

# El Escualeno, componente minoritario del aceite de oliva, y su relación con el cáncer

---

FERNANDO WARLETA

JESÚS RUIZ-MORA

MARÍA CAMPOS-SEGURA

M. JOSÉ SERRANO

JOSÉ JUAN GAFORIO

Universidad de Jaén

Área de Inmunología. Dpto. de Ciencias de la Salud

## RESUMEN:

El cáncer es actualmente una de las principales causas de defunción en los países desarrollados. La principal terapia empleada en su lucha, la quimioterapia, es responsable de numerosos efectos secundarios, relacionados en gran medida con la producción de radicales libres y con los efectos que éstos generan en nuestro organismo. Determinados componentes presentes en la naturaleza, poseen propiedades antioxidantes capaces de reducir ese efecto malicioso y de inhibir o frenar el crecimiento de células tumorales *in vitro*, así como de potenciar el efecto citotóxico de los quimioterápicos. Algunos de los componentes minoritarios presentes en el aceite de oliva presentan características antioxidantes y anticancerígenas, lo que nos ha animado a estudiar estas propiedades en tres de los principales componentes minoritarios del aceite de oliva; el escualeno, el hidroxitirosol y el tirosol.

Aunque el estudio está en una fase temprana y quedan aun numerosos ensayos por realizar, podemos sugerir con los resultados obtenidos hasta la

## ABSTRACT:

Cancer is nowadays one of the main causes of disease in developed countries. The most commonly used therapy, the chemotherapy, is responsible for a great number of secondary effects, related with the production of reactive oxygen species and also related with the effects that these reactive oxygen species have on our organism. Specific components present in Nature have antioxidant characteristics, with can reduce this harmful effect and inhibit tumoral cell growth *in vitro*, as well as potentiate the cytotoxic effects of chemotherapics. Some of the minority components presents in olive oil have antioxidant and antitumoral characteristics, fact that encourage us to study these properties in three of the main minority components of olive oil; Squalene, Tyrosol and Hydroxytyrosol.

Although the study is in an early stage and there are still numerous assays to make, we can suggest, with the recently obtained results, that the Squalene hasn't got cytotoxic or cytostatic capacity by itself in MDA-MB-231, and

fecha, que el escualeno no tiene capacidad citotóxica o citostática por sí misma en MDA-MB-231 y es muy leve en MCF 7, pero mientras que sobre MCF 7 presenta un efecto potenciador de la actividad citotóxica de la Adriamicina y el Taxol, sobre MDA-MB-231 no ejerce ninguna acción.

it is weak in MCF 7. Anyway, while on MCF 7 it has an enhancing effect of the cytotoxic activity of Adriamicine and Taxol, the Squalene has no effect in MDA-MB-231.

## NUTRICIÓN Y SALUD. ACEITE DE OLIVA

El estado de salud de un individuo es el resultado de interacciones entre factores genéticos y ambientales. Entre los factores ambientales, la nutrición es un elemento de la mayor importancia para mantener dicho estado.

Una dieta equilibrada y saludable es aquella en la cual estén presentes todos los nutrientes en su justa medida. Las grasas son, entre estos nutrientes, unos de los más importantes, ya que son una fuente primordial de energía por el elevado contenido calórico que poseen (ver tabla 1) e intervienen en el desarrollo de diversas estructuras celulares y en la asimilación de vitaminas y minerales entre otras funciones vitales. Debido a ese gran aporte calórico que presentan, no debemos aumentar su consumo, pero sí mejorar la calidad de ese consumo sustituyendo las grasas saturadas, perjudiciales para el organismo (Owen *et al.*, 2004), por insaturadas.

Tabla 1. Aporte calórico generado por un gramo de diferentes nutrientes

Un gramo de materia	Valores calóricos fisiológicos aproximados
Grasas	9
Proteínas	4
Hidratos de Carbono	4

Numerosos estudios epidemiológicos muestran que las poblaciones que consumen una dieta mediterránea predominantemente a base de vegetales, poseen menores incidencias de enfermedades crónicas que aquellos que consumen una dieta típica del Norte de Europa o Norteamer-

ricana. Este efecto ha sido atribuido al mayor consumo de frutas y verduras y el menor consumo de productos animales, y en particular su grasa. Aunque la ingesta total lipídica en poblaciones mediterráneas es más alta que en otras regiones, la mayor proporción procede del aceite de oliva y no de grasas animales. El aumento del consumo de aceite de oliva implica una reducción de enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, y, en menor grado, una variedad de cánceres.

Su ingesta continuada reduce los niveles de colesterol en sangre (Michalsen *et al.*, 2005); produce un retraso en la evacuación gástrica asegurando un ataque hacia los alimentos por parte del jugo gástrico y ayuda a combatir el estreñimiento al lubricar las paredes intestinales. Este efecto antisecretor gástrico puede incidir de forma positiva en individuos con síndromes de hipersecreción ácida y con úlcera gástrica o duodenal. Asimismo, parece tener un efecto terapéutico sobre las úlceras pépticas; por su acción colagoga o estimulante de la secreción biliar, es un vehículo excepcional para la absorción de la totalidad de vitaminas liposolubles (A, D, E, K), que se ingieren con el resto de los alimentos (Morros Sardá, 2000); es rico en vitamina E, mediante la cual determinados mecanismos reducen la producción de prostaglandina E<sub>2</sub> de forma que ejerce un efecto protector frente a los problemas arterioscleróticos. El aceite de oliva, aumenta la relación entre HDL / LDL (High Density Lipoprotein/Low Density Lipoprotein), con lo que se evita que las LDLs acumulen el colesterol en tejidos como en las paredes internas de las arterias, formando placas de ateroma, que son las responsables de la arteriosclerosis y en última instancia de la trombosis arterial e infartos. Una dieta rica en aceite de oliva, proporciona una barrera protectora frente a un exceso de presión sanguínea y regula el funcionamiento del aparato circulatorio, (Alonso *et al.*, 2004). Además, el aceite de oliva es un elemento antioxidante en sí, de forma que está demostrado su papel en la disminución del estrés oxidativo (Moreno *et al.*, 2001; Tur Mari, 2004), lo que lo convierte en un ingrediente altamente recomendado tanto en la infancia como en la vejez.

El aceite de oliva, estimula el crecimiento óseo y la absorción del calcio y su mineralización, contribuye a la regulación de la glucosa en la sangre, ejerce un efecto protector y tónico sobre la piel y mejora el metabolismo al actuar sobre el sistema endocrino.

Asimismo, debemos mencionar que el aceite de oliva también modula la función inmune, y en particular los procesos inflamatorios asociados con el sistema inmunológico. Una dieta equilibrada proporciona efectos saludables en las barreras de defensa frente a patógenos. Así ocurre por ejemplo con los mediadores inflamatorios, demostrándose en ratas de

laboratorio que tras una dieta rica en aceite de oliva virgen se mejoran notablemente los efectos en el proceso inflamatorio (de la Puerta Vázquez et al., 2004). También se ha observado que componentes del aceite de oliva como el beta-estradiol pueden intervenir tanto en procesos inflamatorios como en fenómenos de activación celular y producción de determinadas moléculas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (Salem ML et al., 2000).

Como componente dietético antioxidante, responsable de la atenuación del proceso inflamatorio, podría explicar sus efectos beneficiosos sobre el riesgo de ciertas enfermedades, ya que la oxidación y los procesos inflamatorios parecen ser la base de factores causales de diversas enfermedades en el hombre. Los efectos antioxidantes del aceite de oliva son probablemente debidos a una combinación entre su alto contenido de ácido oleico y su contenido de una variedad de antioxidantes vegetales (Wahle et al., 2004). Estos componentes, entre otros, modulan positivamente el proceso de oxidación que deteriora las células y la función del endotelio, así como la inflamación, implicada en infinidad de problemas de la salud, lo que conlleva a un menor riesgo de padecer arteriosclerosis, Parkinson, Alzheimer, demencia vascular, deterioro cognitivo y diabetes a lo largo de la vida.

Pero una de las mayores y más novedosas implicaciones que posee el aceite de oliva es la relacionada con el cáncer, ya que numerosos estudios epidemiológicos contrastados apuntan claramente a que el consumo habitual de Aceite de Oliva previene el desarrollo de determinados tipos de tumores, entre ellos el de mama, colon, esófago, ovario, endometrio, pulmón, cavidad oral, gástrico, pancreático y de faringe (Alarcón de Lastra et al., 2001). Tanto Newmark como Rao y otros autores, sostienen que el relativo alto contenido de escualeno es el responsable de la reducción de casos de cáncer asociada al consumo del aceite de oliva. Asimismo, se sabe que sustancias como el escualeno y los terpenoides, contenidas en el aceite de oliva virgen, están consideradas como agentes antitumorales, ejerciendo un papel preventivo frente a tumores como el de colon (Owen et al., 2004).

El Escualeno es un triterpeno que se encuentra de forma característica en el aceite de oliva. Su nombre deriva de «*squalus*» porque se descubrió en el aceite de hígado de tiburón. El «aceite de oliva virgen extra» contiene cantidades muy elevadas de escualeno (entre el 0,2 y el 0,7%). Tiene actividad antioxidante y antitumoral. Entre las interesantes acciones de este compuesto citaremos que, en modelos experimentales murinos, inhibe la tumorigénesis de tumores inducidos químicamente, concretamente de colon, pulmón y piel (Smith et al., 1998). Se ha propuesto un meca-

nismo de acción para explicar su efecto basado en una fuerte actividad inhibidora *in vivo* de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzyma A reductasa, lo que reduce la farnesilación de las oncoproteínas Ras. La mutación de Ras, especialmente *K-Ras*, ocurre en aproximadamente el 20-30% de todos los tumores humanos, particularmente en páncreas (90%), colon (50%) y carcinoma de pulmón (30%). La proteína Ras oncogénica está en un perpetuo estado de activación, liderando una división celular incontrolada en ausencia de señales de crecimiento. Por tanto, la reducción en la activación del oncogén Ras mutado puede ser útil en tumores fuertemente asociados con el oncogén Ras (Newmark, 1999).

Otro interesante efecto biológico del escualeno se ha descrito por Das y otros (2003). Sus resultados sugieren que, el escualeno tiene *in vitro* un efecto citoprotector sobre las células hematopoyéticas pluripotenciales derivadas de la médula ósea pero no protegen de la toxicidad inducida por el cisplatino a las líneas celulares de neuroblastoma. Por tanto, según este estudio, el escualeno tiene una actividad citoprotectora selectiva en células normales para la toxicidad producida por los quimioterápicos, sin proteger a las células tumorales. Todos estos resultados sugieren que el escualeno podría ser un interesante candidato para optimizar el tratamiento quimioterápico en pacientes oncológicos al minimizar los efectos secundarios del tratamiento.

Por otra parte, Budiyanto y otros (2000) describen un efecto protector del aceite de oliva aplicado tópicamente en ratones en experimentos para inducir en éstos tumores de piel por exposición a luz ultravioleta. No se conoce bien cuál es el componente o componentes que suprimen el efecto fotocarcinogénico de la luz ultravioleta, pero se insinúa que el escualeno, por su actividad antioxidante y anti-Ras, podría ser un buen candidato. En este sentido, se sabe que el escualeno se acumula fundamentalmente en la piel, el sebo tiene un 12% de escualeno, aquí neutraliza el oxígeno reactivo, protege la piel humana de la peroxidación lipídica producida por la exposición a la luz ultravioleta u otras fuentes de daño oxidativo.

## CÁNCER

El cáncer representa una de las principales causas de mortalidad en España, así como en el resto de Europa. En el año 2000 se produjeron 1.122.000 defunciones a causa del cáncer entre los 25 estados miembros de la Unión Europea (Quinn *et al.*, 2003), mientras que en el año 2004 en Europa se produjeron 2.886.800 casos de cáncer y 1.711.000 muertes, casi 60.000 defunciones más que en el año 2000 (Ver tablas 2 y 3). El cáncer de pulmón fue el más padecido con un 13'2 % del total de casos seguido

muy de cerca del cáncer de colon y recto con un 13% y por el cáncer de mama con un 12 %. En lo que a número de defunciones se refiere, observamos que el cáncer de mama con un 7'6% es la cuarta responsable del total de las defunciones por cáncer. Los casos de pulmón y colon-recto son los que mayor número de fallecimientos tienen, con un 20% y 11'9% del total respectivamente. (Boyle et al., 2005). En líneas generales, se espera que una cuarta parte de los hombres y una quinta parte de las mujeres padezcan un proceso relacionado con el cáncer a lo largo de su vida (Levi et al., 1999). De este modo, en el 2015 se prevé que el número de casos de fallecimiento por cáncer sea de 1.405.000 (Quinn et al., 2003).

Tabla 2.

Localización	Nº Casos	%	
Pulmón	381.500	13,2	
Colon y recto	376.400	13,0	
Mama	370.100	12,8	
Próstata	237.800	8,2	
Estómago	171.000	5,9	
Útero	133.800	4,6	
Linfomas	121.200	4,2	
Cavidad oral	97.800	3,4	
Leucemia	75.600	2,6	
Laringe	46.100	1,6	
Esófago	43.700	1,5	
TOTAL	2.886.800	100	Incidencia de casos de cáncer en Europa en ambos sexos en 2004

Tabla 3.

Localización	Nº Casos	%	
Pulmón	341.800	20,0	
Colon y recto	203.700	11,9	
Estómago	137.900	8,1	
Mama	129.900	7,6	
Próstata	85.200	5,0	
Linfomas	65.200	3,8	
Leucemia	52.600	3,1	
Útero	49.300	2,9	
Cavidad oral	40.100	2,3	
Esófago	39.500	2,3	
Laringe	24.500	1,4	
TOTAL	1.711.000	100	Incidencia de muertes por cáncer en Europa en ambos sexos en 2004

Entre las mujeres, el cáncer de mama es, con una importante diferencia respecto al resto de tumores, el que más se padece en Europa con 370.100 nuevos casos en 2004, lo que supone un 27.4 % de todos los casos de cáncer detectados en mujeres en ese año, seguido del cáncer de colon y recto con 179.200 casos (13'25 %) (Ver tabla 4).

En cuanto a las causas de muerte por cáncer en mujeres, podemos decir que es también el de mama el mayor responsable con 129.900 casos que representan el 17'4 % del total seguido del cáncer colorrectal, que fue responsable de 100.400 muertes (13'4 %). (Boyle *et al.*, 2005) (Ver tabla 5).

**Tabla 4.**

Localización	Nº Casos	%	
Mama	370.100	27,4	Incidencia de casos de cáncer en mujeres en Europa en 2004
Colon y recto	179.200	13,25	
Útero	133.800	9,9	
Pulmón	82.900	6,1	
Estómago	68.200	5,0	
Otros*	.....	.....	
TOTAL	1.352.100	100	

**Tabla 5.**

Localización	Nº Casos	%	
Mama	129.900	17,4	Incidencia de muerte por cáncer en mujeres en Europa en 2004
Colon y recto	100.400	13,4	
Pulmón	73.500	9,8	
Útero	56.700	6,6	
Otros*	.....	.....	
TOTAL	748.400		

\* El resto de casos no están representados en la tabla

Aún no tenemos claro qué componentes o combinación de ellos promueven el efecto antitumoral y cual es su mecanismo concreto de acción. Por tanto, sería prioritario definir y caracterizar los componentes del aceite de oliva que tienen un potencial efecto antitumoral y concretar su mecanismo de acción.

Para ir delimitando el campo de acción hay una primera cuestión a la que tenemos que responder:

¿Se debe este efecto protector a la presencia de ácidos grasos monoinsaturados o está directamente relacionado con la presencia de compuestos minoritarios en su fracción insaponificable?

El efecto protector que se logra con la ingesta de aceite de oliva puede ser atribuido, en gran medida, a la actividad de los componentes presentes en la fracción insaponificable del aceite, que podrían actuar inhibiendo las alteraciones que los carcinógenos producen en el ADN.

Los componentes minoritarios del aceite de oliva virgen extra como son el escualeno y antioxidantes fenólicos, incluyendo fenoles simples (hidroxitirosol, tirosol), flavonas y lignanos (acetoxipinoresinol, pinoresinol), que son constituyentes extranutricionales, presentes en muy pequeñas cantidades en los alimentos, que son muy diversos en cuanto a su estructura química y función, son considerados como componentes bioactivos (Kitts, 1994).

Para tratar de ver qué trascendencia podría tener la presencia de estos compuestos en la inhibición de la proliferación y progresión tumoral, debemos decir que está ampliamente documentado que el cáncer es una enfermedad genética. En línea con la hipótesis del «estrés oxidativo persistente en el cáncer» (Toyokuni et al., 1995), la presencia de oxígeno reactivo (los conocidos con las siglas ROS, «Reactive Oxygen Species») están involucrados en diversos acontecimientos biológicos que típicamente ocurren en la iniciación y progresión del cáncer:

- 1º) La presencia de ROS pueden originar una activación persistente de factores de transcripción, como NF- $\kappa$ B, e inducir la expresión de proto-oncogenes tales como *c-fos*, *c-jun* y *c-myc*.
- 2º) El estrés oxidativo produce alteraciones en el ADN celular, induciendo la aparición de mutaciones, y sabemos que esta es la base de la inestabilidad genómica característica de las células tumorales.
- 3ª) El estrés oxidativo puede provocar que las células tumorales sean resistentes a la quimioterapia.
- 4º) Finalmente, la presencia de oxígeno reactivo (ROS) puede dañar específicamente ciertas proteínas y enzimas, entre ellas inhibidores de proteasas, induciendo un aumento de la acción de éstas últimas, y ello podría facilitar la invasión tumoral y la formación de metástasis.

Hay que reseñar que este daño oxidativo puede tener su origen en moléculas procedentes de procesos metabólicos endógenos así como en la

exposición a oxidantes presentes en el medio ambiente o en la comida. Algunos autores sugieren incluso, que las propias células tumorales pueden producir estas moléculas, favoreciendo la progresión tumoral (Szatrowski et al., 1991).

## INVESTIGACIÓN ACTUAL DE NUESTRO GRUPO

Bajo el título «*Efectos de algunos antioxidantes de la fracción insaponificable del aceite de oliva virgen en el tratamiento de cáncer de mama y colon. Estudio in vitro de la inducción de apoptosis sobre líneas tumorales*», nuestro grupo de investigación trata de demostrar el efecto antiproliferativo de los componentes minoritarios del aceite de oliva virgen sobre tumores de mama y colon.

Por lo expuesto anteriormente, en este proyecto nos hemos interesado en los compuestos presentes en la fracción insaponificable del aceite de oliva virgen extra, ya que ha demostrado su actividad antioxidante natural, lo que nos sugiere que estas sustancias podrían tener un papel predominante en las características beneficiosas para la salud atribuidas al aceite de oliva. Algunos de estos componentes podrían actuar disminuyendo la toxicidad de algunos fármacos, e incluso tener implicaciones terapéuticas.

Dentro de la extensa variedad de componentes minoritarios presentes en el aceite de oliva virgen, seleccionamos para nuestro estudio al escualeno, componente más abundante dentro de la fracción insaponificable, y dos compuestos fenólicos [3,4-dihidroxifeniletanol (Hidroxitirosol) y 3-hidroxifeniletanol (tirosol)], por ser los que, según la bibliografía, presentan mayor actividad anticancerígena y antioxidativa.

La idea principal de nuestro proyecto consiste en determinar el efecto *in vitro* de los componentes minoritarios del aceite de oliva virgen seleccionados sobre líneas tumorales de mama y colon. Esta actividad la estudiamos tanto en ausencia como en presencia de diferentes quimioterápicos, con lo que observamos el efecto de los componentes minoritarios en la inhibición de la proliferación celular, así como la acción potenciadora de la toxicidad inducida por los quimioterápicos.

Para el estudio hemos seleccionado cuatro líneas tumorales; dos de mama (MCF 7 y MDA-MB-231), las cuales presentan o no receptores estrogénicos (ER+ y ER- respectivamente) y dos de colon (Caco-2 y HT-29). Hemos priorizado el estudio sobre estas líneas por ser de los tumores con mayor incidencia sobre la población.

Los quimioterápicos seleccionados para nuestro trabajo han sido la Doxorubicina, Paclitaxel y Gemcitabina, fármacos empleados en el tratamiento del cáncer de mama y colon.

### Metodología:

Citotoxicidad y proliferación celular: El estudio de la citotoxicidad celular lo realizamos por colorimetría en placas de 96 pocillos con XTT (2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2Htetrazolium-5-carboxyanilide inner salt) , sal de tetrazolio capaz de cuantificar la viabilidad celular al reducirse por las deshidrogenadas mitocondriales de las células vivas. Es similar al MTT pero con la ventaja de que es hidrosoluble y no se reduce en presencia de polifenoles antioxidantes como el resveratrol dando lugar a falsos positivos (Bernhard et al, 2003). Las células se cultivan en las placas en medio EMEM con suero bovino fetal descomplementado (SBF) y sin antibióticos durante 24 horas. Pasado ese tiempo, añadimos diferentes concentraciones de los quimioterápicos a los pocillos combinado con un rango de concentraciones de los componentes de estudio del aceite. Como controles se dejan pocillos sin tratamiento (control positivo, sólo con medio de cultivo y XTT), pocillos sin tratamiento ni XTT el día de la lectura (control negativo de la emisión basal sin el reactivo colorimétrico, sólo con medio de cultivo) y pocillos con el detergente Triton X-100 y XTT (control negativo, aseguramos la lisis del 100% de las células). Pasadas 24 horas, retiramos el medio experimental y se sustituye por medio fresco. Se incuba durante 48 horas más y al 5º día se cambia el medio por XTT preparado en medio sin rojo fenol, sin antibióticos y sin SBF. Se mantiene 3 horas en la cámara de cultivo y hacemos la lectura colorimétrica.

Todos los ensayos se realizan por triplicado en la placa y se repite un mínimo de tres veces por ensayo. Los resultados con una desviación estándar entre las réplicas superior a 0'15 son desechados.

Apoptosis: Para determinar el efecto que ejercen los componentes del aceite elegidos en la inducción de apoptosis sobre las líneas tumorales seleccionadas de mama y colon, empleamos un kit de Apoptosis (Molecular Probes) compuesto de Anexina V/FITC que se une a la fosfatidil serina externalizada en la superficie de las células apoptóticas y de Ioduro de Propidio, que siendo impermeable para las células sanas, es capaz de traspasar la membrana citoplasmática de células comprometidas y marcar el ADN tanto de células necróticas o en apoptosis tardía. Los dos fluorocromos se excitan en la longitud de onda del azul (488 nm), pero el FITC emite en la banda del verde (530 nm) y el Ioduro de Propidio en la del rojo (más de 575

nm), lo que nos permite distinguir las células necróticas de las apoptóticas (Ver figura 1).

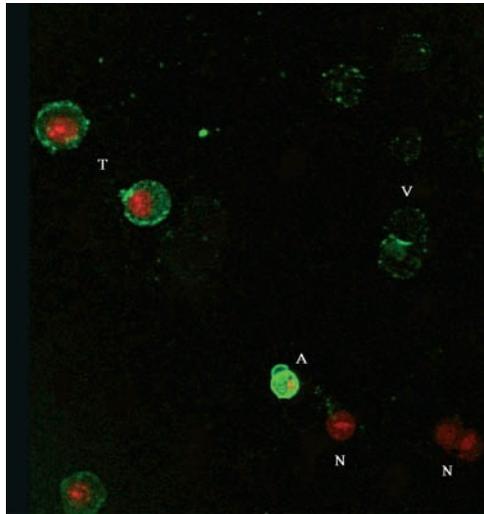


Figura 1

El protocolo que hemos preparado consiste en cultivar las células en placas de 12 pocillos durante 24 horas, añadimos el medio experimental con las concentraciones de quimioterápico y componente del aceite elegidas y mantenemos en cultivo durante 24 horas más. Recogemos el sobrenadante y despegamos las células juntándolas con el sobrenadante. Centrifugamos dos veces, resuspendiendo finalmente en un Buffer de unión para la Anexina V (Annexin-Binding Buffer); añadimos la Anexina V/FITC y el IP a cada muestra, excepto a los tres controles que llevarán o Anexina V/FITC, o PI o nada. Tras incubar 15 minutos a temperatura ambiente, añadimos más Buffer a cada muestra hasta completar 500  $\mu$ L y analizamos con el citómetro de flujo.

Ciclo celular: En la literatura, está muy bien identificado el efecto que los diferentes quimioterápicos ejercen sobre el ciclo celular de las células tumorales. Para identificar esa acción y observar las posibles variaciones que ejercen el Hidroxitirosol, Tirosol y Escualeno en el ciclo celular de las líneas tumorales MCF 7, MDA-MB-231, Caco-2 y HT-29, emplearemos la citometría de flujo y el PI/RNase (BD Biosciences).

El tratamiento de las células es idéntico al de la medición de apoptosis hasta la recogida y unión del sobrenadante y células despegadas. Una vez juntos, centrifugamos y fijamos cada muestra con 2 ml de etanol al

70% frío gota a gota y las guardamos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente, lavamos dos veces las muestras y resuspendemos en 500 de PI/RNase. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, realizamos las lecturas en el citómetro de flujo (Ver figura 2).

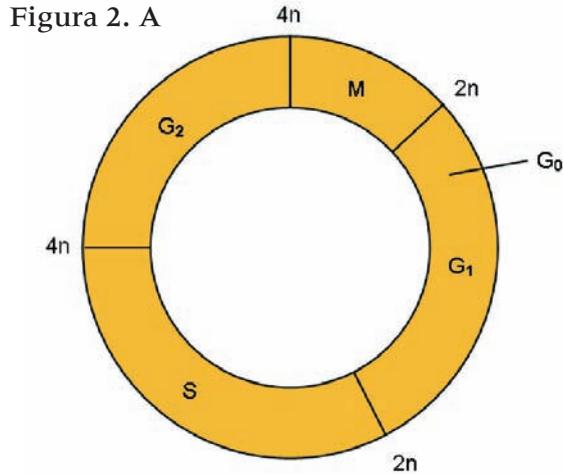
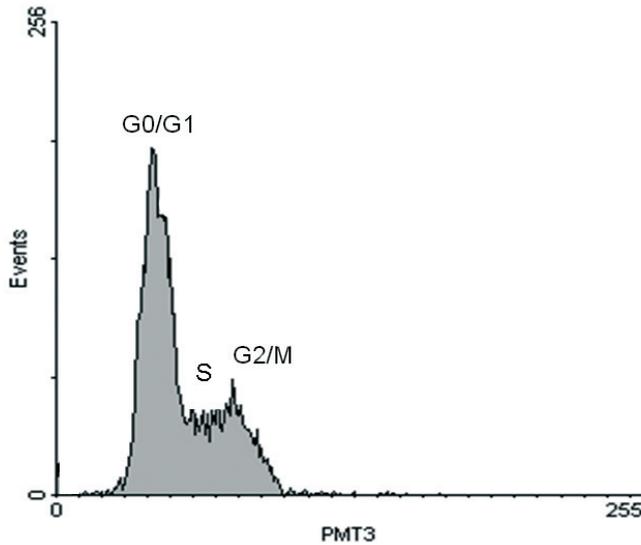


Figura 2. B



Especies Reactivas del Oxígeno (EROs): Los quimioterápicos producen un incremento en los niveles de EROs, responsables, en parte, de los efectos secundarios que generan. Debido a la capacidad antioxidante del Hidroxitirosol, Tiroso y Escualeno, estos niveles pueden verse reducidos en un importante grado.

Para determinar los niveles de EROs originados en las líneas tumorales tratadas por los quimioterápicos y determinar el efecto antioxidante de los componentes minoritarios del aceite de nuestro estudio, empleamos el DCFH-DA (Diacetato de diclorofluoresceína). Esta molécula, permeable para las células, es hidrolizada en el citoplasma por las esterasas a DCFH (Diclorofluoresceína), que a su vez se oxida a DCF (Diclorofluorescina) por los radicales libres presentes en el citoplasma como  $H_2O_2$  o NO. El DCF es una molécula fluorescente, y su emisión es linealmente dependiente de la cantidad de EROs presentes en la muestra, por lo que podemos cuantificar los niveles de radicales libres de las diferentes líneas en diferentes situaciones, comparándolos con un patrón de oxidación producido por una serie de concentraciones de  $H_2O_2$ .

Empleamos dos técnicas para detectar los niveles de EROs en las células tumorales: la citometría de flujo y la fluorimetría en placa de 96 pocillos. La metodología que seguimos en estos ensayos es diferente según la técnica empleada.

Para citometría, utilizamos placas de 12 pocillos y procedemos hasta el día 3 como en el caso del ciclo celular y apoptosis. El tercer día, cambiamos el medio experimental por DCFH-DA en PBS, menos a un pocillo control, y lo incubamos durante 30 minutos. Despegamos las células y las lavamos 2 veces, resuspendiendo finalmente cada muestra en PBS. Analizamos con el citómetro de flujo representando los resultados en histogramas con la fluorescencia en el eje X y el número de eventos en el Y.

Para fluorimetría, trabajamos con placas de 96 pocillos. Los dos primeros días son como en los ensayos de Citotoxicidad, pero incluimos controles positivos con  $H_2O_2$  y con Trolox (análogo de la Vitamina E) para tomarlos como referencia de oxidación. El tercer día cambiamos el medio experimental por DCFH-DA en PBS, menos a los controles negativos, e incubamos durante 30 minutos. Retiramos el medio y lo sustituimos por PBS y hacemos la lectura fluorimétrica.

## **RESULTADOS:**

Los resultados obtenidos hasta la fecha muestran diferentes comportamientos en diferentes componentes del aceite ensayados y en las distintas líneas celulares tratadas.

Para simplificar los resultados en esta exposición, presentaremos únicamente aquellos relacionados con un solo componente del aceite de

oliva, el Escualeno, un solo quimioterápico, la Doxorubicina, y una sola línea celular, MDA-MB-231.

El tratamiento de la línea tumoral de mama MDA-MB-231 con Escualeno sugiere que este componente del aceite de oliva ejerce un efecto citotóxico entre 50 y 400  $\mu\text{M}$  (Ver figura 3), siendo este efecto similar a cualquier concentración de este rango.

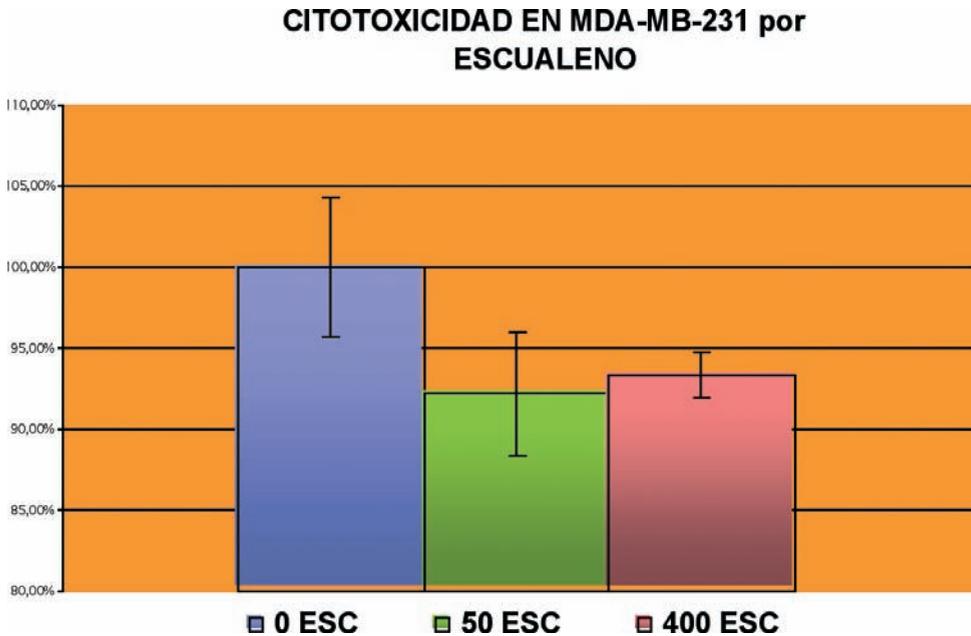


Figura 3

La acción combinada del Escualeno con el quimioterápico Adriamicina sobre la línea tumoral MDA-MB-231, muestra un efecto potenciador de la acción citotóxica del quimioterápico, siendo mayor la capacidad de potenciar la citotoxicidad cuanto mayor es la concentración del Escualeno (Ver figura 4)

### CITOTOXICIDAD EN MDA-MB-231 por ADRIAMICINA-ESCUALENO

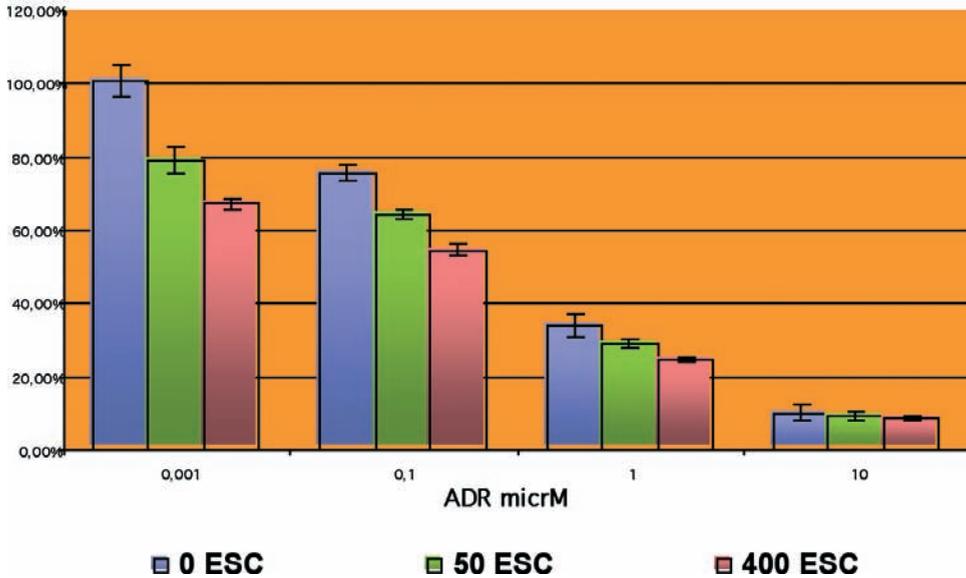


Figura 4

Respecto al efecto reductor de la producción de radicales libres por el Escualeno, hemos observado que a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , el Escualeno tiene un efecto reductor de los radicales libres citoplasmáticos, mientras que a 400  $\mu\text{M}$  el efecto no sólo no es reductor, sino que incluso llega a aumentar el estrés oxidativo de la célula.

Como referencia, comparamos esta capacidad antioxidante con la de la Vitamina E que es un conocido antioxidante muy potente, también presente en el aceite de oliva virgen (Ver figura 5).

### ERO's en MDA-MB-231 sin ADR

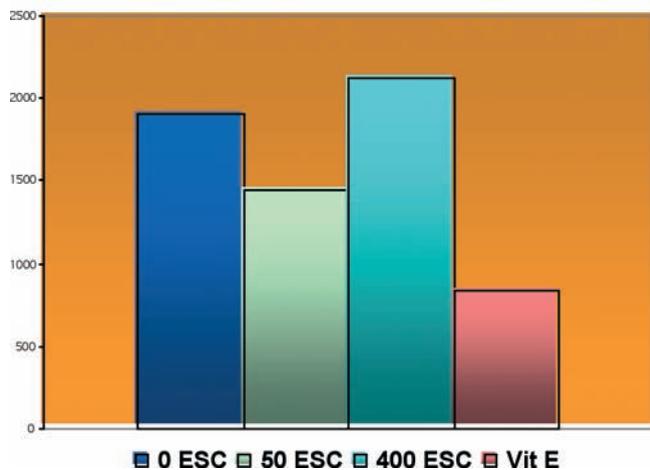


Figura 5

Cuando añadimos Adriamicina, podemos observar al igual que con el Escualeno por si sólo, que una concentración de 50  $\mu\text{M}$  de Escualeno reduce la producción de radicales libres, en este caso, generados por la Adriamicina y que 400  $\mu\text{M}$  no tiene esa capacidad reductora (Ver figura 6).

### ERO's en MDA-MB-231 con ADR

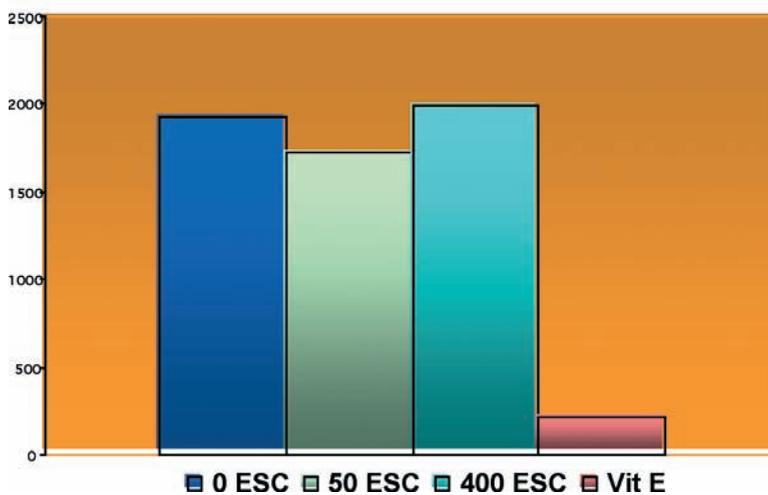


Figura 6

Como conclusión, diremos que el Escualeno tiene capacidad citotóxica sobre células tumorales de mama, que potencia la acción *in vitro* de determinados medicamentos antitumorales y que, a bajas concentraciones, el Escualeno tiene capacidad antioxidante, pero esta es independiente de su capacidad citotóxica.

Un modelo propuesto por el cual el Escualeno ejercería su papel antitumoral consiste en que este componente del aceite de oliva inhibe la actividad catalítica de una enzima reductasa impidiendo la farnesilación de Ras y evitando con esto que esta proteína se fije a la membrana celular. Con esto se bloquea el crecimiento celular (Smit, T.J., 2000).

Aún quedan ensayos por realizar para confirmar si es esta u otra vía la empleada por el Escualeno en su capacidad citotóxica. Actualmente, nuestro grupo de investigación continúa con el estudio de otros componentes antioxidantes del aceite de oliva junto con otros quimioterápicos, tratando de establecer el comportamiento de estas sustancias naturales para determinar su efecto beneficioso.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALARCÓN DE LA LASTRA, C., BARRANCO, M.D., MOTILVA, V., and HERRERIAS, J.M. Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil. *Current Pharmaceutical Design* 7: 933-50. 2001.
- ALONSO, A., and MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M.A. Olive oil consumption and reduced incidence of hypertension: the SUN study. *Lipids* 39: 1233-1238. 2004.
- BERNHARD D, SCHWAIGER W, CRAZZOLARA R, TINHOFER I, KOFLER R, CSORDAS A. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. *Cancer Letters* 195. (2003) 193–199.
- BOYLE, P., and FERLAY, J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Annals of Oncology* 16: 481-488. 2005.
- BUDIYANTO A, AHMED NU, WU A, BITO T, NIKAIIDO O, OSAWA T, UEDA M, ICHIHASHI M. Protective effect of topically applied olive oil against photocarcinogenesis following UVB exposure of mice. *Carcinogenesis*. 2000 Nov;21(11):2085-90.
- DAS B, YEGER H, BARUCHEL H, FREEDMAN MH, KOREN G, BARUCHEL S. In vitro cytoprotective activity of squalene on a bone marrow versus neuroblastoma model of cisplatin-induced toxicity: implications in cancer chemotherapy. *Eur. J. Cancer* 2003; 39:2556-65.
- HSU HF, HOUNG JY, CHANG CL, WU CC, CHANG FR, WU YC. Antioxidant activity, cytotoxicity, and DNA information of *Glossogyne tenuifolia*. *J Agric Food Chem*. 2005 Jul 27;53(15):6117-25.
- KITTS DD. Bioactive substances in food: identification and potential uses. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 1994; 72:423-34.
- LEVI, F. Cancer prevention: epidemiology and perspectives. *European Journal of Cancer* 35: 1046-1058. 1999.
- LEVI, F., LUCCHINI, F., NEGRI, E., BOYLE, P., AND LA VECCHIA, C. Cancer mortality in Europe, 1990-1994, and an overview of trends from 1955 to 1994. *European Journal of Cancer* 35: 1477-1516. 1999.
- LOPEZ-ABENTE, G., POLLÁN, M., ARAGONÉS, N., Y PÉREZ-GÓMEZ, B. Informe sobre la Salud de los Españoles. Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III, Madrid. 2003.
- MICHALSEN A, DOBOS GJ. Effects of nutritional factors on haemostasis. *Haemostaseologie*. Feb; 25(1): 13-7. 2005.
- MORROS SARDÁ, ARTETA, MARTÍNEZ DÍAZ. El Aceite de Oliva desde el punto de vista médico. Ed. El Olivo S.L.L. 2000.

- MORENO, J.J., CARBONELL, T., SÁNCHEZ, T., MIRET, S., AND MITJAVILA, M.T. Olive oil decreases both oxidative stress and the production of arachidonic acid metabolites by the prostaglandine G/H synthase pathway in rat macrophages. *Journal of Nutrition* 131: 2145-2149. 2001.
- NEWMARK HL. Squalene, olive oil, and cancer risk. Review and hypothesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 889:193-203. 1999.
- OWEN RW, HAUBNER R, WÜRTELE G, HULL WE, SPIEGELHALDER B, BARTSCH H. Olives and Olive oil in cancer prevention. *European Journal of Cancer Prevention*, 13: 319-326. 2004.
- DE LA PUERTA VÁZQUEZ, R., MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ, E., SÁNCHEZ PERONA, J., AND RUIZ-GUTIÉRREZ, V. Effectes of different dietary oils on inflammatory mediator generation and fatty acid composition in rat neutrophils. *Metabolism* 53: 59-65. 2004.
- QUINN, M.J., D'ONOFRIO, A., MOLLER, B., BLACK, R, MARTINEZ-GARCIA, C., MOLLER, H., RAHU, M., ROBERTSON, C., SCHOUTEN, L.J., LA VECCHIA, C., AND BOYLE, P. Cancer mortality trends in EU and acceding countries. *Annals of Oncology* 14: 1148-1152. 2003.
- RAO CV, NEWMARK HL, REDDY BS. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis*. 19(2): 287-90. 1998.
- SALEM ML, HOSSAIN MS, NOMOTO K. Mediation of the Immunomodulatory Effect of  $\beta$ -Estradiol on Inflammatory Responses by Inhibition of Recruitment and Activation of Inflammatory Cells and Their Gene Expression of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . *Int. Arch. Allergy Immunol.* 121: 235-245. 2000.
- SMITH TJ. Squalene: potential chemopreventive agent *Expert Opin Investig Drugs*. 2000 Aug;9(8):1841-8. Review.
- SMITH TJ, YANG GY, SERIL DN, LIAO J, and KIM S. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis* 1998; 19:703-6.
- SZATROWSKI TP and NATHAN CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Research*. 51: 794-8. 1991
- TOYOKUNI S, OKAMTO K, YODOI J, and HIAI H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Letters*. 358: 1-3. 1995
- TUR MARI, J.A. [The quality of fat: olive oil]. *Archives of Latinoamerican Nutrition* 54 (Suppl 1): 59-64. 2004.
- WAHLE, K.W., CARUSO, D., OCHOA, J.J., and QUILES, J.L. Olive oil and modulation of cell signaling in disease prevention. *Lipids* 39:1223-1231. 2004.
- ZHU QX, SHEN T, DING R, LIANG ZZ, ZHANG XJ. Cytotoxicity of trichloroethylene and perchloroethylene on normal human epidermal keratinocytes and protective role of vitamin E. *Toxicology*. 2005 Apr 1;209(1):55-67. Epub 2005 Jan 7.