



UNIVERSIDAD DE OVIEDO



Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

MASTER EN BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR

CURSO 2013-2014

“Modulación de la apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon mediante compuestos bioactivos”

Saúl Redondo Blanco

Julio 2014

Trabajo Fin de Máster

Agradecimientos.

En primer lugar quiero agradecer a mi tutor Felipe Lombó por buscarme un huequecito en su laboratorio y darme la oportunidad de hacer este Trabajo Fin de Máster. Por su ayuda, su cercanía y por tener siempre un momento para charlar o comentar los resultados de un experimento.

Quiero agradecer a todos mis compañeros de laboratorio, Javier, Germán y en especial a Laura, por sus consejos y los miles de millones de preguntas que amablemente me respondió. Entre todo me habéis hecho sentir a gusto desde el primer día.

Muchas gracias a Marcos García, que en tiempo record me instruyó en las bases del cultivo de células animales. Sin su ayuda ni las facilidades que me dio para trastear en su laboratorio este TFM no hubiera sido posible.

También a Víctor y a Cristóbal, que convirtieron tardes lluviosas y aburridas en agradables conversaciones acompañadas de unas cuantas cervezas, quizás demasiadas en alguna ocasión.

Y finalmente gracias a Leticia, por el apoyo incondicional. Por haber “surcado los mares en nuestro barco de vela” durante este año.

Buena suerte a todos en el futuro.

Listado de abreviaturas:

5-FU: 5-Fluorouracilo.

APC: Del inglés *Adenomatous Polyposis Coli*.

BAX: Del inglés *BCL2-Associated X protein*.

CCR: Cáncer Colorrectal.

CIMP: Del inglés *CpG Island Methylator Phenotype*.

CIN: Del inglés *Chromosome Instability*.

DCC: Del inglés *Deleted in Colorectal Carcinoma*.

DMEM: Del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*.

dTMP: Del inglés *Deoxythymidine Monophosphate*.

dTTP: Del inglés *Deoxythymidine Triphosphate*.

EGF: Del inglés *Epidermal Growth Factor*.

EROs: Especies Reactivas de Oxígeno.

FBS: Del inglés *Fetal Bovine Serum*.

FdUMP: Del inglés *5- Fluorodeoxyuridine Monophosphate*.

FdUTP: Del inglés *5- Fluorodeoxyuridine Triphosphate*.

FUTP: Del inglés *5- Fluorouridine Triphosphate*.

IC: Intervalo de Confianza.

KRAS: Del inglés *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*.

MAPK: Del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinase*.

MDA: Del inglés *Malondialdehyde*.

MLH1: Del inglés *MutL Homologue 1*.

MSH2: Del inglés *MutS Homologue 2*.

MSH6: Del inglés *MutS Homologue 6*.

MSI: Del inglés *Microsatellite Instability*.

MUTYH: Del inglés *MutY Homologue*.

PBS: Del inglés *Phosphate-Buffered Saline*.

PI3K: Del inglés *Phosphoinositide 3-Kinase*.

PI3KCA: Del inglés *Phosphoinositide 3-Kinase Catalytic subunit Alpha*.

PMS2: Del inglés *Postmeiotic Segregation increased 2*.

RR: Riesgo Relativo.

TGFBR2: Del inglés *Transforming Growth Factor Beta Receptor II*.

TGF- β : Del inglés *Transforming Growth Factor-Beta*.

TNM: Del inglés *Tumor-Node-Metastasis*.

TP53: Del inglés *Tumor Protein p53*.

TS: Del inglés *Thymidylate Synthase*.

Índice de contenidos.

1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	9
2.1. Cáncer colorrectal	9
Epidemiología.....	9
Factores de riesgo y prevención.	9
Síndromes familiares de predisposición al cáncer colorrectal.	14
Patogénesis y genética.	15
Detección, diagnóstico y estadificación.....	17
2.2. Tratamiento del cáncer colorrectal.	18
5-Fluorouracilo.	20
2.3. Compuestos bioactivos naturales y cáncer.	21
Resveratrol.....	22
2.4. Evaluación de la interacción entre varias drogas.	23
3. OBJETIVOS.....	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1. Compuestos químicos.	27
4.2. Cultivo de células animales.	27
4.3. Ensayo de viabilidad.	27
4.4. Evaluación de la muerte celular. Apoptosis y necrosis.	28
4.5. Determinación de la duración del ciclo celular.....	29
4.6. Evaluación de las combinaciones.....	29
4.7. Análisis estadístico.	30
5. RESULTADOS	31
5.1. Viabilidad celular.	31
5.2. Isoblograma e índice de combinación.....	34
5.3. Efectos sobre la inducción de apoptosis/necrosis y sobre el ciclo celular.....	35
6. DISCUSIÓN	37

7. CONCLUSIONES	40
8. BIBLIOGRAFÍA.....	41

1. RESUMEN

El cáncer colorrectal es una enfermedad muy heterogénea causada por la interacción de factores genéticos y ambientales. Es uno de los cánceres con mayor incidencia en todo el mundo, especialmente en países desarrollados.

El tratamiento se basa en cirugía durante las etapas iniciales, acompañada de quimio y radioterapia a partir del estadio III. Para estos tratamientos adyuvantes se utilizan fármacos como el 5-fluorouracilo, con fuertes efectos secundarios y una tasa de respuesta relativamente baja.

Las aproximaciones combinatorias en el manejo del cáncer tienen como objetivo diseñar combinaciones de fármacos y compuestos moduladores que potencien el efecto del tratamiento. Así, en este trabajo Fin de Máster se propone que distintos nutraceuticos, como la quercetina, el kaempferol y el resveratrol, podrían potenciar el efecto antitumoral del 5-fluorouracilo. Los resultados indican que el resveratrol, una molécula que ha demostrado tener propiedades quimiopreventivas y antitumorales, modula el efecto del 5-fluorouracilo en la línea de cáncer de colon HCT116, potenciando la producción de muerte celular e induciendo una disminución en la fase S del ciclo celular.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Cáncer colorrectal.

Epidemiología.

El cáncer colorrectal (CCR), con 1,2 millones de nuevos casos registrados en todo el mundo durante el año 2008, es el tercer tipo más frecuente de cáncer (19,4% del total), solo superado por el cáncer de pulmón y de mama. Durante el mismo año causó 608.000 muertes, estableciéndose como el cuarto tipo de cáncer con más mortalidad. Las tasas de incidencia son sustancialmente mayores en hombres que en mujeres, en una proporción de 1,4:1 [1].

Existen datos epidemiológicos más recientes y detallados sobre esta enfermedad en Europa, donde se contabilizaron, en el año 2012, 447.000 nuevos casos. Las 215.000 muertes provocadas lo sitúan como el segundo tipo de cáncer en cuanto a mortalidad en el continente europeo [2]. En España, es el más frecuente de todos los cánceres, con 33.240 nuevos casos durante 2012 y el segundo en cuanto a mortalidad, ocasionando 14.700 muertes [3].

A pesar de los programas de detección temprana que se han implementado en muchos países, la prevalencia de este tipo de cáncer sigue aumentando con el paso de los años [4]. Teniendo en cuenta la progresión actual en la tasa de incidencia, se estima que para el año 2030 el número de diagnósticos al año se haya incrementado en un 77%, lo que supondrá 2,2 millones de nuevos casos anuales [5].

Factores de riesgo y prevención.

El cáncer colorrectal normalmente aparece de forma esporádica, afectando a individuos que carecen de una predisposición genética conocida. Solo en un 2-5% de los casos esta enfermedad es consecuencia de síndromes heredables de modo mendeliano con alta penetrancia [6]. Además, en un 10-30% de los pacientes existe

un contexto familiar de cáncer de colon cuyas causas genéticas no corresponden a dichos síndromes y que aún no han sido completamente caracterizadas [7].

Un estudio publicado por Haenszel y Kurihara en 1968 [8] puso en evidencia un aumento en la incidencia del cáncer de colon en poblaciones que emigraban desde Japón, una zona de bajo riesgo para esta enfermedad, a Estados Unidos, una región de alto riesgo. Estos resultados hicieron pensar que los factores ambientales, y en concreto la dieta, influyen en la frecuencia con la que se manifiesta esta patología.

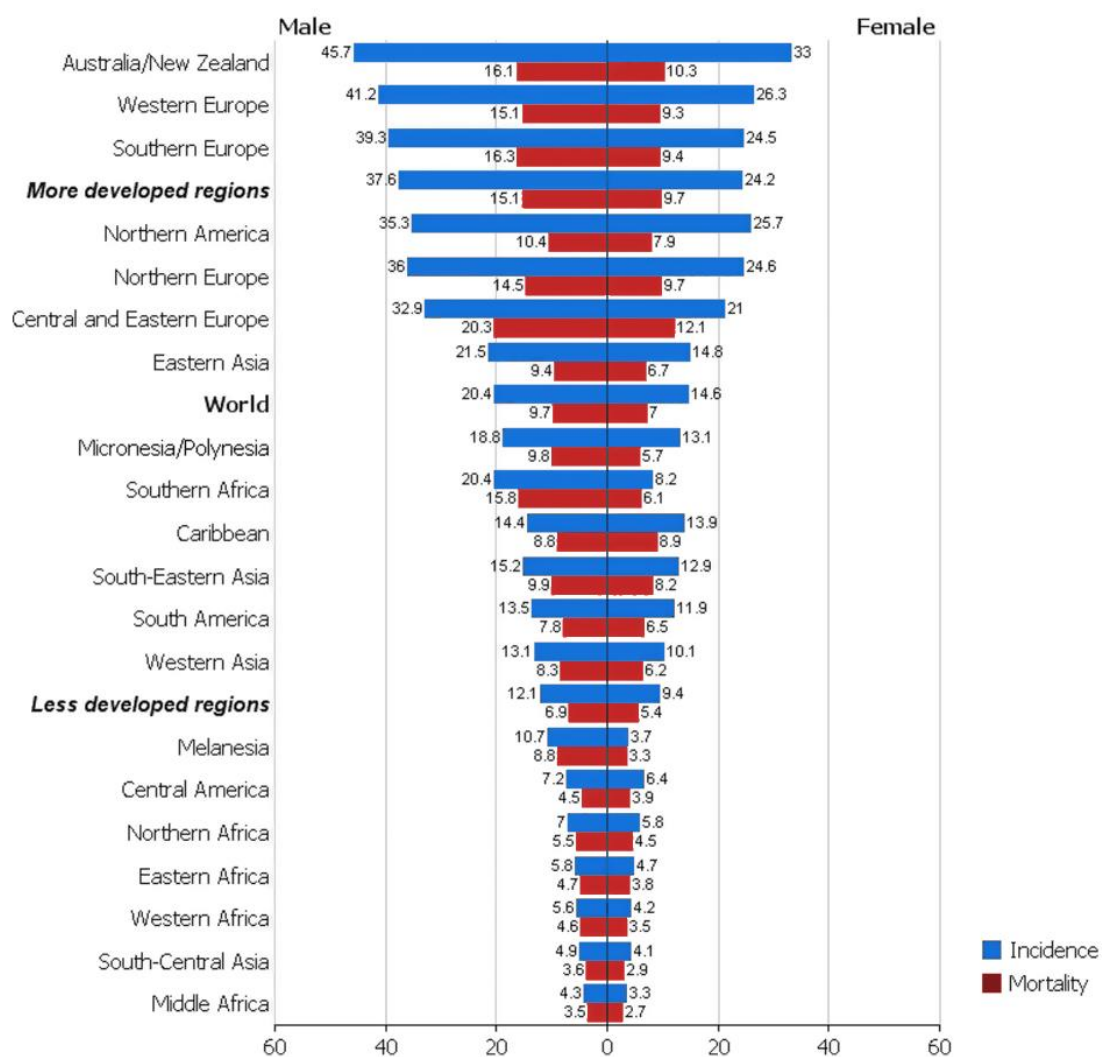


Figura 1. Tasas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad en hombres y mujeres de diferentes países y regiones. Adaptado de [1].

En varios estudios epidemiológicos [1, 9] se ha detectado una fuerte correlación entre el grado de desarrollo de un país y la frecuencia de cáncer

colorrectal en su población (fig. 1). Además, observaciones recientes muestran un paulatino aumento en el número de casos de CCR en los países en vías de desarrollo, a medida que progresa su industrialización y habituación al modo de vida occidental [10]. Todos estos datos en conjunto apuntan al modo de vida y los factores ambientales como elementos trascendentales en la aparición de CCR.

Debido a su potencial importancia en la prevención de este tipo de cáncer, numerosos equipos de investigación se han centrado en identificar los factores ambientales implicados en su iniciación, promoción y progresión [11].

El consumo de carne roja (ternera, cerdo, cordero) y productos cárnicos elaborados, elevado y en alza en Europa y Estados Unidos [12], se ha relacionado con un incremento en el riesgo de padecer CCR [13], mientras que no se ha detectado una asociación similar con la carne blanca (aves de corral) ni el pescado. Se han identificado varios mecanismos moleculares que podrían explicar este hecho. En primer lugar, la carne roja presenta concentraciones hasta 10 veces más elevadas de grupo hemo en comparación con la carne blanca. Esta porfirina es degradada por la enzima hemo-oxigenasa 1 en el intestino delgado, liberando hierro en estado ion ferroso, que estimula la formación de peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas del oxígeno (EROs) [14]. Una producción desregulada de dichas moléculas oxidantes puede conducir a la sobreactivación de rutas de proliferación así como desencadenar mutaciones y alteraciones en la expresión génica [15, 16].

Por otra parte, la ingesta de carne roja tiene como consecuencia una elevación de los niveles sanguíneos de malondialdehído (MDA), un agente mutagénico que origina roturas de simple y doble cadena en el ADN [17]. Además, la degradación de los aminoácidos y la creatina de la carne roja cuando es cocinada a altas temperaturas da lugar a aminas heterocíclicas, cuya ingestión se ha observado que induce la producción de tumores en colon, mama y próstata en varios modelos murinos [18].

La ingesta de alcohol también ha sido identificada como uno de los factores del estilo de vida que inciden sobre el riesgo de CCR. Este efecto se observa con dosis superiores a 30 gramos de etanol al día [19]. En este sentido, el consumo de

alcohol tiene consecuencias a corto plazo, a través de la formación de acetaldehído, un carcinógeno producto de su metabolismo [20], y a largo plazo, favoreciendo situaciones de estrés oxidativo [21] y alterando la microbiota intestinal [22].

La relación entre el tabaquismo y el cáncer de colon es consecuencia de la gran cantidad de agentes carcinógenos presentes en el humo del tabaco, como hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas, nitrosaminas y aminas heterocíclicas [23].

También se ha observado que la obesidad y el ejercicio físico influyen sobre el riesgo de CCR, incrementándolo y disminuyéndolo, respectivamente. Un índice de masa corporal superior a 25 kg/m^3 favorece una situación de hiperinsulinemia e inflamación crónica de baja intensidad que puede favorecer la carcinogénesis [24]. Adicionalmente, algunos péptidos y hormonas producidos por los adipocitos, como la leptina, la adiponectina y la resistina, contribuyen en este proceso [25]. El ejercicio físico juega un papel protector mediante la modulación de la sensibilidad a la insulina, la disminución del índice de masa corporal y la reducción del tejido adiposo [26].

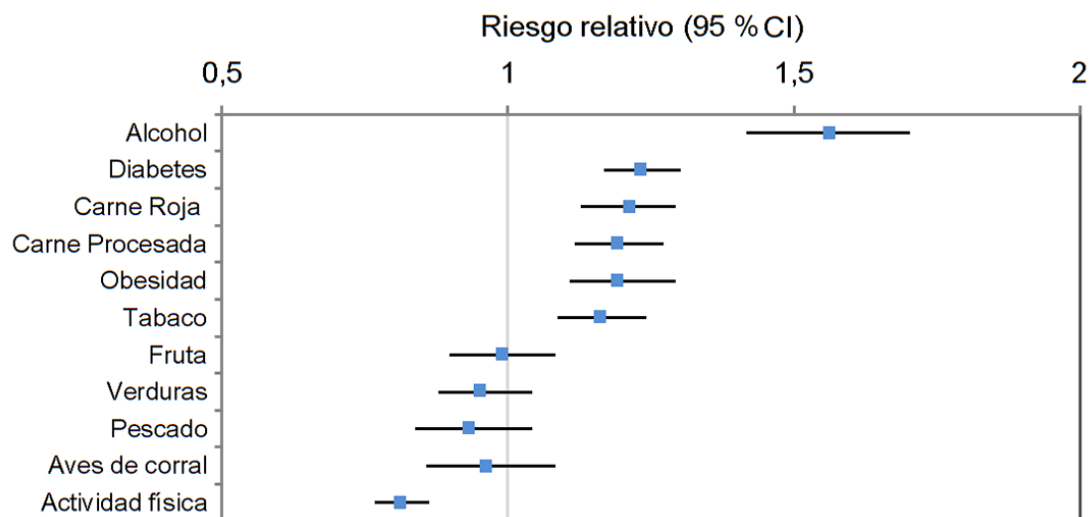


Figura 2. Resumen de la influencia de varios factores dietéticos y del estilo de vida sobre el riesgo de aparición de CCR. Las líneas horizontales representan el intervalo de confianza del 95% y los puntos azules indican el valor del riesgo relativo en cada caso. Las siguientes condiciones se compararon para cada tipo de factor; *Carne roja, elaborados cárnicos, fruta, verduras, pescado y aves de corral*: elevada ingesta frente a ingesta reducida. *Diabetes*: presencia frente a ausencia de la enfermedad. *Alcohol*: ingesta elevada frente a baja o nula. *Tabaco*: fumadores frente a no fumadores. *Ejercicio físico*: elevado frente a bajo o nulo. *Obesidad*: ≥ 30 frente a $\leq 25 \text{ kg/m}^3$. Figura generada utilizando los datos publicados en [27].

Un meta-análisis publicado por Huxley y cols. [27] recoge y examina los datos de 103 estudios epidemiológicos elaborados entre 1966 y 2008 con el fin de cuantificar el impacto que tiene cada uno de los factores de riesgo sobre la aparición del cáncer colorrectal. Para cada uno de ellos, se calculó el riesgo relativo (RR) y un intervalo de confianza (IC) del 95%. Los resultados (fig. 2) indican que el factor más influyente es el consumo de alcohol, que puede aumentar el riesgo de padecer CCR hasta en un 60%. Asimismo, la diabetes, el tabaquismo, la obesidad y un elevado consumo de carne roja y elaborados cárnicos, provocan un aumento del riesgo en torno a un 20%. La disminución del riesgo derivada de practicar ejercicio físico frecuente es de un 20%.

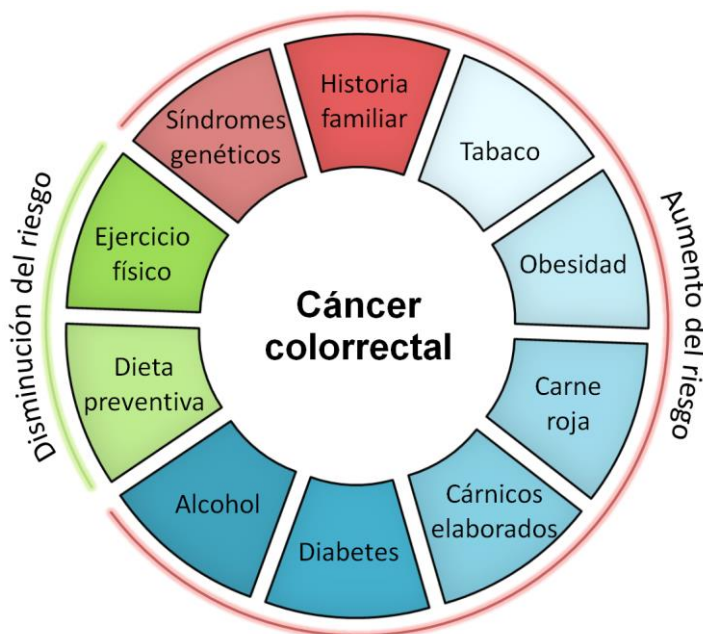


Figura 3. Resumen de los factores que influyen en la aparición del CCR.

En color rojo y azul, respectivamente, factores genéticos y del estilo de vida que aumentan el riesgo de aparición de la enfermedad. En verde, factores preventivos o que disminuyen dicho riesgo.

Además del ejercicio físico, en algunos estudios se ha evidenciado una relación entre determinados hábitos de alimentación y un menor riesgo de padecer CCR. Este es el caso de las dietas con alto contenido en fibra. La ingesta de fibra favorece la producción de ácidos grasos de cadena corta, como el butirato, por parte de la microbiota intestinal, y se ha observado que estas moléculas inducen apoptosis en líneas celulares de CCR [23]. También se ha sugerido que dicho efecto preventivo esté mediado por una serie de moléculas abundantes en los alimentos ricos en fibra, como polifenoles, carotenoides, terpenos y organosulfurados [28]. En concreto, la curcumina, la silibina, la epigallocatequina-3-galato y el extracto de

semilla de uva (que contiene, entre otros compuestos fenólicos, resveratrol [29]) han demostrado reducir el riesgo de CCR [23].

Otro grupo de nutrientes con posibles propiedades preventivas son las vitaminas del grupo B. El caso del ácido fólico (vitamina B9) es singular, ya que solo las concentraciones fisiológicas juegan un papel protector, y tanto su deficiencia como una suplementación abusiva aumentan el riesgo de padecer CCR [30, 31].

Síndromes familiares de predisposición al cáncer colorrectal.

Al igual que en el caso de los factores ambientales que influyen sobre la aparición de CCR, el conocimiento de los síndromes genéticos relacionados resulta esencial en la prevención y manejo de la enfermedad. Los más conocidos y frecuentes son el síndrome de Lynch y la poliposis adenomatosa familiar [7].

El síndrome de Lynch, también denominado cáncer colorrectal hereditario no polipósico, es la causa de entre el 2 y el 4% de todos los casos de CCR. Está provocado por la herencia de una mutación germinal en una de las copias de un gen de reparación de apareamientos erróneos del ADN, como *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, y *PMS2*. Una mutación somática inactiva la copia funcional restante, desencadenándose una situación de inestabilidad microsatelital debida a la incapacidad de reparar las mutaciones causadas por los errores de apareamiento durante la replicación del ADN [32]. El riesgo de que un individuo afectado por este síndrome desarrolle CCR en algún momento de su vida es del 52% en mujeres y 69% en hombres [33].

La poliposis adenomatosa familiar, de herencia autosómica dominante, ocasiona menos del 1% del total de CCR, pero se trata de un síndrome con penetrancia prácticamente completa, es decir, el riesgo de que los afectados desarrollen CCR durante su vida está muy cerca del 100%. Está causado por una mutación germinal en el gen *APC* (del inglés *Adenomatous Polyposis Coli*), que codifica una proteína reguladora de la degradación de β -catenina. Cuando la β -catenina se acumula en exceso, se transloca al núcleo y activa la transcripción de genes promotores de proliferación. Mutaciones en los extremos 3' o 5' del gen *APC*

se asocian a una variante menos agresiva de la enfermedad, a la que se denomina poliposis adenomatosa familiar atenuada [34].

Además de los mencionados, existen otros síndromes de predisposición al CCR menos frecuentes y que se han caracterizado recientemente: La poliposis asociada a *MUTYH*, la poliposis hiperplásica, el síndrome de Peutz-Jeghers y la poliposis juvenil. [34] La enfermedad de Crohn y la gastritis ulcerosa también aumentan el riesgo de padecer CCR [35].

Por lo general, estos síndromes incrementan el riesgo al hacer que el afectado porte, desde su nacimiento, mutaciones en genes que se ven alterados mediante mutaciones somáticas en los casos esporádicos de CCR.

Patogénesis y genética.

El CCR consiste en una progresiva acumulación de cambios genéticos y epigenéticos que conllevan a la transformación de la mucosa digestiva en un cáncer invasivo [36]. El punto de inicio de la enfermedad es un pólipo adenomatoso benigno, cuyo desarrollo da lugar a un adenoma avanzado, que progresa hacia un carcinoma. Los estadios I y II del sistema TNM (del inglés *Tumor-Node-Metastasis*), corresponden a tumores confinados dentro de la pared del colon. Si la enfermedad no es tratada en estas fases, se extenderá hacia los nódulos linfáticos (estadio III) y formará metástasis (estadio IV) [37].

Independientemente de su causa, ya sea a raíz de un síndrome o como consecuencia de la influencia de factores ambientales, el cáncer colorrectal es el resultado de una situación de inestabilidad genómica que favorece la adquisición de nuevas mutaciones y que, en último término, descontrola los mecanismos celulares de proliferación, diferenciación, migración y apoptosis [38].

Esta inestabilidad genómica puede desencadenarse a través de tres vías: Inestabilidad cromosómica (CIN, del inglés *Chromosome Instability*), inestabilidad de microsatélites (MSI, del inglés *Microsatellite Instability*) y el fenotipo metilador de islas CpG (CIMP, del inglés *CpG Island Methylator Phenotype*) [39].

La vía de inestabilidad cromosómica, observada en un 65-70% de los casos de CCR [38], ocasiona cambios en el número de cromosomas y defectos en su estructura. De esta forma, se favorece la pérdida de alelos funcionales de genes supresores de tumores, como *APC*, *TP53*, *DCC* y *SMAD4* [40] y la acumulación de mutaciones que activan oncogenes, como *KRAS* [41].

La vía de inestabilidad de microsatélites está provocada por fallos en los sistemas de reparación de apareamientos erróneos del ADN. Esta situación, presente en el síndrome de Lynch y en un 15% de los casos esporádicos de CCR [38], está causada por mutaciones en los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, y *PMS2*. Algunos genes supresores de tumores que contienen secuencias microsatélites pueden inactivarse a través de esta vía. Es el caso de *TGFBR2* (del inglés *Transforming Growth Factor Beta Receptor 2*) y *BAX* (del inglés *BCL2-Associated X protein*) [42].

La tercera forma de inestabilidad se debe al silenciamiento de genes como fruto de una metilación aberrante, que aparece en un 15-20% de los casos esporádicos de CCR [36]. Esta situación acarrea una disminución global en la metilación del genoma y simultáneamente una fuerte metilación en los promotores de algunos genes como *MLH1*, que son de esta forma silenciados [40].

Aunque son muchos los cambios genéticos adquiridos durante la progresión del cáncer, varios genes y vías de señalización son claves en el desarrollo de la enfermedad (fig. 4). Se considera que uno de los eventos iniciales es la mutación de *APC*, que desencadena una activación constitutiva de la vía de señalización Wnt [43]. Además, es una de las mutaciones más frecuentes, un 90% de los pacientes de CCR la poseen. En segundo lugar, la inactivación de *TP53* y *BAX*, que permite a la célula tumoral eludir varios puntos de control del ciclo celular así como la entrada a apoptosis. Normalmente, la inactivación de p53 coincide con la transición entre adenomas de gran tamaño y carcinomas invasivos. En las etapas finales se inactiva el gen *TGFBR2*, que bloquea la vía de señalización de TGF- β .

A la inactivación de estos genes supresores de tumores, le suele acompañar mutaciones activadoras en proto-oncogenes, como *RAF*, *BRAF* y *PI3KCA*.

Se ha observado que el receptor de EGF juega un papel clave en este tipo de tumor, estimulando las cascadas de señalización de MAPK y PI3K, y es una efectiva diana terapéutica cuando no existen mutaciones en elementos controlados por esa vía de señalización, situación que ocurre en algunos grupos de pacientes que poseen KRAS mutado [40].

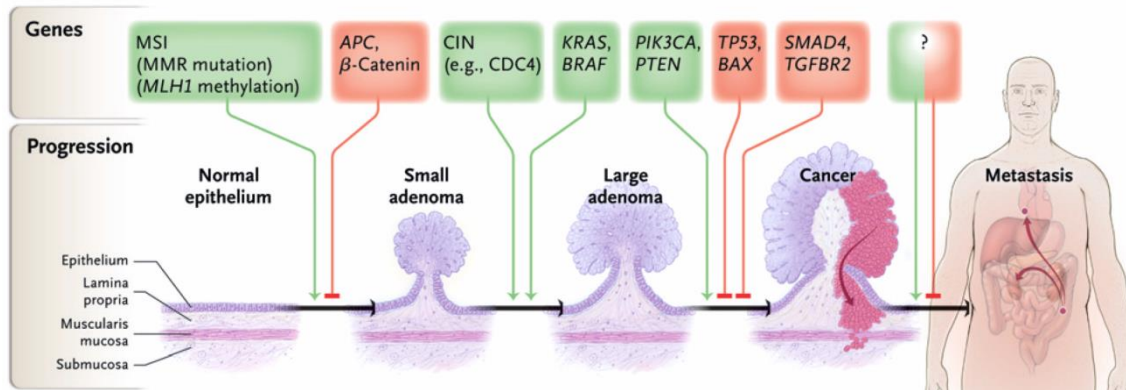


Figura 4. Esquema de los principales genes y vías de señalización que dirigen la progresión del cáncer colorrectal. Las flechas rojas señalan genes supresores de tumores que han de inactivarse para que el tumor continúe su desarrollo y las verdes indican vías, situaciones y oncogenes activados durante dicho proceso [40].

Detección, diagnóstico y estadificación.

La detección temprana del CCR, como en cualquier tipo de cáncer, mejora el pronóstico y aumenta la supervivencia. La tasa de supervivencia a los 5 años del CCR es un 50-60%, que aumenta hasta un 75-90% cuando el diagnóstico se realiza durante las etapas iniciales [36]. Existen varias técnicas y sistemas que permiten localizar y diagnosticar adenomas premalignos o tumores localizados y así evitar el desarrollo de estadios avanzados de la enfermedad [44].

El test más utilizado es la búsqueda de sangre oculta en heces, aunque también es el método menos sensible. La sigmoidoscopia flexible permite la examinación del colon sigmoide y el recto, donde se localizan el 60% de los CCR. Los pólipos pequeños pueden ser eliminados durante la realización de esta prueba. La colonoscopia, un método ligeramente más invasivo y que requiere una mayor preparación del paciente, posibilita la examinación de la totalidad del colon, y se

considera el test estándar para el diagnóstico. La colonografía por TAC es una alternativa no invasiva que permite la detección de lesiones en el intestino grueso

y el recto. Sin embargo, debe tenerse en cuenta la exposición a radiación y la necesidad de una colonoscopia convencional si se encuentra una lesión [44, 45].

Tumor primario (T):	
TX: El tumor primario no puede ser evaluado.	
T0: No hay evidencia de tumor primario.	
Tis: Carcinoma in situ.	
T1: Tumor que invade la submucosa.	
T2: Tumor que invade la muscular propia.	
T3: El tumor invade a través de la capa muscular propia en la subserosa o los tejidos grasos perirrectales.	
T4: Tumor que invade tejidos de órganos adyacentes.	
Ganglios linfáticos regionales (N):	
NX: Los ganglios regionales no pueden ser evaluados.	
N0: No hay metástasis a los ganglios linfáticos regionales.	
N1: Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos regionales.	
N2: Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales.	
Metástasis a distancia (M):	
MX: La presencia de metástasis a distancia no puede evaluarse.	
M0: No hay metástasis a distancia.	
M1: Metástasis a distancia.	
Estadio 0	Tis, N0, M0
Estadio I	T1-2, N0, M0
Estadio IIA	T3, N0, M0
Estadio IIB	T4, N0, M0
Estadio IIIA	T1-2, N1, M0
Estadio IIIB	T3-4, N1, M0
Estadio IIIC	Cualquier T, N2, M0
Estadio IV	Cualquier T y N, M1

Las biopsias tomadas durante colonoscopias o sigmoidoscopias se utilizan para diagnosticar y estadificar el tumor en el sistema TNM (tabla 1). Esta fase es crucial, ya que la efectividad del tratamiento posterior dependerá de la calidad del diagnóstico realizado. Para una localización más precisa del tumor, algo especialmente importante en los pacientes que opten a cirugía, se puede utilizar colonografía por TAC. Esta técnica también permite detectar otras posibles lesiones o pólipos en el colon que pudieron pasar desapercibidas en los exámenes endoscópicos. Si se sospecha que el paciente puede padecer metástasis, se recurre a pruebas de resonancia magnética nuclear, tomografía computarizada o tomografía por emisión de positrones [44].

Tabla 1. Resumen del sistema TNM en cáncer colorrectal.

2.2. Tratamiento del cáncer colorrectal.

La cirugía es el principal procedimiento en los pacientes con CCR potencialmente curable. En los casos de cáncer rectal no metastásico, el tratamiento estándar consiste en resección total del mesorrecto, con los márgenes adecuados, incluyendo linfadenectomía de los ganglios mesentéricos adyacentes. Del mismo modo, el tratamiento de los tumores no metastásicos localizados en el

colon se basa en la realización de una colectomía acompañada de la resección de ganglios linfáticos, de los cuales deben analizarse un mínimo de 12 para evaluar la calidad de la intervención [36].

El riesgo de recurrencia tras la cirugía es elevado, especialmente cuando, por la cercanía del tumor a otros órganos o estructuras del abdomen, no se pueden conseguir los márgenes quirúrgicos adecuados. En estos casos, y en aquellos en los que exista afectación ganglionar (estadio III), se suele administrar un tratamiento adyuvante de quimio y/o radioterapia antes de la cirugía. Se ha comprobado que este procedimiento reduce el riesgo de recidiva y aumenta la supervivencia. Sin embargo, no se han observado beneficios en la aplicación de un tratamiento adyuvante en el estadio I de la enfermedad, y existe controversia sobre su utilidad en el estadio II [36, 46].

Las drogas de primera línea utilizadas para el tratamiento adyuvante son el 5-fluorouracilo (5-FU), normalmente administrado en combinación con leucovorina, y la capecitabina. Diversos estudios publicados en los últimos años han revelado que el tratamiento del cáncer mediante aproximaciones combinatorias resulta mucho más efectivo que la utilización de fármacos de forma individual [47]. Los resultados del ensayo clínico MOSAIC [48] mostraron que la adición de oxaliplatino al tratamiento de 5-fluorouracilo produce un aumento significativo en la supervivencia de los pacientes. Por ello, en la actualidad, estas drogas se administran en combinaciones, entre las que destacan FOLFOX (5-fluorouracilo, leucovorina y oxalaplato) y CapeOx (capecitabina y oxalaplato) [36, 46].

En torno a un 50% de los pacientes de CCR desarrollan metástasis, de las cuales un 20% se producen en el hígado. En estos casos, la cirugía continúa siendo una opción si varios marcadores pronósticos, como el número de metástasis y su tamaño, son favorables. El tratamiento quimioterápico para el CCR metastásico se basa en diferentes formulaciones de las drogas ya mencionadas, que en ocasiones se administran junto a distintos tipos de terapia dirigida basada en anticuerpos monoclonales, como bevacizumab, cetuximab o panitumumab [36].

5-Fluorouracilo.

La fluoropirimidina 5-fluorouracilo, cuya efectividad en el tratamiento del CCR ha sido comprobado en diversos estudios [46], puede ser considerada una de las primeras moléculas diseñadas para actuar sobre una diana concreta. Fue concebida y sintetizada en la década de los 50 por Charles Heidelberger, en base a las evidencias que se tenían de que las células tumorales incorporan en el ADN una cantidad de uracilo mucho mayor que las células normales [49].

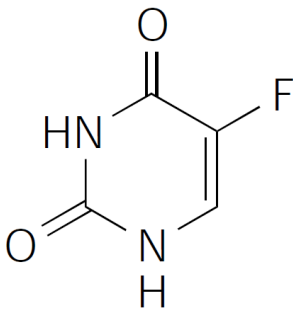


Figura 5. Estructura química de 5-fluorouracilo.

5-FU forma parte de los quimioterápicos conocidos como antimetabolitos. Este tipo de fármacos pueden actuar siendo incorporados en macromoléculas o inhibiendo procesos biosintéticos esenciales para las células. 5-FU ejerce ambas acciones, incorporándose en el ADN y el ARN e inhibiendo la enzima timidilato sintasa (TS) [50].

5-FU es un análogo del uracilo, en el que se ha introducido un átomo de flúor sustituyendo el hidrógeno del carbono 5 (fig. 5). En el interior de la célula, a la que accede a través de mecanismos de transporte facilitado, es convertido en varios metabolitos activos (fig. 6). Entre ellos, 5-fluorodesoxiuridina trifosfato (FdUTP), que se incorpora en el ADN, 5-fluorouridina trifosfato (FUTP), que se incorpora en el ARN, y 5-fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), que bloquea el sitio activo de TS.

La incorporación de FdUTP en el ARN interrumpe su funcionamiento normal, y no solo afecta a los mensajeros, sino también a ARNs ribosomales y transferentes. El bloqueo de TS detiene la producción de timidilato (dTMP), lo que causa una depleción de desoxitimidina trifosfato (dTTP) y del resto de nucleótidos a través de varios mecanismos de retroalimentación. Todo ello conduce a un desajuste en la síntesis de ADN [50, 51].

Aunque se ha demostrado que las terapias basadas en 5-FU aumentan la supervivencia de los pacientes con CCR avanzado, solo un 10-15 % responde al tratamiento. Es por ello que se han realizado una gran cantidad de investigaciones enfocadas a modular la actividad antitumoral de 5-FU con otros fármacos. Se han obtenido resultados positivos, en mayor o menor medida, con oxaliplatino, leucovorina, irinotecán, antioxidantes y antiinflamatorios no esteroideos [48, 52].

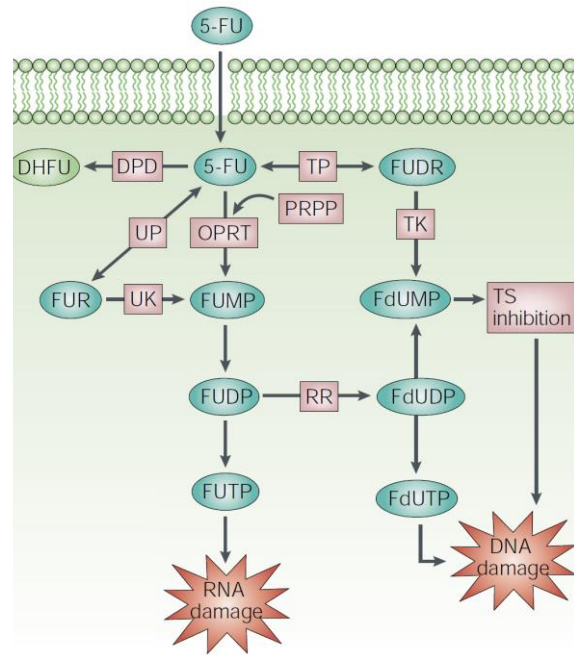


Figura 6. Metabolismo de 5-FU.

A pesar de la optimización de los tratamientos y las combinaciones utilizadas, los efectos secundarios de las terapias basadas en 5-FU continúan siendo severos, y se siguen buscando moléculas moduladoras que potencien su efecto antitumoral y permitan reducir las dosis.

2.3. Compuestos bioactivos naturales y cáncer.

Las frutas y verduras son una importante fuente de sustancias que previenen el cáncer. Así lo indican los más de 250 estudios que han detectado una correlación entre consumir alrededor de cinco raciones de fruta y verdura al día y un menor riesgo de padecer cáncer. El efecto biológico de cada uno de los diferentes nutraceuticos contenidos en este tipo de alimentos es el resultado de una combinación de eventos intracelulares sobre la reparación del ADN, la progresión del ciclo celular, la proliferación, diferenciación y apoptosis y los cambios en la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores [28].

Entre las moléculas de este tipo que más han llamado la atención de los investigadores se encuentra la capsaicina, la curcumina, la epigallocatequina-3-

galato, la genisteína y el resveratrol. Todas ellas tienen la capacidad de actuar, entre otros mecanismos, a través de la activación de NF- κ B y AP1, factores de transcripción que constituyen un punto de convergencia de varias vías de señalización [28, 53].

Resveratrol.

El resveratrol, nombre común del *trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno, es un polifenol (figura 7) identificado en más de 70 especies de plantas, entre las que destaca la uva (*Vitis vinifera*), y que constituye el principal ingrediente antioxidante del vino tinto. Se trata de una fitoalexina producida *de novo* por las plantas en respuesta al ataque de microorganismos patógenos, sobre los que actúa como inhibidor de la proliferación [28, 47].

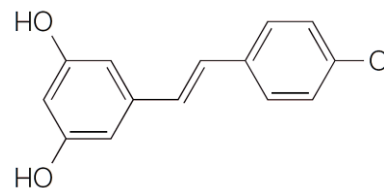


Figura 7. Estructura química del *trans*-resveratrol.

Durante los últimos 15 años se han puesto de manifiesto las propiedades preventivas y terapéuticas del resveratrol en numerosos modelos, tanto *in vitro* como *in vivo* [54]. Se han descrito dos vías a través de las cuales el resveratrol actúa como agente antitumoral:

En primer lugar, el resveratrol posee efectos antiproliferativos. Una de las características de las células tumorales es su capacidad para evadir los puntos de control del ciclo celular e iniciar una proliferación incontrolada. En el cáncer de colon esto sucede principalmente como consecuencia de mutaciones en *APC*. Por otro lado, el resveratrol también provoca una entrada de las células en apoptosis, activando tanto la vía extrínseca como la intrínseca. Además, el resveratrol produce una disminución en el número de criptas aberrantes en ratas tratadas con carcinógenos como nitrosaminas o aminas heterocíclicas y reduce el número de tumores que desarrollan los ratones *APC*^{Min}, un modelo de poliposis adenomatosa familiar [55].

La gran cantidad de evidencias sobre las propiedades beneficiosas del resveratrol han desencadenado la puesta en marcha de varios ensayos clínicos

para comprobar sus efectos en humanos. Los principales objetivos de estos ensayos son determinar la seguridad de la administración de resveratrol en humanos, y conocer su farmacocinética y metabolismo. Se ha determinado que el resveratrol es seguro en dosis únicas de 5 gramos diarios [56], aunque se desconocen los posibles efectos adversos a largo plazo. Una observación a tener en cuenta es la detección de hasta 17 metabolitos derivados en plasma, orina y otros tejidos tras la administración de resveratrol. La participación de estos derivados en el efecto conjunto del tratamiento está bajo debate [57]. Las propiedades antitumorales observadas *in vitro* y en modelos animales aún no han sido confirmadas en humanos [54].

Independientemente de sus propiedades antitumorales, se ha sugerido que el resveratrol podría servir para *sensibilizar* a los tumores frente a algunos tratamientos mediante sus efectos sobre la proliferación y la apoptosis. Esto se ha comprobado *in vitro*, donde el resveratrol potencia el efecto de quimioterápicos como la vincristina, la doxorubicina o el taxol, e *in vivo*, donde se ha observado que posee actividad sinérgica junto a gemcitabina en el tratamiento de cáncer de páncreas en un modelo murino [58].

Además del resveratrol, muchos otros fitoquímicos se han propuesto y estudiado para utilizarse como moduladores de la actividad de diferentes drogas. Es el caso de algunos flavonoles como la quercetina y el kaempferol [59].

2.4. Evaluación de la interacción entre varias drogas.

La evaluación de la interacción entre fármacos es importante en farmacología, especialmente en el ámbito de la oncología, donde con frecuencia se utilizan tratamientos que combinan varias drogas. La naturaleza y el alcance cuantitativo de la interacción entre fármacos se suele determinar mediante estudios *in vitro* [60].

El efecto de dos fármacos en combinación sobre un sistema biológico puede ser igual o diferente al observado con cada uno de ellos por separado. Si sucede lo primero, no existe interacción entre ambos y se dice que los fármacos se

comportan de forma aditiva. Por el contrario, si el efecto es diferente al que producen cuando actúan por separado, los fármacos están interactuando entre sí [61].

Las revisiones de Greco, Brave y Parsons [62] y Berenbaum [63] describen varios métodos y modelos con los que calcular el efecto de la interacción entre dos fármacos. Estos autores consideran que el más adecuado es el Modelo de Aditividad de Loewe. Dicho modelo asume que una droga no puede interactuar consigo misma y tiene en cuenta una relación sigmoideal entre concentración y efecto. Existen varios métodos de evaluación basados en el modelo de aditividad de Loewe, los más utilizados son el isoblograma y el índice de combinación o interacción [60].

El índice de interacción (γ) se puede definir mediante la expresión (1), donde CI_xA y CI_xB son las concentraciones de los compuestos A y B para que, por separado, produzcan un efecto biológico x , normalmente un porcentaje de inhibición respecto al control. $C_{a,x}$ y $C_{b,x}$ son las concentraciones de los compuestos A y B que, en combinación, producen el mismo efecto biológico x [64].

$$(1) \quad \text{Índice de combinación } (\gamma) = \frac{C_{a,x}}{CI_xA} + \frac{C_{b,x}}{CI_xB}$$

Si $\gamma = 1$ la interacción es aditiva. Si $\gamma > 1$ los dos compuestos son antagonistas entre sí y su efecto conjunto es menor que la suma de sus efectos por separado. Por último, si $\gamma < 1$ ambos compuestos actúan sinérgicamente y su efecto conjunto es mayor que la suma de sus efectos por separado [64].

Un isoblograma es la representación gráfica de las concentraciones equiefectivas de dos fármacos. Los detalles sobre su construcción se comentan en la figura 8. Isoblograma e índice de interacción aportan de forma gráfica y numérica, respectivamente, la misma información sobre la interacción de dos moléculas [65].

A pesar de las limitaciones que presentan estos métodos, como la imposibilidad de representar variabilidad de datos o la necesidad de representar cada efecto biológico en una gráfica independiente, estas representaciones

permiten a los investigadores visualizar los datos de interacción de forma sencilla [60].

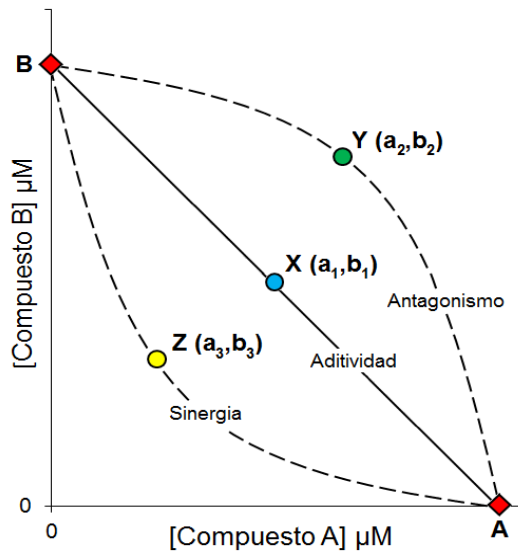


Figura 8. Ejemplo de isoblograma. Los puntos A y B indican las dosis de los compuestos A y B que, por separado, producen un efecto biológico predefinido, por ejemplo, la inhibición del 50% del crecimiento respecto al control.

La línea que los une se denomina recta de aditividad o no interacción. Los puntos X, Y y Z representan las dosis de los mismos compuestos (a,b) que, en combinación, producen el mismo efecto biológico predefinido.

Se incluyen las tres situaciones posibles en cuanto a la interacción de los compuestos: Aditividad (X), antagonismo (Y) y sinergia (Z). a_1, b_1 , a_2, b_2 y a_3, b_3 son, respectivamente, las concentraciones de los compuestos en cada uno de los casos.

3. OBJETIVOS.

En base a los antecedentes descritos, los objetivos de este Trabajo Fin de Master son:

1. Cálculo del efecto de quercetina, kaempferol, resveratrol y 5-fluorouracilo sobre la viabilidad celular en las líneas de cáncer de colon HCT116 y HT29.
2. Determinación del potencial efecto sinérgico de estos nutraceuticos junto al 5-fluorouracilo en la viabilidad de cultivos celulares de CCR.
3. Cuantificación del efecto proapoptótico o pronecrótico de la coterapia de resveratrol con 5-fluorouracilo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Compuestos químicos.

Se han utilizado los flavonoles quercetina y kaempferol, el estilbeno resveratrol y la fluoropirimidina 5-fluorouracilo, suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). Se preparó una solución de almacén 20 mM (en 20% de DMSO) de cada uno de ellos a partir de las cuales se elaboraron las disoluciones con la concentración correspondiente para cada ensayo. La concentración final máxima de DMSO en los cultivos celulares fue de 0,2%.

4.2. Cultivo de células animales.

Todos los ensayos se realizaron con las líneas celulares de cáncer de colon HCT116 y HT29 obtenidas de ATCC (Manassas, VA, EEUU). Fueron mantenidas a 37°C y 5% de CO₂ en medio DMEM (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con suero fetal bovino (SFB) al 10% adquirido en Sigma-Aldrich. Los ensayos se realizaron en placas de poliestireno de 96 o de 12 pocillos.

4.3. Ensayo de viabilidad.

La viabilidad de los cultivos celulares se determinó mediante un ensayo MTT. Se sembraron 2000 células de cada línea por pocillo en placas de 96 pocillos con 100 µl de medio de cultivo suplementado con SFB. 24 h después de la siembra, se añadieron, por triplicado, 5 µl de cada uno los diferentes compuestos a ensayar (las concentraciones finales en placa se detallan en la tabla 2).

Individuales	25, 50, 100 µM	Resveratrol, quercetina, kaempferol	
	2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 µM	5-fluorouracilo	
Combinaciones	2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 µM	5-fluorouracilo	+ 25 µM resveratrol
			+ 25 µM quercetina
			+ 25 µM kaempferol

Tabla 2. Concentraciones utilizadas en los ensayos de viabilidad.

A continuación, tras 48 h de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se añadieron en cada uno de los pocillos 10 µl del kit de recuento celular CCK-8 suministrado por

Sigma-Aldrich. Esta solución contiene WST-8, una sal de tetrazolio que es metabolizada por las células viables dando lugar a formazán, un compuesto coloreado.

2 h más tarde se midió la absorbancia a 450 nm en cada pocillo utilizando un lector de placas Biotek Elx800. Los datos que proporciona este ensayo se expresan en % respecto al control, que en este caso es un triplicado de pocillos a los que únicamente se les había añadido el disolvente utilizado, DMSO al 0,2 %.

4.4. Evaluación de la muerte celular. Apoptosis y necrosis.

Se sembraron 50.000 células por pocillo en placas de 12 pocillos con 2 ml de medio de cultivo suplementado con SFB. Transcurridas 24 h desde la siembra, se añadieron, por duplicado, los compuestos a las concentraciones correspondientes (tabla 3).

Individuales	25 μ M	Resveratrol	
	8 μ M	5-fluorouracilo	
Combinaciones	8 μ M	5-fluorouracilo	+ 25 μ M resveratrol

Tabla 3. Concentraciones de los diferentes compuestos utilizados en los ensayos de apoptosis/necrosis y ciclo celular.

Tras 48 h de incubación, las células se separaron de las placas utilizando 0,5 ml de tripsina al 0,25% de Biochrom (Berlín, Alemania) en cada pocillo durante 2 min. Tras bloquear la acción de la tripsina con medio suplementado con SFB, las células de cada pocillo se lavaron dos veces con PBS (del inglés *Phosphate-Buffered Saline*: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ y 1,8 mM KH₂PO₄) y se obtuvieron por centrifugación a 1200 rpm durante 10 min.

A continuación, el *pellet* de células obtenido en cada caso se incubó durante 10 min con 400 μ l de una mezcla compuesta por 40 μ l de Binding Buffer Annexin V 10x (obtenido de InmunoStep, Salamanca, España), 4 μ l de anexina V FITC (también adquirido en InmunoStep), 2 μ l de solución de yoduro de propidio (suministrada por Sigma Aldrich) y 354 μ l de agua. Finalizada esta incubación,

cada muestra se analizó en el citómetro de flujo (Beckman Coulter Celular Cytomics FC500) hasta contabilizar 10.000 eventos celulares.

Se considera que la población de células positiva para el marcaje con anexina V y negativa para ioduro de propidio se encuentra en apoptosis temprana, mientras que la población positiva para los ambos marcajes corresponde a células en apoptosis tardía o necrosis.

4.5. Determinación de la duración del ciclo celular.

El protocolo de cultivo y obtención del pellet de células para este ensayo es idéntico al del experimento anterior. Las concentraciones de polifenoles y 5-FU utilizadas también son las mismas (tabla 3). Cada pellet se incubó con 3 soluciones distintas antes del análisis de Citometría:

- Una primera incubación, 5 minutos con 125 μ l de tripsina.
- Una segunda incubación de 10 minutos con 150 μ l de una solución de inhibidor de tripsina y RNAsa.
- Finalmente, 10 minutos con 150 μ l de ioduro de propidio 40 μ M.

Cada muestra se analizó en el citómetro hasta contabilizar 10.000 eventos.

4.6. Evaluación de las combinaciones.

Primero se calculó, mediante regresión lineal, la concentración de cada uno de los 4 compuestos ensayados que produce una disminución del 50% en la viabilidad de los cultivos celulares. Este valor se conoce como concentración inhibitoria 50 o CI_{50} .

Del mismo modo, con los resultados de los ensayos con combinaciones se calculó la concentración de 5-fluorouracilo que, junto con 25 μ M de cada polifenol, es necesaria para lograr el mismo efecto inhibitorio en la viabilidad respecto al control. Con estos datos se construyó un isoblograma y se calcularon los correspondientes índices combinatorios siguiendo la ecuación descrita en el punto 2.4.

4.7. Análisis estadístico.

Todos los valores representados en el apartado resultados son las medias \pm la desviación estándar de los datos absolutos, o bien de los porcentajes respecto al control.

La significancia estadística de las diferencias encontradas en los valores de viabilidad, apoptosis y duración del ciclo celular se ha determinado utilizando el test ANOVA de una vía con el software SigmaPlot. Se considera que un valor $P \leq 0,05$ es estadísticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Viabilidad celular.

Los resultados de los ensayos de viabilidad se muestran en las figuras 9 (compuestos individuales) y 10 (combinaciones de compuestos). Los valores CI_{50} para cada compuesto o combinación y línea celular se especifican en la tabla 4.

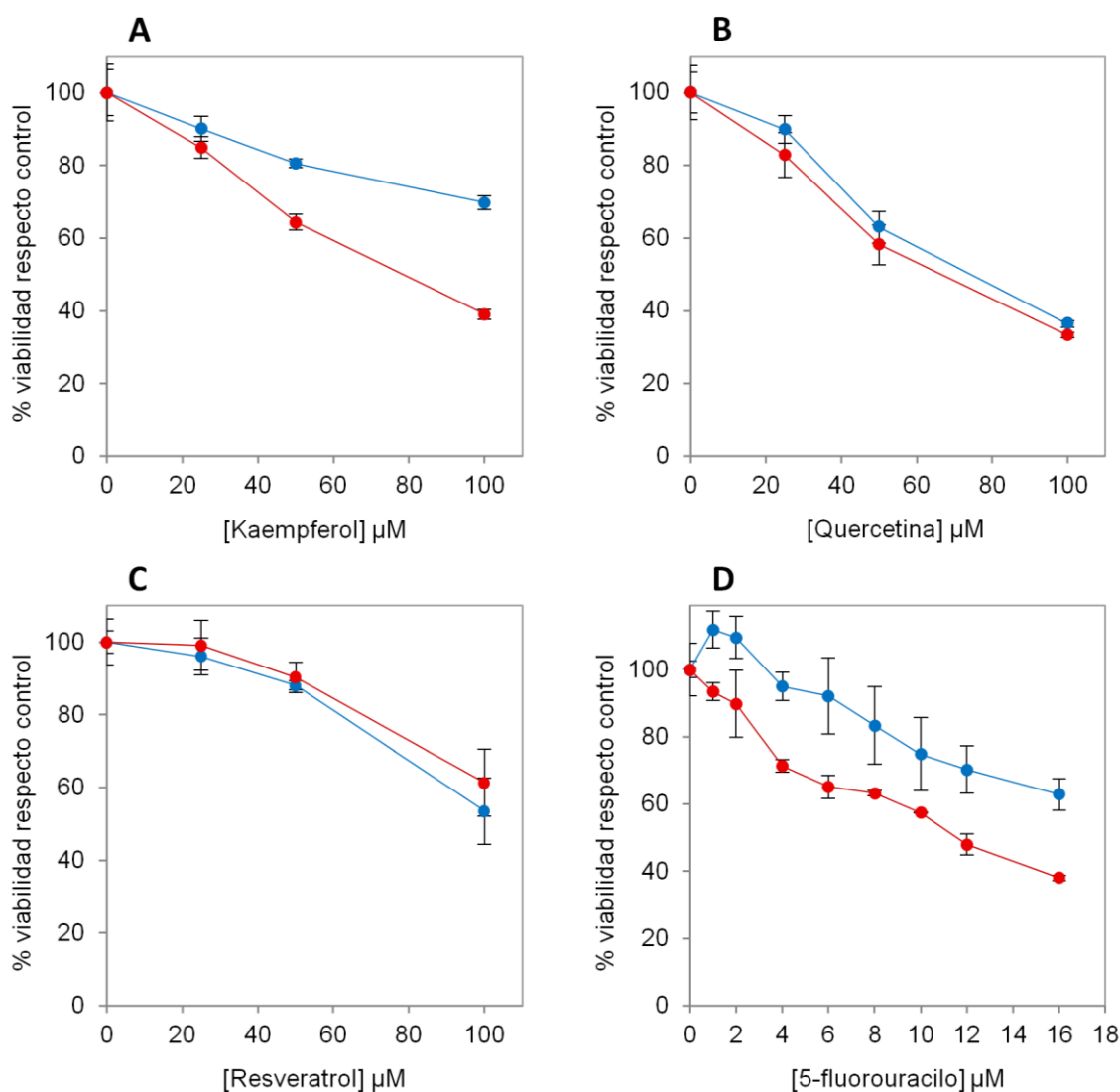


Figura 9. Curvas de respuesta de los cultivos de las líneas celulares HCT116 (trazado azul) y HT29 (trazado rojo) a concentraciones crecientes de kaempferol, quercetina, resveratrol y 5-fluorouracilo. Se representa el % de viabilidad respecto al control \pm desviación estándar.

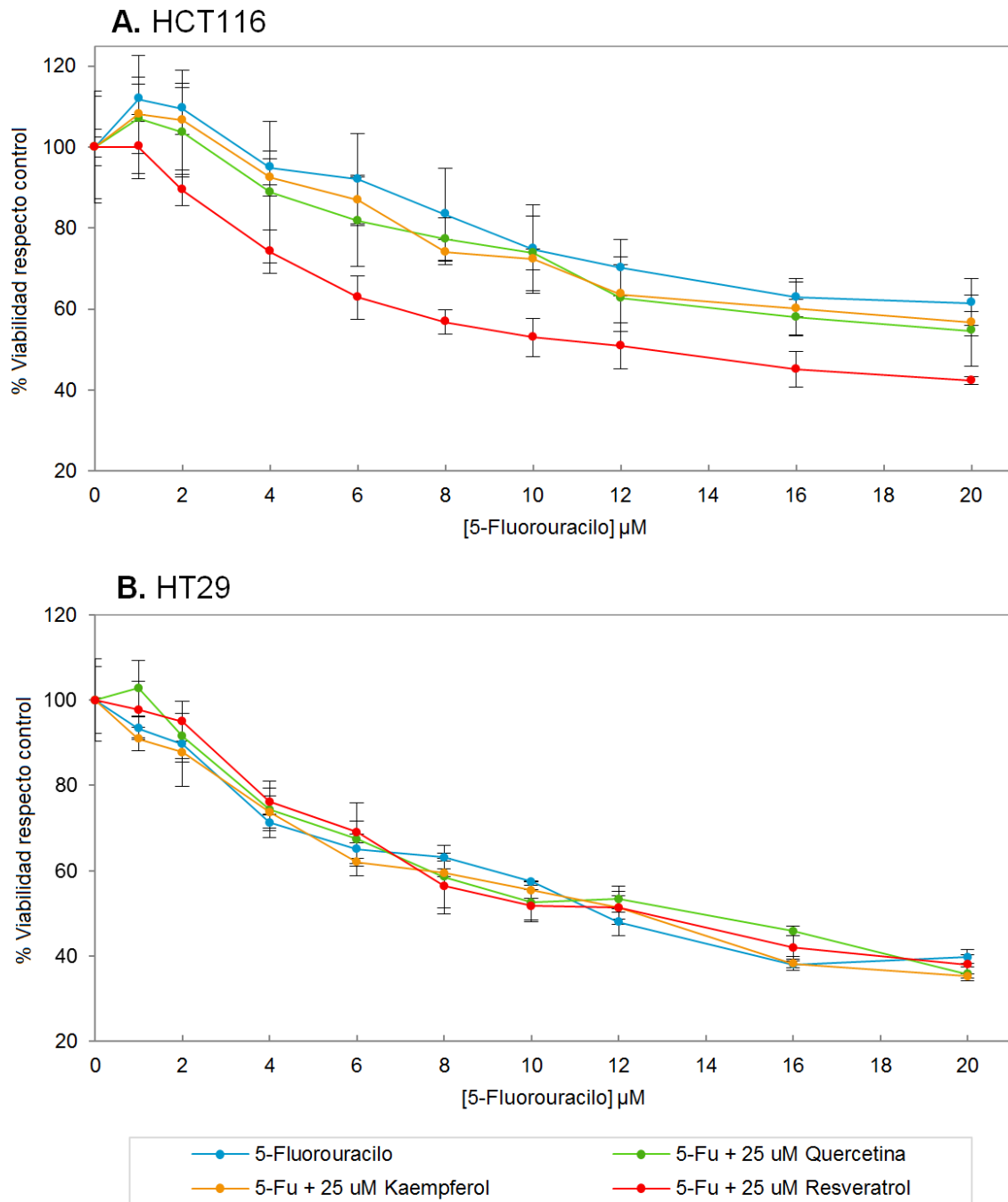


Figura 10. Curvas de respuesta de viabilidad de las líneas celulares HCT116 (gráfica A) y HT29 (gráfica B) ante una serie de concentraciones de 5-fluorouracilo, tanto en solitario (trazado azul) como en combinación con 25 µM de quercetina, kaempferol y resveratrol (trazados verde, naranja y rojo respectivamente). Se representa el % de viabilidad respecto al control \pm desviación estándar.

HCT116		HT29	
Compuesto	CI ₅₀ (μM)	Compuesto	CI ₅₀ (μM)
Kaempferol	161,18	Kaempferol	79,57
Quercetina	77,53	Quercetina	71,29
Resveratrol	119,43	Resveratrol	138,45
5-Fluorouracilo	21,604	5-Fluorouracilo	13,467
5-FU + 25 μM kaempferol	19,511	5-FU + 25 μM kaempferol	12,714
5-FU + 25 μM quercetina	19,102	5-FU + 25 μM quercetina	13,384
5-FU + 25 μM resveratrol	13,933	5-FU + 25 μM resveratrol	13,271

Tabla 4. Valores CI₅₀ de los polifenoles y 5-fluorouracilo por separado y en combinación.

Los resultados indican que, de forma individual, la quercetina es el polifenol más potente, disminuyendo la viabilidad de los cultivos celulares de ambas líneas. En comparación, el resveratrol es un compuesto menos potente, ya que son necesarias concentraciones mayores para causar una disminución del 50% en la viabilidad respecto al control. Con concentraciones bajas de este estilbeno, como 25 μM, prácticamente no se observa ningún efecto.

Los datos de los ensayos con combinaciones muestran que solo el resveratrol, y exclusivamente en la línea HCT116, podría potenciar el efecto del 5-fluorouracilo sobre la viabilidad de los cultivos celulares. En ese caso, la adición de 25 μM de resveratrol produce una reducción del 35,5% en la dosis de 5-FU μM necesaria para lograr una inhibición en la viabilidad del 50%, que disminuye de 21,604 a 13,933 μM.

En la figura 11-A se detalla el efecto de la adición de resveratrol junto con 5-FU en comparación con los efectos de ambos compuestos por separado. En todos los casos la combinación de resveratrol y 5-FU produce una disminución de la viabilidad estadísticamente significativa ($p < 0,05$) tanto en comparación con la situación con solo resveratrol, como respecto a la correspondiente situación con 5-FU en solitario.

Cabe destacar que la adición de 25 μM de quercetina y kaempferol también causa una disminución en la viabilidad de la línea HCT116, pero es mucho más discreta que en el caso del resveratrol y no es estadísticamente significativa

respecto a la situación en la que solo se ensaya el agente quimioterápico. Esto descarta a la quercetina y el kaempferol como posibles moduladores de la actividad del 5-fluorouracilo, al menos con dosis bajas de 25 μ M.

En el caso de la línea celular HT29, ninguno de los tres polifenoles produce una disminución mayor del 6% en la CI_{50} del 5-FU. Debido a esto, el resto de los experimentos se realizaron únicamente con combinaciones de 5-FU y resveratrol.

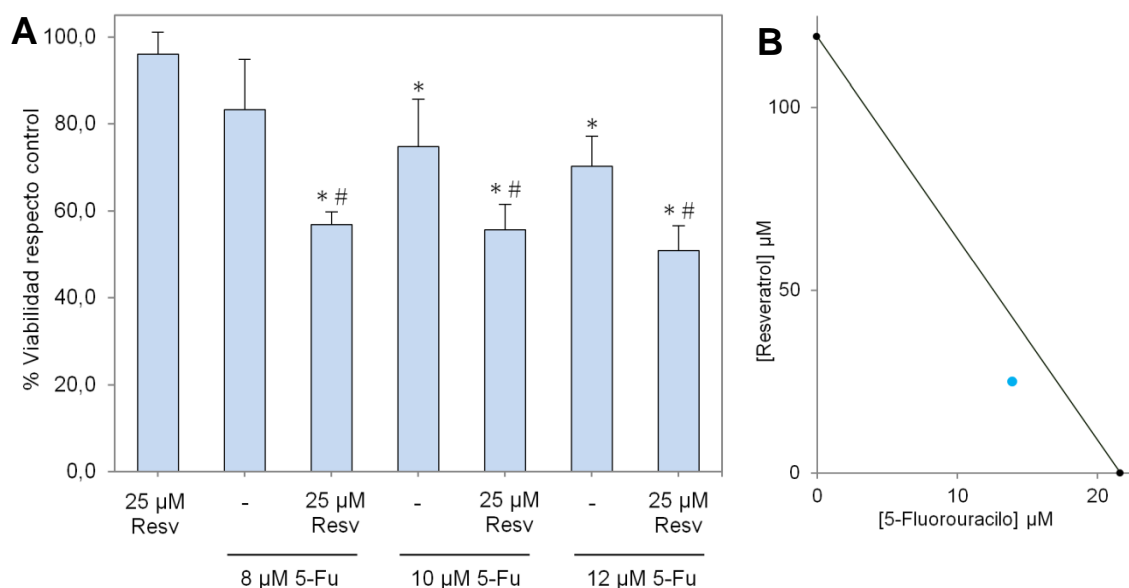


Figura 11. A: Efecto de la adición de 25 μ M de resveratrol sobre la disminución en la viabilidad causada por tres concentraciones de 5-FU: 8, 10 y 12 μ M. *: Diferencias significativas ($p < 0,05$) en la viabilidad respecto a la situación en la que solo se ensayan 25 μ M de resveratrol. #: Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la mezcla de resveratrol + 5-FU y la situación correspondiente en la que solo se ensaya la misma concentración de 5-FU. **B:** Isoblograma para la combinación de resveratrol y 5-FU. Los dos puntos negros indican las dosis necesarias de cada compuesto para conseguir la CI_{50} . El punto azul representa la dosis equiefectiva (CI_{50}) de la combinación de ambos.

5.2. Isoblograma e índice de combinación.

El índice de combinación del resveratrol y el 5-fluorouracilo para la obtención de una inhibición en la viabilidad del 50% es 0,85. Se ha calculado con la ecuación descrita en el apartado 2.4.

$$\text{Índice de combinación } (\gamma) = \frac{C_{a,x}}{CI_{xA}} + \frac{C_{b,x}}{CI_{xB}} = \frac{13,933}{21,604} + \frac{25}{119,43} = \mathbf{0,85}$$

Al ser un valor inferior a 1, indica que ambos compuestos se comportan de forma sinérgica cuando actúan en combinación y su efecto conjunto es mayor que la suma de sus efectos por separado. El isoblograma que ilustra dicho efecto se muestra en la figura 11-B. La ubicación de la dosis equiefectiva de la combinación por debajo de la recta de aditividad pone de manifiesto la capacidad sinérgica de ambos compuestos.

5.3. Efectos sobre la inducción de apoptosis/necrosis y sobre el ciclo celular.

En la figura 13-A se representan los resultados del análisis de la duración del ciclo celular tras la incubación, durante 48 h, con los distintos tratamientos.

La composición del ciclo celular de los cultivos HT29 no cambia con la adición de 25 μM de resveratrol. Sí lo hace el tratamiento con 8 μM de 5-fluorouracilo, que produce un aumento notable en la cantidad de células en fase S en comparación con el control. El efecto de la combinación de ambos fármacos es prácticamente idéntico al provocado por el 5-FU en solitario.

En la línea celular HCT116 el resveratrol sí tiene efectos en solitario, aumentando la proporción de células en fase S prácticamente de la misma forma que lo hace el 5-FU. No obstante, cuando ambos compuestos son añadidos simultáneamente la cantidad de células en fase S disminuye drásticamente.

Los resultados del análisis de muerte celular se presentan en la figura 13-B. Al igual que sucedía con los cambios en la composición del ciclo celular, el resveratrol no produce ningún efecto significativo respecto al control en la línea celular HT29, mientras que 5-FU produce un apreciable aumento tanto en la apoptosis temprana como en la apoptosis total + necrosis. Curiosamente, la adición de resveratrol no solo no potencia, si no que parece reducir la capacidad del 5-FU para inducir muerte celular en las células de la línea HT29.

Sin embargo, en la línea celular HCT116 tanto el resveratrol como el 5-FU producen un aumento significativo en la muerte celular total, incremento especialmente destacable en el segundo caso. Cuando se tratan los cultivos de esta línea con ambos compuestos de forma simultánea, la proporción de células en

muerte celular se acrecienta alcanzando valores mucho mayores que la suma de los efectos de ambas moléculas por separado. Estos valores de apoptosis temprana y apoptosis + necrosis producidos por la mezcla de resveratrol + 5-FU son estadísticamente significativos ($p < 0,001$) respecto a los valores en las situaciones en las que solo se ensaya 5-FU.

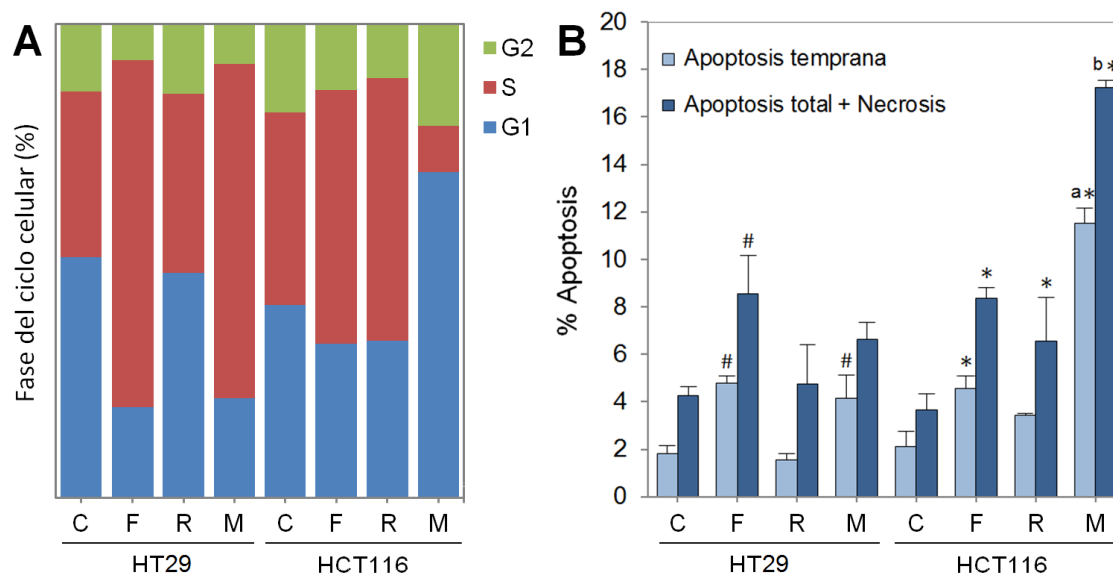


Figura 13. Duración de las distintas fases del ciclo celular (**A**) y medida de la apoptosis temprana y apoptosis total (temprana + tardía) + necrosis (**B**) en HT29 y HCT116. C: Control. R: 25 μ M resveratrol. F: 8 μ M 5-fluorouracilo. M: 25 μ M resveratrol + 8 μ M 5-fluorouracilo. #: Diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores de apoptosis temprana y apoptosis total + necrosis entre las condiciones experimentales y el control correspondiente en HT29. *: Diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores de apoptosis temprana y apoptosis total + necrosis entre las condiciones experimentales y el control correspondiente en HCT116. a: Diferencias significativas ($p < 0,001$) en la apoptosis temprana producida por la combinación de resveratrol y 5-FU respecto a la condición en la que solo se añade 5-FU. b: Diferencias significativas ($p < 0,001$) en la apoptosis total + necrosis producida por la combinación de resveratrol y 5-FU respecto a la condición en la que solo se añade 5-FU.

6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que el resveratrol ejerce un efecto sinérgico a bajas concentraciones junto con el 5-fluorouracilo en la línea celular HCT116. Este efecto queda patente en una reducción de la viabilidad de los cultivos celulares, un incremento en la inducción de muerte celular y cambios en la distribución de las diferentes fases del ciclo celular.

El resto de polifenoles utilizados, quercetina y kaempferol, no han demostrado ningún tipo de actividad sinérgica en combinación con el agente quimioterápico 5-fluorouracilo, al menos en las concentraciones y condiciones que se han empleado. Los efectos biológicos de los compuestos fenólicos suelen ser muy dependientes de la dosis [59], y es posible que a concentraciones mayores los resultados sean diferentes.

Resulta muy interesante que el efecto sinérgico del resveratrol junto al 5-fluorouracilo solo haya sido observado en la línea celular HCT116. Tanto HT29 como HCT116 son líneas celulares derivadas de carcinomas colorrectales primarios. No obstante, poseen diferencias importantes en su fondo genético y presentan, por lo tanto, fenotipos distintos:

HCT116 corresponde a un estadio avanzado de la enfermedad. Mantiene activada la vía de inestabilidad de microsatélites y es positiva para el fenotipo metilador de islas CpG. Sin embargo, no posee mutaciones en *APC* y no existe una situación de inestabilidad cromosómica. HT29 sí tiene activada la vía de inestabilidad cromosómica como consecuencia de mutaciones en el gen *APC*, no presenta inestabilidad de microsatélites y también es positiva para el fenotipo metilador de islas CpG [66].

Además, estas dos líneas difieren en el estado mutacional de algunos genes clave del proceso de carcinogénesis: *KRAS* se encuentra mutado en HCT116 mientras que HT29 posee alelos salvajes. *TP53* es salvaje en HCT116 y está mutado en HT.29. Ambas líneas celulares poseen mutaciones en *PI3KCA*, aunque son diferentes en cada caso [66]. Por último el gen que codifica la β -catenina se encuentra mutado en HCT116 y no en HT29 [67].

Debido a todo esto, cabría esperar que el diferente comportamiento de estas dos líneas celulares en relación a los efectos del resveratrol sea consecuencia de alguna de estas diferencias genéticas.

Existen varias hipótesis que permitirían explicar el mecanismo por el cual el resveratrol produce un aumento en la apoptosis y una disminución en la proliferación de los cultivos celulares de HCT116:

En primer lugar, se ha visto que este estilbeno potencia la actividad de la caspasa 3, una proteína que juega un papel central en la apoptosis y que es activada tanto en la vía extrínseca como en la vía intrínseca [55]. Así, el resveratrol podría intensificar en este punto de la cascada de caspasas la apoptosis desencadenada por el 5-fluorouracilo. Por otro lado, se ha relacionado la endocitosis del resveratrol a través de balsas lipídicas con una activación de factores proapoptóticos en el interior celular [68].

Además, se ha observado que la apoptosis desencadenada por el resveratrol está asociada con la activación de p53 [69, 70]. Este gen supresor de tumores se encuentra mutado e inactivado en la línea HT29, mientras que continúa siendo funcional en HCT116, por lo que aquí podría ser clave en el efecto proapoptótico observado en esta línea celular.

Como se describe en [55], el resveratrol a bajas concentraciones (25 μM), como la utilizada en este trabajo, es capaz de modular y modificar la distribución del ciclo celular. Sin embargo, se requieren concentraciones más altas (por encima de 100 μM) para producir un aumento significativo en la apoptosis y otros tipos de muerte celular. Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo, esto resalta la capacidad del resveratrol para potenciar el efecto proapoptótico del 5-fluorouracilo, ya que la concentración empleada es demasiado baja para tener efectos directos sobre la muerte celular.

Los resultados obtenidos en los experimentos de ciclo celular son los más sorprendentes de este trabajo. Cuando actúan por separado, tanto el resveratrol como el 5-fluorouracilo inducen una parada en la fase S del ciclo celular, que pasa de representar un 40% en el control a un 54% y un 56% respectivamente en las

células tratadas. Teniendo estos datos en cuenta, cabría esperar que la combinación de ambos compuestos actuando simultáneamente tuviera el mismo efecto, o incluso más potente. Sin embargo, ocurre lo contrario: La fase S disminuye hasta representar solo el 12% del ciclo celular.

Varios estudios han observado la capacidad del resveratrol para alterar la distribución del ciclo celular y se considera una de las vías por las que este polifenol puede actuar como agente quimiopreventivo. Se ha visto que la inducción de una parada en fase S afecta incluso a líneas celulares de cáncer de colon con proliferación descontrolada que eluden el punto de restricción al final de la fase G1 [71, 72]. Aunque el mecanismo molecular no se ha descrito, se cree que esta propiedad del resveratrol se debe a su capacidad para modular la expresión de las ciclinas D y E.

Una vez más, los resultados sugieren un efecto sinérgico entre ambos compuestos: Los mecanismos de acción del 5-fluorouracilo, que son su incorporación en ácidos nucleicos y la inhibición de la timidilato sintasa, interfieren en el proceso de duplicación del material genético que las células llevan a cabo durante la fase S. De esta forma, la detención en la fase S producida por el resveratrol podría volver a las células más susceptibles de ser dañadas por el 5-fluorouracilo.

Así, estas células sensibilizadas por el resveratrol a la actuación del 5-fluorouracilo entrarían en muerte celular, produciéndose la disminución en la proporción de células en fase S que se observa en los resultados.

7. CONCLUSIONES

- La quercetina es el polifenol más potente, de forma individual, reduciendo la viabilidad de los cultivos celulares de HCT116 y HT29.
- El resveratrol es el único polifenol utilizado que ha mostrado poseer efectos sinérgicos junto al quimioterápico 5-fluorouracilo en la reducción de la viabilidad de los cultivos de HCT116 y HT29.
- El resveratrol potencia la acción del 5-fluorouracilo en la línea celular HCT116 aumentando la proporción de células que entran en muerte celular y modifica la distribución de las fases del ciclo celular, causando una gran reducción de la fase S respecto al control.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893-917.
2. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, *et al*. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-403.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit K, Eser S, Mathers C, *et al*. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.
4. Bretthauer M. Evidence for colorectal cancer screening. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2010;24(4):417-25.
5. Karsa LV, Lignini TA, Patnick J, Lambert R, Sauvaget C. The dimensions of the CRC problem. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2010;24(4):381-96.
6. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2044-58.
7. Kwak EL, Chung DC. Hereditary colorectal cancer syndromes: an overview. *Clin Colorectal Cancer*. 2007;6(5):340-4.
8. Haenszel W, Kurihara M. Studies of Japanese migrants. I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst*. 1968;40(1):43-68.
9. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, *et al*. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol*. 2008;9(8):730-56.
10. Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(6):1688-94.
11. Derry MM, Raina K, Agarwal C, Agarwal R. Identifying molecular targets of lifestyle modifications in colon cancer prevention. *Front Oncol*. 2013;3:119.
12. Daniel CR, Cross AJ, Koebnick C, Sinha R. Trends in meat consumption in the USA. *Public Health Nutr*. 2011;14(4):575-83.
13. Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, *et al*. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One*. 2011;6(6):e20456.
14. Ishikawa S, Tamaki S, Ohata M, Arihara K, Itoh M. Heme induces DNA damage and hyperproliferation of colonic epithelial cells via hydrogen peroxide produced by heme oxygenase: a possible mechanism of heme-induced colon cancer. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(8):1182-91.
15. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:239-67.

16. Knobel Y, Weise A, Gleis M, Sendt W, Claussen U, Pool-Zobel BL. Ferric iron is genotoxic in non-transformed and preneoplastic human colon cells. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(5):804-11.
17. Toden S, Belobrajdic DP, Bird AR, Topping DL, Conlon MA. Effects of dietary beef and chicken with and without high amylose maize starch on blood malondialdehyde, interleukins, IGF-I, insulin, leptin, MMP-2, and TIMP-2 concentrations in rats. *Nutr Cancer.* 2010;62(4):454-65.
18. Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H, Nagao M. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci.* 2004;95(4):290-9.
19. Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, van den Brandt PA, Colditz GA, Folsom AR, *et al.* Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med.* 2004;140(8):603-13.
20. Salaspuro M. Interactions of alcohol and tobacco in gastrointestinal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27 Suppl 2:135-9.
21. Testino G. The burden of cancer attributable to alcohol consumption. *Maedica (Buchar).* 2011;6(4):313-20.
22. Haas SL, Ye W, Lohr JM. Alcohol consumption and digestive tract cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2012;15(5):457-67.
23. Durko L, Malecka-Panas E. Lifestyle Modifications and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2014;10:45-54.
24. Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hasty AH. Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr Diab Rep.* 2009;9(1):26-32.
25. Kumor A, Daniel P, Pietruczuk M, Malecka-Panas E. Serum leptin, adiponectin, and resistin concentration in colorectal adenoma and carcinoma (CC) patients. *Int J Colorectal Dis.* 2009;24(3):275-81.
26. Wiseman M. 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. *Proc Nutr Soc.* 2008;67(3):253-6.
27. Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer.* 2009;125(1):171-80.
28. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(10):768-80.
29. Li X, Wu B, Wang L, Li S. Extractable amounts of trans-resveratrol in seed and berry skin in *Vitis* evaluated at the germplasm level. *J Agric Food Chem.* 2006;54(23):8804-11.
30. Cole BF, Baron JA, Sandler RS, Haile RW, Ahnen DJ, Bresalier RS, *et al.* Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2007;297(21):2351-9.

31. Takata Y, Shrubsole MJ, Li H, Cai Q, Gao J, Wagner C, *et al.* Plasma folate concentrations and colorectal cancer risk: A case-control study nested within the Shanghai Men's Health Study. *Int J Cancer*. 2014.
32. Patel SG, Ahnen DJ. Familial colon cancer syndromes: an update of a rapidly evolving field. *Curr Gastroenterol Rep*. 2012;14(5):428-38.
33. Hampel H, Stephens JA, Pukkala E, Sankila R, Aaltonen LA, Mecklin JP, *et al.* Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: later age of onset. *Gastroenterology*. 2005;129(2):415-21.
34. Gala M, Chung DC. Hereditary colon cancer syndromes. *Semin Oncol*. 2011;38(4):490-9.
35. Xie J, Itzkowitz SH. Cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14(3):378-89.
36. Binefa G, Rodriguez-Moranta F, Teule A, Medina-Hayas M. Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine. *World J Gastroenterol*. 2014;20(22):6786-808.
37. Markowitz SD, Dawson DM, Willis J, Willson JK. Focus on colon cancer. *Cancer Cell*. 2002;1(3):233-6.
38. Watson AJ, Collins PD. Colon cancer: a civilization disorder. *Dig Dis*. 2011;29(2):222-8.
39. Pancione M, Remo A, Colantuoni V. Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Patholog Res Int*. 2012;2012:509348.
40. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(25):2449-60.
41. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2059-72.
42. Grady WM, Markowitz S. Genomic instability and colorectal cancer. *Curr Opin Gastroenterol*. 2000;16(1):62-7.
43. Goss KH, Groden J. Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol*. 2000;18(9):1967-79.
44. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, *et al.* Colorectal cancer. *Lancet*. 2010;375(9719):1030-47.
45. Carroll M, Seaman H, Halloran S. Tests and investigations for colorectal cancer screening. *Clin Biochem*. 2014.
46. Wolpin BM, Mayer RJ. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2008;134(5):1296-310.
47. Singh CK, George J, Ahmad N. Resveratrol-based combinatorial strategies for cancer management. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1290:113-21.
48. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, *et al.* Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*. 2004;350(23):2343-51.

49. Muggia FM, Peters GJ, Landolph JR, Jr. XIII International Charles Heidelberger Symposium and 50 Years of Fluoropyrimidines in Cancer Therapy Held on september 6 to 8, 2007 at New York University Cancer Institute, Smilow Conference Center. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(5):992-9.
50. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(5):330-8.
51. Miura K, Kinouchi M, Ishida K, Fujibuchi W, Naitoh T, Ogawa H, *et al.* 5-fu metabolism in cancer and orally-administrable 5-fu drugs. *Cancers (Basel).* 2010;2(3):1717-30.
52. Li XL, Wang CZ, Mehendale SR, Sun S, Wang Q, Yuan CS. Panaxadiol, a purified ginseng component, enhances the anti-cancer effects of 5-fluorouracil in human colorectal cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009;64(6):1097-104.
53. Manson MM. Cancer prevention -- the potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends Mol Med.* 2003;9(1):11-8.
54. Tome-Carneiro J, Larrosa M, Gonzalez-Sarrias A, Tomas-Barberan FA, Garcia-Conesa MT, Espin JC. Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. *Curr Pharm Des.* 2013;19(34):6064-93.
55. Juan ME, Alfaras I, Planas JM. Colorectal cancer chemoprevention by trans-resveratrol. *Pharmacol Res.* 2012;65(6):584-91.
56. Patel KR, Scott E, Brown VA, Gescher AJ, Steward WP, Brown K. Clinical trials of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1215:161-9.
57. Rotches-Ribalta M, Andres-Lacueva C, Estruch R, Escribano E, Urpi-Sarda M. Pharmacokinetics of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets. *Pharmacol Res.* 2012;66(5):375-82.
58. Gupta SC, Kannappan R, Reuter S, Kim JH, Aggarwal BB. Chemosensitization of tumors by resveratrol. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1215:150-60.
59. Vinod BS, Maliekal TT, Anto RJ. Phytochemicals as chemosensitizers: from molecular mechanism to clinical significance. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(11):1307-48.
60. Zhao L, Wientjes MG, Au JL. Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses. *Clin Cancer Res.* 2004;10(23):7994-8004.
61. Straetemans R, O'Brien T, Wouters L, Van Dun J, Janicot M, Bijmens L, *et al.* Design and analysis of drug combination experiments. *Biom J.* 2005;47(3):299-308.
62. Greco WR, Bravo G, Parsons JC. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol Rev.* 1995;47(2):331-85.
63. Berenbaum MC. Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression. A critical review. *Clin Exp Immunol.* 1977;28(1):1-18.

-
64. Tallarida RJ. The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain*. 2002;98(1-2):163-8.
 65. Wigington DP, Urben CM, Strugnell SA, Knutson JC. Combination study of 1,24(S)-dihydroxyvitamin D2 and chemotherapeutic agents on human breast and prostate cancer cell lines. *Anticancer Res*. 2004;24(5A):2905-12.
 66. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknaes M, Hektoen M, *et al*. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*. 2013;2:e71.
 67. Nutakul W, Sobers HS, Qiu P, Dong P, Decker EA, McClements DJ, *et al*. Inhibitory effects of resveratrol and pterostilbene on human colon cancer cells: a side-by-side comparison. *J Agric Food Chem*. 2011;59(20):10964-70.
 68. Colin D, Limagne E, Jeanningros S, Jacquel A, Lizard G, Athias A, *et al*. Endocytosis of resveratrol via lipid rafts and activation of downstream signaling pathways in cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4(7):1095-106.
 69. Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D. Cellular signaling perturbation by natural products. *Cell Signal*. 2009;21(11):1541-7.
 70. Alkhalaf M. Resveratrol-induced apoptosis is associated with activation of p53 and inhibition of protein translation in T47D human breast cancer cells. *Pharmacology*. 2007;80(2-3):134-43.
 71. Delmas D, Passilly-Degrace P, Jannin B, Cherkaoui Malki M, Latruffe N. Resveratrol, a chemopreventive agent, disrupts the cell cycle control of human SW480 colorectal tumor cells. *Int J Mol Med*. 2002;10(2):193-9.
 72. Wolter F, Akoglu B, Clausnitzer A, Stein J. Downregulation of the cyclin D1/Cdk4 complex occurs during resveratrol-induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines. *J Nutr*. 2001;131(8):2197-203.