroxytyrosol: the main phenolic compound present in extra-virgin olive oil. *Food Funct.*
- Rosignoli, Patrizia, Fuccelli, Raffaella, Sepporta, Maria Vittoria, & Fabiani, Roberto. (2016). In vitro chemo-preventive activities of hydroxytyrosol: the main phenolic compound present in extra-virgin olive oil. *Food & function*, *7*(1), 301-307.
- Rossner, Pavel, Jr., Terry, Mary Beth, Gammon, Marilie D., Agrawal, Meenakshi, Zhang, Fang Fang, Ferris, Jennifer S., et al. (2007). Plasma protein carbonyl levels and breast cancer risk. *Journal of cellular and molecular medicine*, *11*(5), 1138-1148.
- Rowinsky, E. K., & Donehower, R. C. (1995). Paclitaxel (taxol). *The New England journal of medicine*, *332*(15), 1004-1014.
- Roy, Anjana, Sen, Subhrojit, & Chakraborti, Abhay Sankar. (2004). In vitro nonenzymatic glycation enhances the role of myoglobin as a source of oxidative stress. *Free radical research*, *38*(2), 139-146.
- Ruano, Juan, Lopez-Miranda, Jose, de la Torre, Rafael, Delgado-Lista, Javier, Fernandez, Javier, Caballero, Javier, et al. (2007). Intake of phenol-rich virgin olive oil improves the postprandial prothrombotic profile in hypercholesterolemic patients. *The American journal of clinical nutrition*, *86*(2), 341-346.
- Rubio, Laura, Valls, Rosa- M., Macia, Alba, Pedret, Anna, Giralt, Montse, Romero, Maria-Paz, et al. (2012). Impact of olive oil phenolic concentration on human plasmatic phenolic metabolites. *Food chemistry*, *135*(4), 2922-2929.
- Russo, J., Tay, L. K., & Russo, I. H. (1982). Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast cancer research and treatment*, *2*(1), 5-73.
- Rzymowska, J. (1999). Effect of cytotoxic chemotherapy on serum lipid levels in breast cancer patients. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, *67*(3), 129-132.
- Saarto, T., Blomqvist, C., Ehnholm, C., Taskinen, M. R., & Elomaa, I. (1996). Effects of chemotherapy-induced castration on serum lipids and apoproteins in premenopausal women with node-positive breast cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *81*(12), 4453-4457.
- Sachdev, Jasjit C., & Jahanzeb, Mohammad. (2016). Use of Cytotoxic Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer: Putting Taxanes in Perspective. *Clinical Breast Cancer*, *16*(2), 73-81.
- Sagara, Yoshiaki, Sato, Kazuhiko, Fukuma, Eisuke, Higaki, Kenji, Mizutani, Mitsuhiro, Osaki, Akihiko, et al. (2013). The efficacy and safety of FSK0808, filgrastim biosimilar: a multicenter, non-randomized study in Japanese patients with breast cancer. *Japanese journal of clinical oncology*, *43*(9), 865-873.
- Samuels, Noah, Schiff, Elad, & Ben-Arye, Eran. (2014). Non-herbal nutritional supplements for symptom relief in adjuvant breast cancer: creating a doctor-patient dialogue. *BMJ supportive & palliative care*, *4*(3), e1.
- Sanchez-Munoz, Alfonso, Plata-Fernandez, Yessica Maria, Fernandez, Margarita, Jaen-Morago, Ana, Fernandez-Navarro, Monica, de la Torre-Cabrera, Capilla, et al. (2013). The role of immunohistochemistry in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy: an old tool with an enduring prognostic value. *Clinical breast cancer*, *13*(2), 146-152.

- Sander, Christina S., Chang, Hong, Hamm, Florian, Elsner, Peter, & Thiele, Jens J. (2004). Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *International journal of dermatology*, 43(5), 326-335.
- Saran, Uttara, Arfuso, Frank, Zeps, Nikolajs, & Dharmarajan, Arunasalam. (2012). Secreted frizzled-related protein 4 expression is positively associated with responsiveness to cisplatin of ovarian cancer cell lines in vitro and with lower tumour grade in mucinous ovarian cancers. *BMC cell biology*, 13, 25.
- Schaffer, Sebastian, Muller, Walter E., & Eckert, Gunter P. (2010). Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. *Pharmacological research*, 62(4), 322-327.
- Seeliger, Barbara, Wilop, Stefan, Osieka, Rainhardt, Galm, Oliver, & Jost, Edgar. (2009). CpG island methylation patterns in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 50(3), 419-426.
- Sener, Derya Erten, Gonenc, Aymelek, Akinci, Melih, & Torun, Meral. (2007). Lipid peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer. *Cell biochemistry and function*, 25(4), 377-382.
- Sentman, Marie-Louise, Granstrom, Micael, Jakobson, Hakan, Reaume, Andrew, Basu, Samar, & Marklund, Stefan L. (2006). Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry*, 281(11), 6904-6909.
- Serra, A., Rubio, L., Borrás, X., Macià, A., Romero, M. P., & Motilva, M. J. (2012). Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Mol Nutr Food Res*, 56(3), 486-496.
- Sessa, C., Perotti, A., Noberasco, C., De Braud, F., Gallerani, E., Cresta, S., et al. (2009). Phase I clinical and pharmacokinetic study of trabectedin and doxorubicin in advanced soft tissue sarcoma and breast cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 45(7), 1153-1161.
- Shacter, E., Williams, J. A., Hinson, R. M., Senturker, S., & Lee, Y. J. (2000). Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy: inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis. *Blood*, 96(1), 307-313.
- Shao, Y., Pardini, L., & Pardini, R. S. (1995). Dietary menhaden oil enhances mitomycin C antitumor activity toward human mammary carcinoma MX-1. *Lipids*, 30(11), 1035-1045.
- Sharma, Monika, Tuaine, Jo, McLaren, Blair, Waters, Debra L., Black, Katherine, Jones, Lynnette M., et al. (2016). Chemotherapy Agents Alter Plasma Lipids in Breast Cancer Patients and Show Differential Effects on Lipid Metabolism Genes in Liver Cells. *PloS one*, 11(1), e0148049.
- Shi, Fei, Nie, Ben, Gan, Wei, Zhou, Xiao-Yang, Takagi, Yasumitsu, Hayakawa, Hiroshi, et al. (2012). Oxidative damage of DNA, RNA and their metabolites in leukocytes, plasma and urine of *Macaca mulatta*: 8-oxoguanosine in urine is a useful marker for aging. *Free radical research*, 46(9), 1093-1098.
- Sigurdson, Alice J., Hauptmann, Michael, Alexander, Bruce H., Doody, Michele Morin, Thomas, Cynthia B., Struewing, Jeffery P., et al. (2005). DNA damage among thyroid cancer and multiple cancer cases, controls, and long-lived individuals. *Mutation research*, 586(2), 173-188.
- Singh, Gurpreet, Maulik, Sk, Jaiswal, Amardeep, Kumar, Pratik, & Parshad, Rajinder. (2010). Effect on Antioxidant Levels in Patients of Breast Carcinoma during Neoadjuvant Chemotherapy and Mastectomy. *The Malaysian journal of medical sciences : MJMS*, 17(2), 24-28.
- Singh, R., Barden, A., Mori, T., & Beilin, L. (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 44(2), 129-146.

- Sirianni, Rosa, Chimento, Adele, De Luca, Arianna, Casaburi, Ivan, Rizza, Pietro, Onofrio, Arianna, et al. (2010). Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Molecular nutrition & food research*, 54(6), 833-840.
- Soni, M. G., Burdock, G. A., Christian, M. S., Bitler, C. M., & Crea, R. (2006). Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 44(7), 903-915.
- Sosa, Venus, Moline, Teresa, Somoza, Rosa, Paciucci, Rosanna, Kondoh, Hiroshi, & Lleonart, Matilde E. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing research reviews*, 12(1), 376-390.
- Staudigl, Christine, Concin, Nicole, Grimm, Christoph, Pfeiler, Georg, Nehoda, Regina, Singer, Christian F., et al. (2015). Prognostic relevance of pretherapeutic gamma-glutamyltransferase in patients with primary metastatic breast cancer. *PloS one*, 10(4), e0125317.
- Stoll, B. A. (2002). Upper abdominal obesity, insulin resistance and breast cancer risk. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*, 26(6), 747-753.
- Stoll, Basil A. (2002). N-3 fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. *The British journal of nutrition*, 87(3), 193-198.
- Stone, James R., & Yang, Suping. (2006). Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxidants & redox signaling*, 8(3-4), 243-270.
- Storz, P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci*, 10, 1881-1896.
- Strasak, Alexander M., Pfeiffer, Ruth M., Klenk, Jochen, Hilbe, Wolfgang, Oberaigner, Willi, Gregory, Martin, et al. (2008). Prospective study of the association of gamma-glutamyltransferase with cancer incidence in women. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 123(8), 1902-1906.
- Suarez, Manuel, Romero, Maria-Paz, Macia, Alba, Valls, Rosa M., Fernandez, Sara, Sola, Rosa, et al. (2009). Improved method for identifying and quantifying olive oil phenolic compounds and their metabolites in human plasma by microelution solid-phase extraction plate and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 877(32), 4097-4106.
- Suarez, Manuel, Valls, Rosa M., Romero, Maria-Paz, Macia, Alba, Fernandez, Sara, Giralt, Montse, et al. (2011). Bioavailability of phenols from a phenol-enriched olive oil. *The British journal of nutrition*, 106(11), 1691-1701.
- Subramaniam, S, Shyama, S, Jagadeesan, M, & Shyamala Devi, CS. (1993). Oxidant and antioxidant levels in the erythrocytes of breast cancer patients treated with CMF. *Medical science research*, 21(2), 79-80.
- Subramaniam, S., Marar, T., & Devi, C. S. (1991). Studies on the changes in plasma lipids and lipoproteins in CMF treated breast cancer patients. *Biochemistry international*, 24(6), 1015-1024.
- Subramaniam, S., Subramaniam, S., & Shyamala Devi, C. S. (1994). Erythrocyte antioxidant enzyme activity in CMF treated breast cancer patients. *Cancer biochemistry biophysics*, 14(3), 177-182.
- Suhail, N., Bilal, N., Khan, H. Y., Hasan, S., Sharma, S., Khan, F., et al. (2012). Effect of vitamins C and E on antioxidant status of breast-cancer patients undergoing chemotherapy. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 37(1), 22-26.
- Tabin, C. J., Bradley, S. M., Bargmann, C. I., Weinberg, R. A., Papageorge, A. G., Scolnick, E. M., et al. (1982). Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature*, 300(5888), 143-149.

- Takeda, Ryuji, Koike, Taisuke, Taniguchi, Itaru, & Tanaka, Keiko. (2013). Double-blind placebo-controlled trial of hydroxytyrosol of *Olea europaea* on pain in gonarthrosis. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 20(10), 861-864.
- Tanel, Andre, & Averill-Bates, Diana A. (2007). Inhibition of acrolein-induced apoptosis by the antioxidant N-acetylcysteine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 321(1), 73-83.
- Tejerina, F. (1992). *Cirugía del cáncer de mama*: Díaz de Santos.
- ten Tije, Albert J., Verweij, Jaap, Loos, Walter J., & Sparreboom, Alex. (2003). Pharmacological effects of formulation vehicles : implications for cancer chemotherapy. *Clinical pharmacokinetics*, 42(7), 665-685.
- Terenius, L. (1971). Effect of anti-oestrogens on initiation of mammary cancer in the female rat. *European journal of cancer*, 7(1), 65-70.
- Tesarova, P., Kalousova, M., Trnkova, B., Soukupova, J., Argalasova, S., Mestek, O., et al. (2007). Carbonyl and oxidative stress in patients with breast cancer--is there a relation to the stage of the disease? *Neoplasma*, 54(3), 219-224.
- Thompson, A. M., & Moulder-Thompson, S. L. (2012). Neoadjuvant treatment of breast cancer. *Annals of Oncology*, 23(suppl 10), x231-x236.
- Thurmond, Portia, Yang, Jing-Hua, Li, Yedan, Lerner, Lori B., & Azadzoj, Kazem M. (2015). Structural modifications of the prostate in hypoxia, oxidative stress, and chronic ischemia. *Korean journal of urology*, 56(3), 187-196.
- Trosko, J. E., Chang, C. C., Upham, B. L., & Tai, M. H. (2005). The role of human adult stem cells and cell-cell communication in cancer chemoprevention and chemotherapy strategies. *Mutat Res*, 591(1-2), 187-197.
- Trosko, James E., Chang, Chia-Cheng, Madhukar, Burra V., & Dupont, Emmanuel. (1995). Intercellular Communication: A Paradigm for the Interpretation of the Initiation/Promotion/Progression Model of Carcinogenesis. In Joseph C Arcos, Mary F Argus & Yin-tak Woo (Eds.), *Chemical Induction of Cancer* (pp. 205-225): Birkhäuser Boston.
- Trujillo, M., Gallardo, E., Madrona, A., Bravo, L., Sarria, B., Gonzalez-Correa, J. A., et al. (2014). Synthesis and antioxidant activity of nitrohydroxytyrosol and its acyl derivatives. *J Agric Food Chem*, 62(42), 10297-10303.
- Tuck, Kellie L., Hayball, Peter J., & Stupans, Ieva. (2002). Structural characterization of the metabolites of hydroxytyrosol, the principal phenolic component in olive oil, in rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(8), 2404-2409.
- Valdespino-Gómez, Víctor Manuel, & Valdespino-Castillo, Víctor Edmundo. (2011). *Cancer initiation and progression: a biological system*. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 10(06), 358-365.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40.
- Valko, Marian, Leibfritz, Dieter, Moncol, Jan, Cronin, Mark T. D., Mazur, Milan, & Telser, Joshua. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Valls, Rosa- M., Farras, Marta, Suarez, Manuel, Fernandez-Castillejo, Sara, Fito, Montserrat, Konstantinidou, Valentini, et al. (2015). Effects of functional olive oil enriched with its own phenolic compounds on endothelial function in hypertensive patients. A randomised controlled trial. *Food chemistry*, 167, 30-35.
- van Heijst, J. W., Niessen, H. W., Hoekman, K., & Schalkwijk, C. G. (2005). Advanced glycation end products in human cancer tissues: detection of N-epsilon-(carboxymethyl)lysine and argpyrimidine. *Ann N Y Acad Sci*, 1043, 725-733.

- Van Hemelrijck, Mieke, Jassem, Wayer, Walldius, Goran, Fentiman, Ian S., Hammar, Niklas, Lambe, Mats, et al. (2011). Gamma-glutamyltransferase and risk of cancer in a cohort of 545,460 persons - the Swedish AMORIS study. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 47(13), 2033-2041.
- Varga, Zoltan V., Ferdinandy, Peter, Liaudet, Lucas, & Pacher, Pal. (2015). Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 309(9), H1453-1467.
- Vassalle, Cristina, Botto, Nicoletta, Andreassi, Maria Grazia, Berti, Sergio, & Biagini, Andrea. (2003). Evidence for enhanced 8-isoprostane plasma levels, as index of oxidative stress in vivo, in patients with coronary artery disease. *Coronary artery disease*, 14(3), 213-218.
- Vehmanen, L., Saarto, T., Blomqvist, C., Taskinen, M. R., & Elomaa, I. (2004). Tamoxifen treatment reverses the adverse effects of chemotherapy-induced ovarian failure on serum lipids. *British journal of cancer*, 91(3), 476-481.
- Vera-Ramirez, L., Sanchez-Rovira, P., Ramirez-Tortosa, M. C., Ramirez-Tortosa, C. L., Granados-Principal, S., Fernandez-Navarro, M., et al. (2011). Does chemotherapy-induced oxidative stress improve the survival rates of breast cancer patients? *Antioxid Redox Signal*, 15(4), 903-909.
- Vera-Ramirez, Laura, Sanchez-Rovira, Pedro, Ramirez-Tortosa, M. Carmen, Ramirez-Tortosa, Cesar L., Granados-Principal, Sergio, Lorente, Jose A., et al. (2012). Oxidative stress status in metastatic breast cancer patients receiving palliative chemotherapy and its impact on survival rates. *Free radical research*, 46(1), 2-10.
- Verhoeven, Veronique, Van der Auwera, Anastasia, Van Gaal, Luc, Remmen, Roy, Apers, Sandra, Stalpaert, Michel, et al. (2015). Can red yeast rice and olive extract improve lipid profile and cardiovascular risk in metabolic syndrome?: a double blind, placebo controlled randomized trial. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 576.
- Viale, G. (2012). The current state of breast cancer classification. *Ann Oncol*, 23 Suppl 10, x207-210.
- Victorino, Vanessa J., Campos, Fernanda C., Herrera, Ana C. S. A., Colado Simao, Andrea N., Cecchini, Alessandra L., Panis, Carolina, et al. (2014). Overexpression of HER-2/neu protein attenuates the oxidative systemic profile in women diagnosed with breast cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(4), 3025-3034.
- Vieira, F. G. K., Di Pietro, P. F., Boaventura, B. C. B., Ambrosi, C., Rockenbach, G., Fausto, Ma A., et al. (2011). Factors associated with oxidative stress in women with breast cancer. *Nutricion hospitalaria*, 26(3), 528-536.
- Vilaplana-Perez, Cristina, Aunon, David, Garcia-Flores, Libia A., & Gil-Izquierdo, Angel. (2014). Hydroxytyrosol and potential uses in cardiovascular diseases, cancer, and AIDS. *Frontiers in nutrition*, 1, 18.
- Visioli, F., Galli, C., Bornet, F., Mattei, A., Patelli, R., Galli, G., et al. (2000). Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS letters*, 468(2-3), 159-160.
- Visioli, F., Galli, C., Grande, S., Colonnelli, K., Patelli, C., Galli, G., et al. (2003). Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *J Nutr*, 133(8), 2612-2615.
- Visser, Maud N., Zock, Peter L., Roodenburg, Annet J. C., Leenen, Rianne, & Katan, Martijn B. (2002). Olive oil phenols are absorbed in humans. *The Journal of nutrition*, 132(3), 409-417.
- Walenta, Stefan, & Mueller-Klieser, Wolfgang F. (2004). Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Seminars in radiation oncology*, 14(3), 267-274.
- Wang, C., Yu, J., Wang, H., Zhang, J., & Wu, N. (2014). Lipid peroxidation and altered anti-oxidant status in breast adenocarcinoma patients. *Drug research*, 64(12), 690-692.

- Wang, J. Y., Prorok, G., & Vaughan, W. P. (1993). Cytotoxicity, DNA cross-linking, and DNA single-strand breaks induced by cyclophosphamide in a rat leukemia in vivo. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 31(5), 381-386.
- Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science (New York, N Y)*, 124(3215), 269-270.
- Warleta, Fernando, Quesada, Cristina Sanchez, Campos, Maria, Allouche, Yosra, Beltran, Gabriel, & Gaforio, Jose J. (2011). Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells. *Nutrients*, 3(10), 839-857.
- Warrier, S., Bhuvanlakshmi, G., Arfuso, F., Rajan, G., Millward, M., & Dharmarajan, A. (2014). Cancer stem-like cells from head and neck cancers are chemosensitized by the Wnt antagonist, sFRP4, by inducing apoptosis, decreasing stemness, drug resistance and epithelial to mesenchymal transition. *Cancer gene therapy*, 21(9), 381-388.
- Warrier, Sudha, Balu, Senthil Kumar, Kumar, Alan Prem, Millward, Michael, & Dharmarajan, Arunasalam. (2013). Wnt antagonist, secreted frizzled-related protein 4 (sFRP4), increases chemotherapeutic response of glioma stem-like cells. *Oncology research*, 21(2), 93-102.
- Washington, Kay. (2010). 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. *Annals of surgical oncology*, 17(12), 3077-3079.
- White, J., Howells, A., Jones, A., Poole, C., Lind, M., Stuart, N., et al. (2000). A multicentre phase II pilot study of epirubicin and Taxol (paclitaxel) in patients with advanced breast cancer. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*, 12(4), 256-259.
- Wiseman, Martin. (2008). The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 67(3), 253-256.
- Woolston, Caroline M., Zhang, Lei, Storr, Sarah J., Al-Attar, Ahmad, Shehata, Mohamed, Ellis, Ian O., et al. (2012). The prognostic and predictive power of redox protein expression for anthracycline-based chemotherapy response in locally advanced breast cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 25(8), 1106-1116.
- Wu, Q., Zhong, Z. M., Pan, Y., Zeng, J. H., Zheng, S., Zhu, S. Y., et al. (2015). Advanced Oxidation Protein Products as a Novel Marker of Oxidative Stress in Postmenopausal Osteoporosis. *Med Sci Monit*, 21, 2428-2432.
- Xie, Yu, Collins, William J., Audeh, M. William, Shiao, Stephen L., Gottlieb, Roberta A., Goodman, Marc T., et al. (2015). Breast Cancer Survivorship and Cardiovascular Disease: Emerging Approaches in Cardio-Oncology. *Current treatment options in cardiovascular medicine*, 17(12), 60.
- Yadav, N., & Chandra, D. (2013). Mitochondrial DNA mutations and breast tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1836(2), 336-344.
- Yamaguchi, Norihiro, Fujii, Takeo, Aoi, Shunsuke, Kozuch, Peter S., Hortobagyi, Gabriel N., & Blum, Ronald H. (2015). Comparison of cardiac events associated with liposomal doxorubicin, epirubicin and doxorubicin in breast cancer: a Bayesian network meta-analysis. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 51(16), 2314-2320.
- Yamamoto, Y., Yamagishi, S., Hsu, C. C., & Yamamoto, H. (1996). Advanced glycation endproducts-receptor interactions stimulate the growth of human pancreatic cancer cells through the induction of platelet-derived growth factor-B. *Biochemical and biophysical research communications*, 222(3), 700-705.
- Yang, R. X., Ren, H. X., Zhuang, L., Gao, C. L., Dong, C., Luo, C. X., et al. (2012). Pharmacokinetic and myocardial enzyme profiles of two administration routes of epirubicin in breast cancer patients. *Arzneimittel-Forschung*, 62(12), 677-681.
- Yao, Song, Barlow, William E., Albain, Kathy S., Choi, Ji-Yeob, Zhao, Hua, Livingston, Robert B., et al. (2010). Manganese superoxide dismutase polymorphism, treatment-related

- toxicity and disease-free survival in SWOG 8897 clinical trial for breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 124(2), 433-439.
- Yoshioka, Tatsuya, Hosoda, Mitsuchika, Yamamoto, Mitsugu, Taguchi, Kazunori, Hatanaka, Kanako C., Takakuwa, Emi, et al. (2015). Prognostic significance of pathologic complete response and Ki67 expression after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast cancer (Tokyo, Japan)*, 22(2), 185-191.
- Zbidi, Hanene, Salido, Sofia, Altarejos, Joaquin, Perez-Bonilla, Mercedes, Bartegi, Aghleb, Rosado, Juan A., et al. (2009). Olive tree wood phenolic compounds with human platelet antiaggregant properties. *Blood cells, molecules & diseases*, 42(3), 279-285.
- Zhang, X., Cao, J., & Zhong, L. (2009). Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 379(6), 581-586.
- Zhang, Xiaomei, Jiang, Liping, Geng, Chenyan, Yoshimura, Hiroyuki, & Zhong, Laifu. (2008). Inhibition of acrylamide genotoxicity in human liver-derived HepG2 cells by the antioxidant hydroxytyrosol. *Chemico-biological interactions*, 176(2-3), 173-178.
- Zhang, Yaping, Song, Lina, Liu, Ning, He, Chengyan, & Li, Zhili. (2014). Decreased serum levels of free fatty acids are associated with breast cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 437, 31-37.
- Zhang, Zhigang, Yu, Xiuyang, Wang, Zhen, Wu, Pin, & Huang, Jian. (2015). Anthracyclines potentiate anti-tumor immunity: A new opportunity for chemoimmunotherapy. *Cancer letters*, 369(2), 331-335.
- Zhou, Ming, Zhao, Yuhua, Ding, Yan, Liu, Hao, Liu, Zixing, Fodstad, Oystein, et al. (2010). Warburg effect in chemosensitivity: targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes taxol-resistant cancer cells to taxol. *Molecular cancer*, 9, 33.
- Zhu, Lu, Liu, Zhongbo, Feng, Zhihui, Hao, Jiejie, Shen, Weili, Li, Xuesen, et al. (2010). Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *The Journal of nutritional biochemistry*, 21(11), 1089-1098.
- Ziech, Dominique, Franco, Rodrigo, Pappa, Aglaia, & Panayiotidis, Mihalios I. (2011). Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutation research*, 711(1-2), 167-173.
- Zimmerman, R., & Cerutti, P. (1984). Active oxygen acts as a promoter of transformation in mouse embryo C3H/10T1/2/C18 fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(7), 2085-2087.
- Zou, Xuan, Feng, Zhihui, Li, Yuan, Wang, Ying, Wertz, Karin, Weber, Peter, et al. (2012). Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *The Journal of nutritional biochemistry*, 23(8), 994-1006.
- Zwane, Refiloe E., Parker, Ayesha, Kudanga, Tukayi, Davids, Lester M., & Burton, Stephanie G. (2012). Novel, biocatalytically produced hydroxytyrosol dimer protects against ultraviolet-induced cell death in human immortalized keratinocytes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(46), 11509-11517.