

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**ESTUDIOS DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN
MOLECULAR DE POLIFENOLES DE LA DIETA
EN CULTIVOS CELULARES Y ANIMALES DE
EXPERIMENTACIÓN.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Ana Belén Granado Serrano

Bajo la dirección de la doctora

Sonia Ramos Rivero

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-5986-0

© Ana Belén Granado Serrano, 2009

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA
Dpto. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**“ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN MOLECULAR DE
POLIFENOLES DE LA DIETA EN CULTIVOS CELULARES Y
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN”**

ANA BELÉN GRANADO SERRANO

Madrid, 2009

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA
Dpto. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**“ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN MOLECULAR DE
POLIFENOLES DE LA DIETA EN CULTIVOS CELULARES Y
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN”**

**Trabajo de investigación que presenta Ana Belén Granado Serrano para optar
al Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid (UCM)**

Vº Bueno del tutor:

Dra. M^a Antonia Lizarbe

Vº Bueno del director:

Dra. Sonia Ramos

Vº Bueno del doctorando:

Ana Belén Granado-Serrano

Madrid, 2009

La **Dra. Sonia Ramos Rivero**, Científico Titular del Departamento de Metabolismo y Nutrición del Instituto del Frío/ICTAN, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.), certifica que:

Ana Belén Granado Serrano ha realizado bajo su dirección la tesis doctoral que lleva por título:

**“ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN MOLECULAR DE
POLIFENOLES DE LA DIETA EN CULTIVOS CELULARES Y
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN”**

Fdo:

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Departamento de Metabolismo y Nutrición del Instituto del Frío/ICTAN, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección de la Dra. Sonia Ramos Rivero.

Para la realización de dicho trabajo de investigación se concedió una beca predoctoral de Formación del Personal Investigador por el Ministerio Español de Ciencia e Innovación (2005/2009).

A mis padres,

“por darme la vida, vuestro amor incondicional y apoyarme en todo lo que hago”

A mi hermano,

“siempre estaré orgullosa de ti, eres un campeón”

A Jose,

“por estar a mi lado y llenarme el corazón de vida, amor y alegría”

AGRADECIMIENTOS

Parece que fue ayer la primera vez que vine a Madrid para hacer una entrevista en el Instituto del Frío...menudo nombre tan raro para un centro de investigación, pensé, y...aquí estoy cuatro años después a punto de convertirme en doctora!!! Sin embargo, este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda y el apoyo de mucha gente a la que ahora, en agradecimiento, quiero dedicar unas palabras.

En primer lugar, quiero dar las gracias al Ministerio Español de Ciencia e Innovación por concederme una beca pre-doctoral y darme la posibilidad de abrirme camino en la investigación, al igual que a los organismos que han contribuido a financiar estos estudios (Ministerio de Ciencia e Innovación, Comunidad de Madrid y Nutrexpa, SA). También, agradecer al Consejo Superior de Investigaciones Científicas y al Instituto del Frío por permitirme formar parte de uno de los centros de investigación de mayor prestigio nacional, así como a la Universidad Complutense de Madrid por su formación académica durante estos años.

Quiero dar las gracias de manera especial a mi directora de tesis, la *Dra. Sonia Ramos*, por guiar mis pasos en el mundo de la investigación durante estos cuatro años. Gracias *Sonia*, por tu absoluta dedicación, tu apoyo incondicional, tu optimismo y tus ganas de trabajar, que, sin lugar a duda, se contagian y han hecho que disfrute de mi trabajo. Nada hubiera sido igual sin “La Rosi”. Nunca podré olvidar las risas, las confidencias y el calor que hace en el cuarto de cultivos!

Agradecerle a la *Dra. M^a Antonia Lizarbe* su gran amabilidad y sus acertadas sugerencias.

Gracias también a todos los miembros de mi grupo de investigación. Al *Dr. Luis Goya*, agradecerle la ayuda que me ha ofrecido durante todos estos años, su humildad, y su eterna sonrisa, un galán donde los haya. Gracias a la *Dra. Laura Bravo*, por su apoyo, su ánimo y por dedicarme siempre una palabra amable. Asimismo, quiero dar las gracias a la *Dra. M^a Ángeles Martín*, trabajar en el laboratorio nunca fue tan divertido antes de tu llegada. Ese “mal humor” mañanero y tu constante ironía hacen de ti una persona única. Gracias *Nines*, por tu complicidad, tu confianza y tu ayuda. Y, sobre todo, gracias por enseñarme que la investigación y la vida pueden ir de la mano. A la *Dra. Raquel Mateos*, agradecerle tantos momentos de risas durante sus cortas estancias en el I.Frío. Y gracias también a las nuevas incorporaciones del grupo, *Miren e Ilde*: aunque casi acabáis de llegar, ya sois integrantes oficiales del clan. Gracias por vuestro compañerismo y por ser tan majos.

Por supuesto quiero dar las gracias a todos y cada uno de mis compañeros del Departamento, el clan de “los topillos”: *Elena*, gracias por tener siempre una sonrisa y una palabra amable y cariñosa conmigo. *Irene*, desde el principio me ofreciste tu amistad y siempre has estado ahí para mí, así que, gracias. No dejes de luchar, porque sé que en la vida y en tú carrera te espera

AGRADECIMIENTOS

un enorme éxito. *María*, esa salmantina de pura casta, la topilla más creativa, original y divertida del clan. Gracias por esos momentos tan “puchis”. Gracias también a las topillas mexicanas: *Lupe*, eres un terremoto de buenas vibraciones y buena onda; gracias por esa fuerza que transmites, tu vitalidad y tu cariño. Sin duda, *Haydeé* y tú, os lleváis un pedacito de mi corazón para México. *Deisy*, gracias por tu amabilidad y por tu encantadora sonrisa. Y, por supuesto, gracias chicas por esas enchiladas tan ricas que prepararéis. *Sarita*, cuántas vivencias hemos compartido!!! Quiero darte las gracias por el apoyo y la amistad que siempre me has brindado, por aguantarme dentro y fuera del laboratorio, sobre todo durante los últimos meses, y por esas copitas de vino de tu tierra que nunca han faltado en las reuniones de los topillos. *Marije* y *Jara*, las dos topillas exiliadas en Clermond Ferrand, gracias por vuestra amistad y vuestro compañerismo.

Por supuesto, quiero dar las gracias también a todas esas personas que han pasado brevemente por el I.Frío y que sin duda han dado vidilla a esto: Nacho, *Inma*, *Cristina*, “*las vascas*”, *las dos Rocíos*, *Benoit*, *Toni*, *Javi*, *Gema*, y seguro que alguno más que se me queda en el tintero. A todos, gracias.

Una mención especial para *Isabel* y *M^a Rosa*, a las que agradezco la ayuda que me han ofrecido siempre. A la *Dra. Pilar Rupérez*, el *Dr. Antonio Jiménez* y al resto de miembros del departamento de Metabolismo y Nutrición agradecerles su compañerismo durante todos estos años.

Quiero dar las gracias también a *Paquita*, *Pilar* y *Gema*, mis compis de “despachito”. Sin duda estos últimos meses han sido de los más duros desde que llegué al I.Frío, y por suerte os he tenido a mi lado para apoyarme, animarme y para compartir “los momentos tesis”. Gracias chicas por vuestra espontaneidad y por vuestro cariño.

Gracias a los Drs. *Fernando Escrivá*, *Carmen Álvarez*, *Elisa Fernández* y *Almudena Porras*, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia (UCM), por su ayuda desinteresada y su trato siempre amable.

Agradecerle también al *Dr. Guy Haegeman* haberme aceptado en su laboratorio durante unos meses para aprender a manejar el microscopio de fluorescencia. A lo que tengo que sumar haber tenido la posibilidad de conocer una ciudad tan impresionante como Gante y una gente estupenda.

Pero sin duda, a quien realmente tengo que darle las gracias por el apoyo incondicional, la confianza y el cariño que siempre me han dado es mi familia. Esta tesis también es cosa vuestra!

Gracias *mamá* por ser mi ángel de la guarda, nunca podré agradecerte todo lo que me has dado. Gracias por creer que soy una persona capaz y que puedo conseguirlo. Gracias por tus palabras y tus sabios consejos. Quiero que sepas que aunque estemos un pelín lejos, siempre te siento cerca de mí. *Papá*, gracias por estar siempre a mi lado y por conseguir sacarme una sonrisa incluso cuando estoy enfadada. Gracias por quererme y apoyarme incondicionalmente en todo lo que hago. La tesis, como todos los logros de mi vida, os la debo a vosotros. Os quiero. *Juanfri*, hermanito, no te imaginas lo orgullosa que estoy de ti. Eres un campeón tanto en el fútbol como en la vida. Gracias por confiar en mí y por darme siempre tanto ánimo. Te quiero.

Abuela, ya se acerca el momento de ser doctora, y espero que estés ahí para verlo. Mi titas del alma: *M^a Luisa, Amalia, Mari* y *Juani*, quiero agradeceros vuestro cariño y la confianza que siempre habéis depositado en mí.

Los amigos, también son un punto de apoyo importante en todos los momentos de nuestra vida, por ello quiero dar las gracias a *Lidia, Noelia, Ampí, Macarena, Marisa*, “mis compis de la UNEX” y a todas y todos lo demás, por vuestro cariño y por vuestra amistad.

Finalmente, aunque no en importancia, quiero dar las gracias al amor de mi vida, *Jose*. Ese topillo guatemalteco que poco a poco ha ido penetrando en mi corazón para quedarse a vivir en él. Aquí nos conocimos y aquí nos enamoramos. Has vivido conmigo cada pequeño pasito que he ido avanzando en mi formación, desde el DEA hasta la Tesis, y siempre has estado a mi lado, apoyándome, devolviéndome la confianza en mí misma cuando la pierdo, soportando mis cambios de humor, haciéndome sonreír y sobre todo queriéndome. Te admiro, como persona, como nutricionista y como científico, gracias por transmitirme tus inquietudes por la vida y por la ciencia, gracias por ser como eres y, gracias por compartir tu vida conmigo. Te quiero.

“La felicidad es la suma de los pequeños momentos que tienes el privilegio de compartir con personas especiales”

ABREVIATURAS

DNA: ácido desoxirribonucleico	EC: epicatequina
AIF: factor inductor de apoptosis	ECC: epicatequingalato
AKR: aldo-ceto reductasa	ECM: matriz extracelular
AKT/PKB: serina-treonina quinasas específicas/proteínas quinasa B	EGC: epicalocatequina
ALP: fosfatasa alcalina	EGCG: epigalocatequingalato
ALT: alanina transaminasa	EGF: factor de crecimiento epidérmico
Apaf-1: factor activador de proteasas apoptóticas-1	EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
AP-1: proteína activadora 1	ERK: quinasa regulada extracelularmente
ARE: elemento de respuesta antioxidante	FRK: quinasa relacionada con Fos
ASK: quinasa regulada por señal apoptótica	GCL: glutamato cisteína ligasa
AST: aspartato transaminasa	GPx: glutation peroxidasa
ATF: factor activador de transcripción	GR: glutation reductasa
bcl-2: gen 2 del linfoma de células B	GSH: glutation
bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos	GSK3: glucógeno sintasa quinasa-3
BH: dominio de homología Bcl-2	GSSG: glutation oxidado
CGA: ácido clorogénico	GST: glutation-S-transferasa
CYP: citocromo p450	HCC: hepatocarcinoma celular
CREB: proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc	HO-1: hemooxigenasa-1
Cul3: culina 3	IAPS: proteínas inhibidoras de apoptosis
dATP: 2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato	IARC: Agencia Internacional de Investigación en Cáncer
DD: dominios de muerte	IκB: inhibidor del elemento kappa B
DED: dominio efector de muerte	IKK: quinasa del inhibidor del elemento kappa B
DEN: dietil-N-nitrosamina	JDP: proteína de dimerización de Jun
DISC: complejo de señalización inducido por muerte	JNK: quinasa N-terminal de c-Jun
DMBA: 9,10-dimetil-benzo-antraceno	Keap-1: proteína represora-1 asociada a ECH
DPI: difenilén iodonio	LDH: lactato deshidrogenasa
	MAM: acetato metilazoximetanol

ABREVIATURAS

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógeno

MEK: proteínas quinasa responsables de la fosforilación de ERKs

MLK: quinasas de linaje mixto

MMP: metaloproteasa

NADPH: nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato

NF- κ B: factor nuclear kappa B

NIK: quinasa inductora del NF- κ B

NNK: 4-metilnitrosamina-1-(3-piridil)-1-butanona

NQO1: NAD(P)H:quinona oxidoreductasa I

Nrf2: factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2p45

OMS: Organización Mundial de la Salud

PARP: poli-ADP-ribosa-polimerasa

PDK: quinasa dependiente de PIP₃

PI3K: fosfatidil-inositol-3-quinasa

PIMK: multiquinasa inositol-polifosfato

PIP₂: fosfatidilinositol-(3,4)-difosfato

PIP₃: fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato

PKC: proteína quinasa C

PMA: forbol 13-acetato-12-miristrato

PMACI: ionóforo de calcio A23187

pRb1: proteína de retinoblastoma 1

PtdIns: fosfatidil-inositoles

PTEN: fosfatasa con homología a tensina

p38-MAPK: quinasa activada por mitógeno p38

Raf: serina-treonina quinasas citosólicas específicas activadas por Ras

Ras: proteína GTPasa RAS (*rats sarcoma*)

QR: quinona reductasa

RHD: dominio de homología Rel

ROS: radicales libres de oxígeno

RSK: quinasa S6 ribosomal

SAPK: proteínas quinasas activadas por estrés

SHIP: fosfatasa de inositoles 5'-fosfato

SOD: superóxido dismutasa

TAK: quinasa activada por el factor de crecimiento transformante

t-BOOH: *tert*-butil-hidroperóxido

TGF- β : factor de crecimiento tumoral β

TNF: factor de necrosis tumoral

TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral

TPA: 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol

UV: ultravioleta

USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

Wnt: familia de genes que deben su nombre al gen wingless de *Drosophila* y su homólogo en vertebrados (integrated)

XIAP: proteína inhibidora de apoptosis ligada a X

ÍNDICE

INTRODUCCION GENERAL	1
1. Polifenoles de la dieta.	3
1.1. Clasificación y estructura de los polifenoles. Presencia en los alimentos.	3
1.1.1. Flavonoides.	4
1.1.2. Ácidos fenólicos.	9
1.1.3. Alcoholes fenólicos.	10
1.1.4. Estilbenos.	10
1.1.5. Lignanos.	10
1.2. Ingesta estimada en la dieta de los polifenoles.	10
1.3. Biodisponibilidad y metabolismo.	12
1.3.1. Concentración de los polifenoles en el plasma y los tejidos.	13
2. Estrés oxidativo y señalización molecular en cáncer.	14
2.1. Etapas del desarrollo del cáncer.	15
2.2. Iniciación: Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo.	16
2.2.1. Sistemas de defensa enzimáticos.	17
2.2.2. Sistemas de defensa no enzimáticos.	20
2.3. Iniciación-promoción: Apoptosis.	21
2.3.1. Rutas de señalización implicadas en la inducción de apoptosis.	22
2.3.1.1. Ruta intrínseca de la apoptosis.	22
2.3.1.2. Ruta extrínseca de la apoptosis.	25
2.3.2. Inhibidores de la apoptosis.	25
2.4. Promoción: Rutas de proliferación y supervivencia.	26
2.4.1. Fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K)/AKT (proteína quinasa B).	26
2.4.2. Proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPKs).	28
2.4.3. Proteína quinasa C (PKC).	30
2.4.4. Factores de transcripción relacionados con el estrés oxidativo.	32
2.4.4.1. Factor nuclear kappa B (NF-κB).	32
2.4.4.2. Proteína activadora 1 (AP-1).	34
2.4.4.3. Factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2p45 (Nrf2).	36
2.5. Consideraciones generales sobre la señalización molecular en el cáncer de hígado.	37

3. Polifenoles de la dieta y cáncer.	39
3.1. Estudios epidemiológicos.	39
3.2. Estudios en animales de experimentación.	41
3.3. Efectos quimiopreventivos de los polifenoles en cáncer.	43
3.3.1. Actividad antioxidante.	44
3.3.2. Efecto sobre las enzimas de fase I y II. Elemento de respuesta antioxidante (ARE).	45
3.3.3. Efecto sobre las rutas apoptóticas.	47
3.3.4. Efecto sobre las vías de proliferación y supervivencia.	48
3.3.4.1. Efecto sobre las vías de señalización PI3K/AKT, MAPKs y PKCs.	48
3.3.4.2. Efecto sobre los factores de transcripción (NF- κ B, AP-1 y Nrf2).	49
3.4. Polifenoles y ensayos clínicos en humanos.	50
 OBJETIVOS GENERALES	 53

RESULTADOS

I. Efecto apoptótico de la quercetina en las células HepG2.	57
Antecedentes.	59
1. Generalidades.	59
2. Efecto de la quercetina sobre la modulación de la muerte celular programada.	61
3. Efecto de la quercetina sobre la modulación de las vías de señalización clave en proliferación/supervivencia.	61
4. Efecto de la quercetina sobre la regulación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1.	63
Artículo I. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17056790	65
Granado-Serrano A.B., Martín M.A., Bravo L., Goya L. and Ramos S. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation Bcl-2 and inhibition of PI-3-kinase/AKT and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). <i>Journal of Nutrition</i> 2006, 136(11):2715-2721.	

Artículo 2.	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18324708	73
<p>Granado-Serrano A.B., Martín M.A., Bravo L., Goya L. and Ramos S. Time course regulation of quercetin on cell survival/proliferation pathways in human hepatoma cells. <i>Molecular Nutrition and Food Research</i> 2008, 52(4):457-64.</p>		
Artículo 3.	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20358477	81
<p>Granado-Serrano A.B., Martín M.A., Bravo L., Goya L. and Ramos S. Quercetin modulates NF-κB and AP-1/JNK pathways to induce cell death in human hepatoma cells. <i>Nutrition and Cancer: An International Journal</i> 2010 62(3):390-401.</p>		
Discusión.		93
II.	Efecto protector de la epicatequina y el ácido clorogénico en las células HepG2.	101
Antecedentes.		103
1.	Ácido clorogénico.	103
1.1.	Generalidades.	103
1.2.	Efecto del ácido clorogénico sobre la modulación de la apoptosis.	105
1.3.	Efecto del ácido clorogénico sobre la modulación de las vías de proliferación/supervivencia.	105
1.4.	Efecto del ácido clorogénico sobre la regulación de factores de transcripción (NF-κB, AP-1 y Nrf2).	106
2.	Epicatequina.	106
2.1.	Generalidades.	106
2.2.	Efecto de la epicatequina sobre la modulación de la apoptosis.	108
2.3.	Efecto de la epicatequina sobre la regulación de las vías de proliferación/supervivencia.	109
2.4.	Efecto de la epicatequina sobre la regulación de factores de transcripción (NF-κB, AP-1 y Nrf2).	109
Artículo 1.	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17286412	111
<p>Granado-Serrano A.B., Martín M.A., Izquierdo-Pulido M., Goya L., Bravo L. and Ramos S. Molecular mechanisms of (-)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> 2007, 55(5):2020-2027.</p>		

Artículo 2.	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18495458	119
Granado-Serrano A.B., Martín M.A., Goya L., Bravo L. and Ramos S. Time-course regulation of survival pathways by epicatechin on HepG2. <i>Journal of Nutritional Biochemistry</i> 2009, 20(2):115-24.		
Artículo 3.	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20030899	129
Granado-Serrano A.B., Martín M.A., Haegeman G., Goya L. Bravo L. and Ramos S. Epicatechin induces NF-κB, AP-1 and Nrf2 via PI3K/AKT and ERK signalling in HepG2 cells. <i>British Journal of Nutrition</i> 2010, 103(2):168-79.		
Discusión.		141
1. Ácido Clorogénico.		142
2. Epicatequina.		143
III. Efecto protector de una dieta rica en cacao frente al daño oxidativo hepático inducido por dietil-N-nitrosamina en la rata.		153
Antecedentes.		155
Artículo.	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19602430	159
Granado-Serrano A.B., Martín M.A., Bravo L., Goya L. and Ramos S. A diet rich in cocoa attenuates N-nitrosodiethylamine-induced liver injury in rats. <i>Food Chemistry and Toxicology</i> 2009, 47(10):2499-506		
Discusión.		171
DISCUSIÓN GENERAL		177
I. Potencial efecto preventivo de tres clases de compuestos fenólicos sobre la línea celular HepG2.		180
1. Quercetina.		180
2. Epicatequina.		182
3. Ácido Clorogénico.		183

2. Efecto de quercetina y epicatequina sobre la potencial modulación a lo largo del tiempo de vías de señalización clave en los procesos de supervivencia y/o proliferación celular en las células HepG2.	183
2.1. Quercetina.	183
2.2. Epicatequina.	184
3. Potencial modulación por quercetina y epicatequina a lo largo del tiempo de dianas moleculares clave en las vías de señalización de los factores de transcripción NF-κB, AP-1 y NrF2 en las células HepG2.	185
3.1. Quercetina.	185
3.2. Epicatequina	186
4. Estudio del potencial efecto protector de una dieta rica en cacao sobre el daño hepático inducido por dietil-<i>N</i>-nitrosamina en ratas.	187
CONCLUSIONES GENERALES	191
BIBLIOGRAFÍA	195

INTRODUCCIÓN GENERAL

Introducción General

1. Polifenoles de la dieta.

Los polifenoles constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos y ubicuos de las plantas. Estos compuestos son esenciales para su fisiología, ya que contribuyen a su morfología, crecimiento, y reproducción. Además, los polifenoles están involucrados en los mecanismos de defensa de las plantas frente a agentes externos como la radiación ultravioleta y la agresión de patógenos y predadores¹.

Durante décadas, los polifenoles han resultado de gran interés en el campo de la investigación por sus múltiples aplicaciones en la industria. Estos compuestos se han empleado para la producción de tintes, papel, cosméticos, aditivos alimenticios, etc¹. Además, constituyen una parte importante de la dieta humana por su ubicuidad en los alimentos de origen vegetal, por lo que también han despertado un gran interés desde el punto de vista nutricional. Tradicionalmente, los polifenoles se habían considerado como anti-nutrientes debido a su capacidad de unir y precipitar macromoléculas, como proteínas, carbohidratos, e incluso enzimas digestivas, reduciendo así la digestibilidad de los alimentos¹. Sin embargo, en los últimos años, se les han atribuido efectos beneficiosos frente al desarrollo de diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo (cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas)². Además, los polifenoles parecen poseer otras muchas actividades biológicas de gran interés en el ámbito de la salud; así, se ha descrito que pueden actuar como agentes anti-inflamatorios, anti-virales, anti-bacterianos, anti-trombogénicos y anti-cancerígenos^{3, 4}.

1.1. Clasificación y estructura de los polifenoles. Presencia en los alimentos.

Los polifenoles comprenden una amplia variedad de moléculas que incluyen desde compuestos altamente polimerizados hasta moléculas simples con un solo anillo fenólico en su estructura, como los alcoholes y ácidos fenólicos⁴.

Se han descrito más de 8000 polifenoles distintos que pueden clasificarse en diferentes grupos en función del número de anillos fenólicos que contienen y el tipo de sustituyente unido a estos anillos. Las principales clases de polifenoles por ser los más ampliamente distribuidos

INTRODUCCIÓN GENERAL

en los alimentos son: flavonoides, ácidos y alcoholes fenólicos, estilbenos y lignanos⁴ (Figura 1).

Merece la pena mencionar que la composición en polifenoles de los alimentos puede verse afectada por un considerable número de factores (temperatura, luz, respuesta a patógenos, procesamiento, maduración en el momento de la cosecha, etc). En este sentido, sólo existen datos parciales sobre ciertos polifenoles (flavonoles, flavonas, catequinas e isoflavonas) que se han publicado a partir del análisis directo de los alimentos^{5, 6}, en recopilaciones bibliográficas^{7, 8} y desde el año 2003 en la base de datos del departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA)⁹.

1.1.1. Flavonoides.

Los flavonoides representan el grupo de polifenoles más ampliamente distribuido en las plantas, y en la actualidad, ya se han identificado más de 4000 compuestos diferentes¹. Su estructura química común es un difenilpropano (C₆-C₃-C₆), y consta de dos anillos aromáticos (A y B) unidos a través de tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado (anillo C) (Figura 1).

En función del estado de oxidación de la cadena de átomos de carbono, los flavonoides pueden dividirse a su vez en diferentes subclases, siendo las más representativas: los flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (catequinas y proantocianidinas) (Figura 2). Generalmente, los flavonoides pueden encontrarse asociados a distintos carbohidratos o ácidos orgánicos, aunque ocasionalmente se pueden encontrar en forma de aglicona en las plantas.

Los *flavonoles* constituyen el grupo de flavonoides más ubicuo en los alimentos de origen vegetal, siendo la quercetina su principal representante⁴ (Figura 2). Generalmente, se encuentran en los alimentos en forma glicosilada, siendo la glucosa o la ramnosa los principales azúcares a los que se asocian.

La cebolla es el alimento más rico en flavonoles (hasta 1,2 g/Kg de peso fresco), pero también pueden encontrarse de manera abundante en la col rizada, puerro, brócoli y arándanos⁴ (Tabla 1). La concentración media de flavonoles en los alimentos es de

aproximadamente 15-30 mg/Kg de peso fresco⁴. Así mismo, algunas bebidas, como el vino tinto y el té, contienen hasta 45 y 30 mg de flavonoles/L, respectivamente⁴.

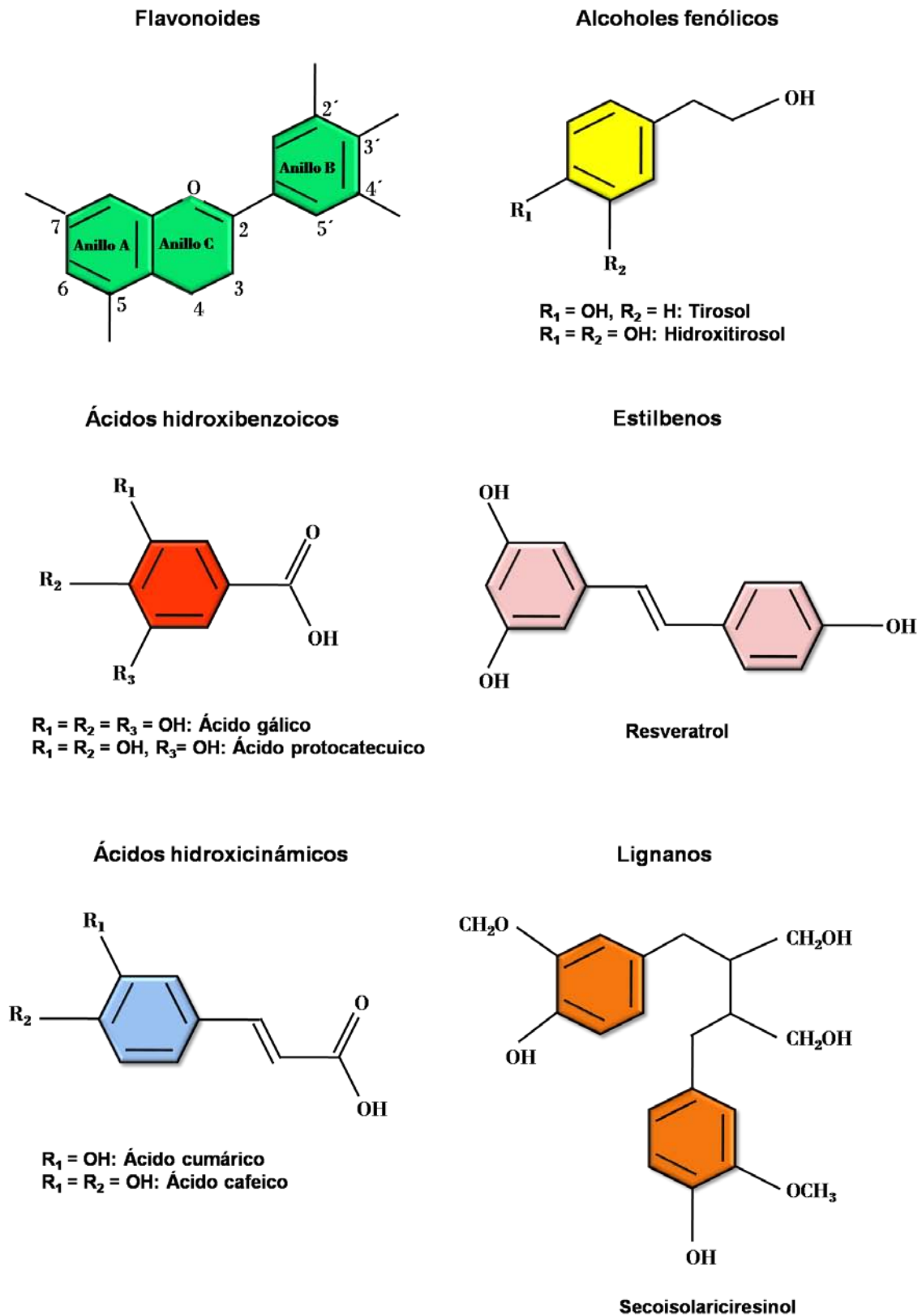


Figura 1. Principales clases de polifenoles. (Adaptado de Manach, C. 2004)⁴.

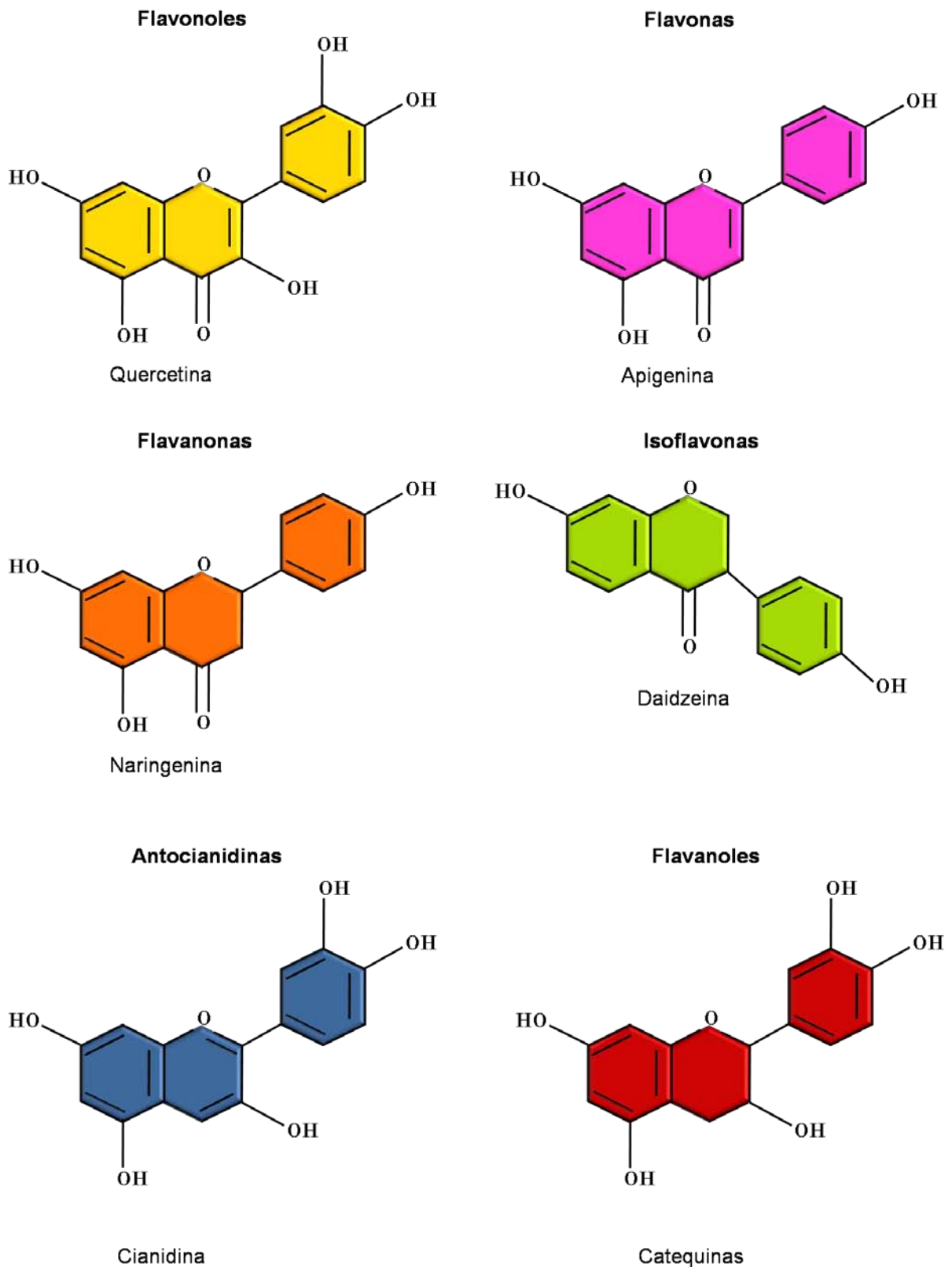


Figura 2. Principales clases de flavonoides. (Adaptado de Manach, C. 2004)⁴.

Las **flavonas** son los flavonoides menos comunes en el reino vegetal (Figura 2) y están formadas principalmente por glicósidos de luteolina y apigenina, siendo el perejil y el apio las

únicas fuentes comestibles importantes⁴ (Tabla 1). Además, la piel de las frutas contiene grandes cantidades de flavonas polimetoxiladas (tangeretina, nobiletina y sinensetina)⁴.

Tabla 1. Principales alimentos fuente de los flavonoides más comunes.

SUBCLASE	FLAVONOIDE	ALIMENTO
Flavonoles	Quercetina	Cebolla, manzana, cereza,
	Miricetina	brócoli, tomate, bayas, té,
	Kaempferol	vino tinto, puerro
	Rutina	
Flavonas	Luteolina	Pimiento, tomillo
	Apigenina	Apio
	Diosmetina	Perejil
Flavanonas	Naringenina	Pomelo, zumo de uva
	Hesperidina	Naranja
	Eriodictol	Limón
Isoflavonas	Genisteina	Soja, legumbres
	Daidzeina	
Antocianidinas	Delfinidina	Ruibarbo, cereza, fresa, vino
	Pelargonidina	tinto
	Cianidina	
	Malvidina	
Flavanoles	Epigallocatequin-3-galato	Chocolate, judías, té, vino
	Epigallocatequina	tinto, manzana, cereza,
	Catequina	albaricoque, melocotón
	Epicatequina	

Las *flavanonas* se caracterizan por presentar una cadena saturada de tres átomos de carbono y un átomo de oxígeno en C₄ (Figura 2). Los alimentos que contienen flavanonas en altas concentraciones son los cítricos (Tabla 1), aunque también se encuentran en los tomates y ciertas plantas aromáticas como la menta. Entre los diversos miembros de las flavanonas cabe destacar a la naringenina, abundante principalmente en el pomelo, la hesperetina, en la naranja, y el eriodictiol, en el limón; aunque por lo general las flavanonas se encuentran en forma glicosilada en los alimentos, como la hesperidina (conjugado de rutinosa y hesperetina). Se ha descrito que el zumo de naranja contiene entre 470 y 761 mg/L de hesperidina¹⁰.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las **isoflavonas** son químicamente similares a los estrógenos (Figura 2) y son capaces de unirse a los receptores de estas hormonas, por lo que se clasifican como fitoestrógenos.

En los alimentos, las isoflavonas pueden aparecer en forma de aglicona, o más comúnmente como conjugados de glucosa. Las principales isoflavonas son la genisteína, daidzeína y gliciteína, y se encuentran casi exclusivamente en las plantas leguminosas, siendo la soja y sus productos derivados la principal fuente de isoflavonas de la dieta humana (Tabla 1). Las semillas de soja contienen entre 140 y 1530 mg de isoflavonas/Kg de peso fresco, mientras que la leche de soja contiene entre 12 y 130 mg de isoflavonas/L de leche⁷.

Las **antocianidinas** (pelargonidina, malvidina, cianidina) (Figura 2) son pigmentos solubles responsables de la mayoría de los colores rojo, azul y púrpura de las frutas, verduras, flores y otros tejidos o productos vegetales¹¹. Por lo general, las antocianidinas se encuentran en las plantas en forma de glicósidos (antocianinas), ya que la aglicona es altamente inestable⁴.

Las antocianidinas están presentes en el vino tinto, ciertas variedades de cereales y algunas verduras, aunque es en las frutas donde son especialmente abundantes (Tabla 1). El contenido de antocianidinas en los alimentos, habitualmente es proporcional a la intensidad del color, y puede llegar a alcanzar valores de hasta 2-4 g/Kg de peso fresco en las grosellas y arándanos⁴.

Los **flavanoles** están presentes en la naturaleza en forma de monómeros (catequinas) (Figura 2) y de polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). A diferencia del resto de los flavonoides, los flavanoles son los únicos que no aparecen en forma glicosilada en los alimentos y se distinguen dos clases:

- i. Las catequinas se encuentran en frutas como los albaricoques y cerezas (hasta 250 mg/Kg) y en bebidas como en el vino tinto (hasta 300 mg/L), si bien las principales fuentes de catequinas son el té verde (hasta 800 mg/L) y el chocolate (hasta 600 mg/L). La catequina y epicatequina (EC) son los flavanoles más comunes en las frutas, mientras que las galocatequinas, epigalocatequina (EGC) y epigalocatequingalato (EGCG), se encuentran en algunas semillas de leguminosas, uvas y principalmente en el té⁶.

- ii. Las **proantocianidinas** son los flavanoles responsables del carácter astringente de algunas frutas (uvas, manzanas, bayas, etc.) y bebidas (vino, sidra, té, cerveza, etc.), así como del amargor del chocolate¹². Dada la dificultad para evaluar el contenido de proantocianidinas en los alimentos por su amplio rango de estructuras y pesos moleculares, los únicos datos disponibles en la literatura se refieren a los dímeros y trímeros de catequinas, que son tan abundantes como las propias catequinas^{4, 13}.

1.1.2. Ácidos fenólicos.

Los **ácidos hidroxibenzoicos** (Figura 1), como el ácido gálico y el ácido protocatecuico, se encuentran en muy pocos alimentos de origen vegetal, por lo que han sido poco estudiados. Estos compuestos forman parte de estructuras complejas como los taninos hidrolizables.

El contenido de ácidos hidroxibenzoicos en algunas plantas comestibles es relativamente bajo, excepto en los frutos rojos como los arándanos donde puede llegar a alcanzar los 270 mg/Kg de peso fresco⁴. El té verde también es una fuente importante de ácido gálico y sus hojas pueden llegar a contener hasta 4,5 g/Kg de peso fresco. Por su parte, la frambuesa y el aceite de oliva pueden llegar a tener hasta 100 mg y 0,22 mg de ácido protocatecuico por cada Kg de peso fresco, respectivamente^{4, 14}.

Los **ácidos hidroxicinámicos** (Figura 1) son más comunes que los ácidos hidroxibenzoicos. Los principales representantes de este grupo son el ácido cumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico. De manera habitual, estos ácidos se encuentran glicosilados o formando ésteres con el ácido quínico, ácido shikimico o ácido tartárico en los alimentos. La combinación del ácido cafeico y el ácido quínico da lugar al ácido clorogénico (CGA), que se encuentra en muchas frutas y, especialmente, en el café (una taza de café de 128 mL puede llegar a tener entre 70 y 350 mg de CGA)¹⁵. El ácido cafeico es el ácido hidroxicinámico más abundante en las frutas (75-100%); así, los kiwis contienen hasta 1 g de ácido cafeico/Kg de peso fresco. Por su parte, el ácido ferúlico es el más abundante en los granos de cereales y en el grano de trigo puede alcanzar entre 0,8 y 2 g/Kg de peso seco (90% del total de polifenoles)⁴.

1.1.3. Alcoholes fenólicos.

El tirosol (4-hidroxifeniletanol) y el hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol) constituyen los principales representantes dentro del grupo de los alcoholes fenólicos (Figura 1) y se encuentran principalmente en el aceite de oliva extra virgen (40,2 y 3,8 mg/Kg respectivamente)¹⁴. El tirosol también está presente en bebidas como el vino tinto, vino blanco y la cerveza¹⁶.

1.1.4. Estilbenos.

En la dieta humana, los estilbenos se encuentran en baja cantidad, siendo el resveratrol el compuesto fenólico más representativo de este grupo (Figura 1). En los alimentos, el resveratrol se encuentra mayoritariamente en forma glicosilada y está presente de manera abundante en la piel de las uvas rojas (50-100 g/Kg de peso neto)⁴, lo que contribuye en gran medida a la elevada concentración de resveratrol en el zumo de uva y en el vino tinto, donde alcanza hasta 0,3-7 mg de aglicona/L y 15 mg de glicósidos/L⁴.

1.1.5. Lignanós.

Las lignanos se forman por la dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropano (Figura 1). La mayoría de estos compuestos está presente en la naturaleza en su forma libre, mientras que los derivados glicosilados constituyen una minoría.

1.2. Ingesta estimada en la dieta de los polifenoles.

En la actualidad, existen pocos datos disponibles sobre la ingesta diaria de los polifenoles. Esta estimación se ha llevado a cabo mediante cuestionarios sobre la dieta en los que se refleja que la ingesta de estos compuestos es muy variable y depende en gran medida de los hábitos y preferencias de la población. Además, se ha de mencionar que la mayoría de estos datos se han obtenido a partir del análisis de las agliconas de los principales polifenoles presentes en aquellos alimentos vegetales más ampliamente consumidos tras la hidrólisis de los glicósidos y los ésteres¹⁷. En este sentido, la ingesta de los flavonoles y flavonas es la más estudiada⁵, dado que son los flavonoides más fáciles de determinar¹⁸.

En el año 1976, Kuhnau¹⁹ estimó la ingesta de *flavonoides* en Estados Unidos (EEUU) en aproximadamente 1 g/día. En esta cantidad total, el 16% correspondía a flavonoles, flavonas y flavanonas, el 17% a antocianidinas, 20% a catequinas y 45% a “biflavonas”.

El consumo de *flavonoles* en EEUU, Dinamarca y Holanda se ha estimado aproximadamente entre 20-25 mg/día²⁰⁻²², mientras que en Italia oscila entre 5 y 125 mg/día (promedio, 35 mg/día)⁴.

La ingesta de *flavanonas* es similar o un poco más alta que la de los flavonoles⁴. Así, en Finlandia, se ha descrito que se ingiere un promedio de 28,3 mg/día de hesperetina²³.

En los países asiáticos, el consumo de soja es de aproximadamente 10-35 g/día, lo que equivale a una ingesta media de *isoflavonas* de 25-40 mg/día, con un máximo de 100 mg/día¹⁸. Por su parte, los americanos y los europeos, que apenas incluyen la soja en su dieta, consumen tan solo unos pocos mg de isoflavonas al día⁴.

Hasta ahora, el consumo de *antocianidinas*, sólo ha sido estudiado en Finlandia, donde se consumen elevadas cantidades de frutos rojos, y se ha estimado en 82 mg/día, aunque en algunos casos puede exceder los 200 mg/día⁴.

Entre los *flavonoles*, el consumo total de catequinas, dímeros y trímeros de proantocianidinas en España se ha estimado en 18-31 mg/día, siendo las manzanas, peras, uvas y el vino tinto, las principales fuentes de estos flavonoides¹³. En Holanda, el consumo de flavonoles es especialmente elevado (50 mg/día) y el chocolate, el té, las manzanas y las peras constituyen las principales fuentes de flavonoles⁶. La ingesta de proantocinidinas altamente polimerizadas se estima que puede ser superior a los 700 mg/día⁴.

El consumo de *ácidos fenólicos* es muy variable y en Alemania oscila entre 6 y 987 mg/día⁸. De manera concreta, las personas que consumen varias tazas de café al día pueden llegar a ingerir entre 500-800 mg de ácidos hidroxicinámicos diarios, mientras que los consumidores no habituales de café que toman pequeñas cantidades de frutas y verduras se estima que no ingieren más de 25 mg/día⁴.

INTRODUCCIÓN GENERAL

En la actualidad, se estima que en aquellas personas que consumen varias piezas de fruta al día, posiblemente la ingesta total de polifenoles se aproxime a 1 g/día⁴. Concretamente, en la dieta española se ha estimado que la ingesta diaria de polifenoles oscila entre los 2590 y 3016 mg/persona/día²⁴.

1.3. Biodisponibilidad y metabolismo.

La biodisponibilidad puede describirse de distintos modos. Una definición muy aceptada expone que es la proporción de nutrientes que se digiere, absorbe y metaboliza a través de una ruta normal²⁵.

El concepto de biodisponibilidad cobra una gran importancia, dado que los polifenoles más abundantes no siempre son los más activos en el organismo, ya sea porque tienen una menor actividad intrínseca, su absorción en el intestino es baja, son altamente metabolizados o se excretan rápidamente^{4, 25}.

En general, el metabolismo de los polifenoles se produce a través de una secuencia de reacciones común para todos ellos⁴, que es similar a la detoxificación metabólica que sufren muchos xenobióticos para reducir su potencial efecto citotóxico, incrementar su hidrofiliidad y facilitar su eliminación urinaria o biliar.

Los estudios llevados a cabo en animales de experimentación han demostrado que determinados polifenoles como la quercetina, daidzeína o genisteína, pero no sus glicósidos, pueden ser absorbidos directamente en el estómago^{26, 27}, al igual que algunas antocianidinas²⁸ o ácidos fenólicos como el ácido clorogénico²⁹. Sin embargo, el resto de los polifenoles, que en su mayoría resisten la hidrólisis ácida del estómago, llegan intactos al intestino delgado donde sólo las agliconas, algunos ácidos hidroxicinámicos conjugados y unos pocos glicósidos pueden ser absorbidos directamente³⁰⁻³³.

El estado de glicosilación de los polifenoles influye sobre su absorción en el intestino, ya que previamente han de ser hidrolizados por las enzimas intestinales como la lactasa-floridicina hidrolasa (hidrólisis extracelular) o la β -glucosidasa (hidrólisis intracelular). Así, los polifenoles glucosilados se absorben más fácilmente que los que poseen otro tipo de glicosilación, como los

conjugados con las moléculas de ramnosa, que alcanzan el colon antes de ser absorbidos y son hidrolizados por las enzimas de la microflora colónica³⁴.

Durante el proceso de absorción, los polifenoles sufren reacciones de conjugación en las células intestinales y, posteriormente, en las células hepáticas (metilación, sulfatación, glucuronidación y conjugación con glicina en el caso de algunos ácidos fenólicos)⁴. Así, en general, los polifenoles que llegan a la sangre y a los tejidos son diferentes a los que se localizan originalmente en los alimentos^{35, 36}. Diversos estudios *in vivo* (humanos y animales) han sugerido que sólo el 5% del total de polifenoles ingeridos diariamente son absorbidos en el duodeno¹⁷, y de este porcentaje, sólo un 5%, principalmente flavanoles, alcanzan la circulación sanguínea sin cambios en su estructura³⁰. El resto del total de los polifenoles ingeridos (95%) va a llegar al colon, donde son fermentados por la microflora colónica y dan lugar a metabolitos microbianos que se absorben y aparecen como derivados conjugados en el plasma¹⁷. Una vez absorbidos y metabolizados, los polifenoles pueden volver al duodeno a través de la circulación enterohepática, prolongando su presencia en el organismo⁴.

Finalmente, antes de ser eliminados por la orina, los polifenoles circulantes en plasma se unen ampliamente a la albúmina y son capaces de incorporarse a los tejidos, particularmente a aquellos donde son metabolizados (tejido hepático, estomacal, intestinal, colónico y nefrítico)^{17, 37, 38}, pero además pueden acumularse en tejidos diana específicos como el tejido pulmonar, pancreático, cerebral, cardíaco y esplénico^{37, 39, 40}.

1.3.1. Concentración de los polifenoles en el plasma y los tejidos.

Tras la ingesta de los polifenoles, su concentración en plasma difiere dependiendo de su naturaleza y del alimento del que procedan. Numerosos estudios realizados en humanos sugieren que la concentración en plasma de los flavonoides intactos en raras ocasiones excede los niveles de 1 $\mu\text{mol/L}$, mientras que en el caso de los metabolitos es de aproximadamente 10 $\mu\text{mol/L}$ ⁴. Además, para mantener una concentración elevada de polifenoles en plasma, se requiere una ingesta repetida en el tiempo⁴¹. De hecho, la concentración máxima de cualquier polifenol en plasma se alcanza a menudo 1-2 horas después de su ingesta⁴², excepto para aquellos polifenoles que han de ser degradados antes de su absorción⁴. Se observa también que la concentración plasmática de los polifenoles no está directamente relacionada con la concentración de los mismos en los tejidos y que difiere para los distintos polifenoles⁴.

Los polifenoles son capaces de ser absorbidos por tejidos diana distintos a aquellos en los que son principalmente metabolizados⁴. Sin embargo, los datos disponibles en este sentido todavía son muy escasos, no sólo en humanos sino incluso en animales. Un estudio realizado sobre la concentración prostática de genisteína en individuos sanos e individuos con hiperplasia prostática benigna muestra que la concentración prostática de genisteína es más baja en los hombres con hiperplasia prostática benigna que en aquellos con una próstata normal; sin embargo, la concentración de genisteína plasmática es mayor en los hombres con hiperplasia prostática benigna⁴⁰. Respecto a la concentración que alcanzan los polifenoles del té en el tejido prostático, un segundo estudio muestra que tras un consumo diario de 1,42 L de té verde o negro durante 5 días los polifenoles del té alcanzan una concentración que oscila entre los 21 y 107 pmol/L⁴³. De manera análoga, en un estudio en pacientes con cáncer colorectal a los que se les administraron distintas dosis de curcumina se observa que este compuesto alcanza una mayor concentración en el tejido colónico sano que en el canceroso⁴⁴. Además, otro estudio realizado con mujeres que ingieren isoflavonas muestra que la concentración de equol, principal metabolito de la daidzeína, es mayor en el tejido mamario que en el plasma; sin embargo, se encuentra una mayor cantidad de genisteína y daidzeína en el plasma que en el tejido mamario⁴⁵.

2. Estrés oxidativo y señalización molecular en cáncer.

Según la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.), cáncer es un término genérico para un grupo de más de 100 enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. El cáncer se podría definir como la generación rápida de células anormales que crecen más allá de sus límites habituales y pueden invadir zonas adyacentes del organismo o diseminarse a otros tejidos u órganos (metástasis).

Entre los diferentes factores que pueden desencadenar la transformación tumoral de una célula se encuentran los factores genéticos de un individuo y varias categorías de agentes externos, como los carcinógenos físicos (luz UV, radiación ionizante), químicos (tabaco) y biológicos (infecciones causadas por distintos patógenos como virus y bacterias)⁴⁶. Además, el envejecimiento es otro factor fundamental en el desarrollo del cáncer⁴⁶.

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en el mundo. En 2007, se registraron 7,9 millones de muertes a causa de esta enfermedad, lo que supone un 13% de las

defunciones mundiales, y para el año 2030 se estima que se alcanzarán los 12 millones de casos⁴⁶. Los principales tipos de cáncer que contribuyen a la mortalidad anual por esta enfermedad son el cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon y mama⁴⁶.

El hepatocarcinoma celular (HCC) es la forma de cáncer hepático más común y, actualmente, es la tercera causa de muerte por cáncer⁴⁷, por lo que existe un gran interés en el desarrollo de nuevas dianas preventivas y/o terapéuticas.

2.1. Etapas del desarrollo del cáncer.

La carcinogénesis es un proceso multiseccional que implica la transformación de una célula normal en una célula tumoral^{46, 48}. Este proceso requiere la acción acumulativa de una serie de acontecimientos en un clon celular^{48, 49}. En este sentido, se considera que para alcanzar la malignidad, las células deben adquirir ciertas características transformantes⁴⁸:

- i Autosuficiencia de crecimiento celular y potencial replicativo ilimitado.
- ii Indiferencia a señales antiproliferativas.
- iii Evasión de la apoptosis.
- iv Capacidad de inducir y mantener la angiogénesis.
- v Capacidad de invadir otros órganos y desencadenar metástasis.

Esta secuencia de eventos, puede resumirse en un modelo simple que presenta tres fases de intervención “iniciación-promoción-progresión”⁴⁹ para prevenir, ralentizar o revertir el proceso de transformación tumoral (Figura 3):

- i *Iniciación*: fase relativamente rápida pero reversible que comprende la exposición de las células a un agente carcinogénico, así como su distribución y transporte a los órganos y tejidos donde puede producirse su activación metabólica, detoxificación y la interacción de las especies reactivas con el ácido desoxirribonucleico (DNA) celular para provocar un daño oxidativo.
- ii *Promoción*: fase relativamente larga en comparación con la fase previa y en la que la célula dañada persiste, se replica y puede originar un foco de células preneoplásicas. En esta fase se producen también procesos de angiogénesis.

- iii *Progresión*: fase final e irreversible de la carcinogénesis en la que se produce un crecimiento descontrolado de las células tumorales que gradualmente pasan de ser células premalignas a células neoplásicas y aumentan su potencial de invasividad, por lo que pueden llegar a invadir nuevos tejidos diana (metástasis).

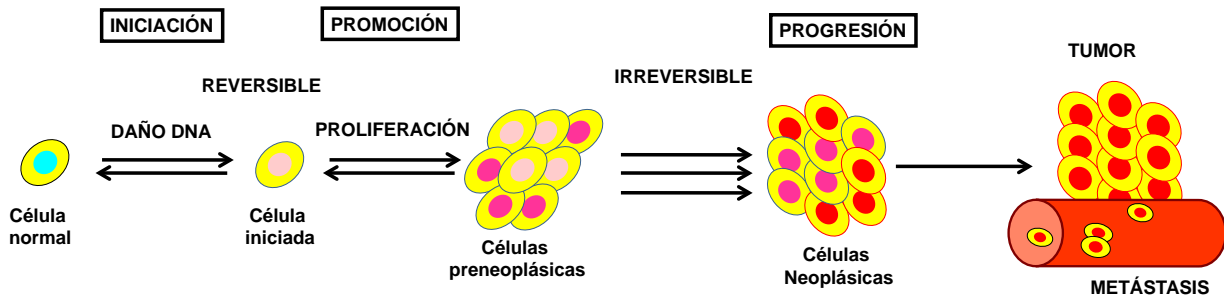


Figura 3. Secuencia de eventos de la carcinogénesis.

2.2. Iniciación: Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo.

La iniciación de la carcinogénesis implica una mutación no letal en el DNA de una célula que da lugar a una célula iniciada que realiza al menos un ciclo de síntesis de DNA para fijar el daño producido. Si la célula dañada se está dividiendo, puede ser capaz de interrumpir temporalmente su ciclo celular en fase G1, S o G2 (“checkpoints”), reparar el daño y continuar la división⁴⁸. Sin embargo, si el daño en el DNA es demasiado grande, la célula iniciará un mecanismo de suicidio programado (apoptosis) para eliminar las células alteradas genéticamente. Cuando estos mecanismos de reparación/eliminación no funcionan, las células iniciadas proliferan y el proceso de carcinogénesis avanza (fase de promoción).

La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) forma parte del metabolismo normal de una célula, pero el desequilibrio entre su generación y su neutralización puede conducir a un estado de estrés oxidativo y desembocar en la transformación cancerosa de las células⁵⁰ (Figura 4). Este daño en el DNA causado por ROS conduce a la generación de bases oxidadas, ruptura de las cadenas de DNA, formación de complejos por uniones DNA-DNA o interacciones del DNA con proteínas⁴⁸. Sin embargo, una de las estrategias más efectivas frente a la carcinogénesis consiste en el bloqueo del daño genotóxico mediado por el estrés oxidativo mediante la participación del sistema de defensa antioxidante/detoxicante de la célula: antioxidantes no enzimáticos (glutathion y otras sustancias captadores de ROS, como

los compuestos polifenólicos), inducción de enzimas antioxidantes de fase I (GPx y GR) y enzimas detoxificantes de fase II (GST, glucuronidasas, sulfatasas y metilasas)^{50, 51}.

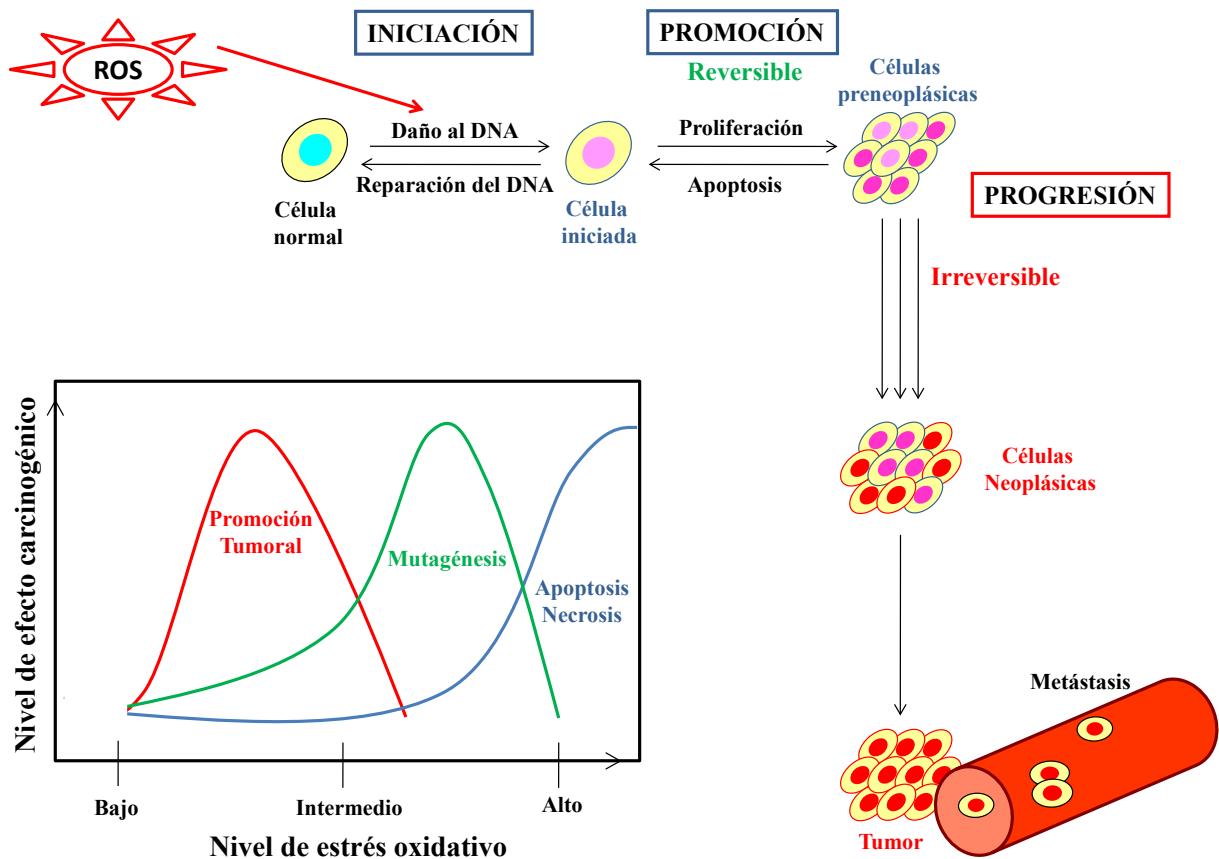


Figura 4. Efecto carcinogénico en relación con el nivel de estrés oxidativo.

(Adaptado de Valko, M. 2006)⁵⁰.

2.2.1. Sistemas de defensa enzimáticos.

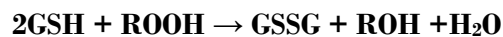
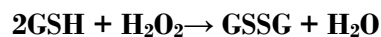
A lo largo de la evolución han emergido diversas enzimas cuya función primaria es disminuir los niveles intracelulares de ROS en el organismo y contribuir a la detoxificación de los xenobióticos. Estas enzimas desempeñan una función protectora frente a los oxidantes biológicos y son de gran importancia frente a la iniciación de la carcinogénesis^{50, 51}.

La *glutation peroxidasa (GPx)* se localiza en el citosol y la mitocondria, y se considera como el principal sistema de defensa antioxidante en condiciones de “bajos” niveles de estrés oxidativo⁵⁰.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Dada la dependencia de la GPx del selenio (Se), esta enzima puede encontrarse en dos formas químicas: dependiente e independiente de Se⁵⁰. La forma de GPx dependiente de Se (GPx-Se) es un tetrámero de peso molecular 84 kDa que contiene un residuo de selenocisteína en cada uno de los sitios activos y presenta una gran actividad frente al H₂O₂ y los hidroperóxidos orgánicos (ROOH). En los humanos, se han descrito cuatro isoformas de GPx-S⁵⁰. Por su parte, la forma no dependiente del selenio (GPx) tiene un peso molecular menor, es dimérica y sólo elimina los ROOH.

La glutatión peroxidasa actúa en conjunción con las moléculas de glutatión reducido (GSH) presentes en las células en altas concentraciones (micromolar). El sustrato para esta reacción catalítica puede ser H₂O₂ o ROOH^{50, 52}. La GPx descompone los peróxidos en agua (o alcohol) y simultáneamente oxida la molécula de GSH a glutatión oxidado (GSSG):



La GPx-Se es una enzima importante en la inhibición de la iniciación tumoral ya que impide el daño al DNA mediado por los radicales libres. De hecho, su expresión aparece disminuida en muchas células cancerosas⁵². Además, diversos estudios epidemiológicos han relacionado el descenso de su actividad con un mayor riesgo de padecer cáncer⁵³⁻⁵⁵. En este sentido, se ha demostrado que la susceptibilidad de las células prostáticas a desarrollar cáncer puede estar modulada por el polimorfismo Pro198Leu de esta enzima que provoca un descenso en la actividad de la misma en los individuos heterocigotos⁵⁵; de manera similar, este polimorfismo se ha relacionado con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama y pulmón⁵⁴. Sin embargo, otros estudios no confirman estos resultados; así, no se ha encontrado una asociación entre la disminución de la actividad GPx-Se y el riesgo de desarrollar cáncer colorectal⁵³.

Por el contrario, la GPx Se-independiente está especialmente implicada en la promoción tumoral y su expresión aparece aumentada en células cancerígenas⁵².

En el caso de ratones knockout para ambas formas de GPx se ha observado una mayor incidencia de cáncer de colon⁵².

La *glutathion reductasa (GR)*, con un peso molecular de 120 kDa, está constituida por dos subunidades proteicas y se encuentra tanto en el citosol como en la mitocondria⁵⁶. Esta enzima cataliza la reacción que restaura el glutathion a su forma reducida a expensas de equivalentes reductores en forma de nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH). Esta restauración del contenido de GSH es esencial para la eliminación del H₂O₂ y evitar la acumulación de GSSG, que es muy tóxico para la célula⁵⁶.



La actividad de la GR, al igual que la de otras enzimas antioxidantes, se ha asociado con las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como el cáncer. Así, se ha demostrado que los pacientes con cáncer en la cavidad oral presentan una mayor actividad de GR en suero que los individuos sanos⁵⁷.

La *glutathion-S-transferasa (GST)* comprende toda una familia de proteínas que utilizan el GSH para la detoxificación de una gran cantidad de compuestos, incluyendo carcinógenos, fármacos y productos del estrés oxidativo. En los humanos se han descrito tres familias principales de GST dependiendo de su localización celular: citosólica, mitocondrial y microsomal unida a membrana^{50, 58}.

Las GSTs citosólicas existen en la célula en forma de monómeros, aunque son catalíticamente activas en forma de homo o heterodímeros⁵⁰. Esta familia se divide a su vez en siete clases (α , μ , ω , ζ , π , σ , θ), de las cuales la clase μ , es la más relacionada con cáncer y comprende cinco isoenzimas diferentes (GST-M1-GST-M5)⁵⁰.

Diversos estudios han establecido una relación entre la incidencia del cáncer y las alteraciones en la función de la GST^{57, 58}, siendo GST-M1 la isoforma que más frecuentemente se ha asociado con el cáncer⁵⁰. El fenotipo GSTM nulo se ha relacionado con un mayor riesgo de padecer cáncer de la cavidad oral⁵⁹, pulmón⁶⁰, colon⁶¹ y vesícula biliar⁶². Además, en un estudio reciente, se ha demostrado que el genotipo GST-M1 proporciona un efecto protector frente al riesgo de padecer HCC, mientras que la GST-T1 lo incrementa⁶³. En los roedores, se ha descrito que la GST δ sirve como marcador de hepatotoxicidad y desempeña un importante papel en la inactivación de los agentes carcinogénicos⁵⁰.

2.2.2. Sistemas de defensa no enzimáticos.

Los sistemas de defensa antioxidante no enzimáticos complementan la acción de las enzimas antioxidantes. El glutathion y los productos de la glándula pineal como la melatonina, se consideran los principales antioxidantes no enzimáticos endógenos de la célula.

El *glutathion* (GSH), que constituye el principal antioxidante tiólico de la célula ⁶⁴, es un tripéptido compuesto por L-glutámico, L-cisteína y glicina (γ -glutamil-cisteinil-glicina) (Figura 5). El glutathion es especialmente abundante en el citosol (1-11 mmol/L), núcleo (3-15 mmol/L) y mitocondria (5-11 mmol/L), por lo que es el principal antioxidante soluble en estos compartimentos celulares⁶⁴. Dentro del organismo, el hígado es el órgano donde su concentración es más elevada, alcanzando valores intracelulares de hasta 10 mmol/L.

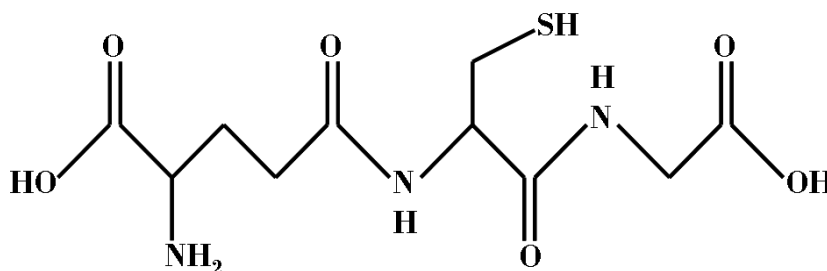
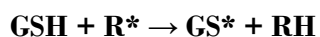


Figura 5. Estructura del glutathion (GSH).

La capacidad antioxidante de los compuestos tiólicos, como el glutathion, radica en el átomo de azufre⁶⁴. En general, la reacción del glutathion con un radical (R^{*}) se describe como sigue:



El nivel de GSH es un importante factor de protección frente a la inducción de la apoptosis, ya que está implicado en los procesos de detoxificación y modulación del estado redox de la célula, así como en las rutas de inducción de apoptosis a través de su interacción con señales pro- y anti-apoptóticas⁶⁴. En este sentido, diversos estudios han descrito que la depleción del GSH está asociada a enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo^{50, 65, 66}. En

un estudio en pacientes de cáncer de colon y cáncer de mama, se observa que la relación GSH/GSSG es significativamente menor en los individuos enfermos que en los sanos⁶⁵. De manera similar, en pacientes con tumores en el tracto gastrointestinal se observa un incremento de la peroxidación lipídica asociado con cambios en el nivel de GSH y la actividad de las enzimas de fase I y II (GPx, GR y GST)⁶⁶.

La relación GSH/GSSG se considera una buena medida del estrés oxidativo de un organismo⁶⁴, por ello, el GSSG generado en la célula en estado redox normal no supera el 5% respecto al glutation total⁶⁴, siendo habitualmente la GR la enzima encargada de aumentar nuevamente las reservas de GSH.

2.3. Iniciación-promoción: Apoptosis.

La apoptosis o muerte celular programada, que fue descrita por primera vez en 1972 por Kerr y colaboradores⁶⁷, es un mecanismo de “suicidio celular” genéticamente definido. Fisiológicamente, la apoptosis interviene en la eliminación de los tejidos dañados, el desarrollo embrionario, la renovación tisular y la regulación del sistema inmune^{49, 68, 69}. No obstante, en ciertas ocasiones se produce un defecto en su regulación que puede conducir a diversas enfermedades. Así, el incremento de la tasa de apoptosis contribuye al desarrollo de enfermedades degenerativas como el Parkinson o enfermedades autoinmunes⁶⁸, mientras que la falta de respuesta a las señales apoptóticas puede conducir al desarrollo del cáncer⁶⁸. En este sentido, la modulación de la expresión y la activación de los componentes moleculares claves en el proceso apoptótico se considera una estrategia terapéutica muy importante en este tipo de enfermedades^{51, 57, 68}.

El proceso apoptótico puede dividirse en dos fases: *fase de activación*, en la que la célula recibe el estímulo que va a conducir a la muerte, y *fase de ejecución*, en la que se producen la mayor parte de los cambios morfológicos y bioquímicos que llevan a la célula a perder el contacto con sus células vecinas⁶⁹. Morfológicamente, la membrana plasmática de la célula adquiere aspecto de burbuja (“blebbing”), se producen alteraciones en el citoesqueleto, la cromatina se condensa, disminuye el tamaño nuclear y se destruye el nucleolo⁶⁹. Finalmente, se produce la fragmentación del DNA debido a la activación de las endonucleasas y se forman los denominados cuerpos apoptóticos, que son fragmentos nucleares recubiertos de membrana⁶⁹. Se ha sugerido que estos cambios morfológicos reflejan, al menos en parte, la

activación de las caspasas, que son las principales proteasas intracelulares encargadas de digerir los polipéptidos requeridos para mantener la integridad y supervivencia celulares^{69, 70}.

Las caspasas constituyen una familia de cisteína-aspartato-proteasas que actúan sobre residuos de aspartato. Estas proteínas se sintetizan como zimógenos inactivos, de modo que cuando la célula recibe una señal apoptótica sufren un procesamiento proteolítico y la posterior formación de un complejo heterotetramérico que constituye la enzima activa⁷⁰. En los mamíferos, se han identificado al menos 14 tipos de caspasas⁷¹ y 7 de ellas tienen un reconocido papel en la apoptosis: 4 iniciadoras (caspasas-9, -2, -8 y -10) y 3 efectoras (caspasas-3, -7 y -6)⁷¹.

2.3.1. Rutas de señalización implicadas en la inducción de apoptosis.

Se han caracterizado dos rutas de transducción de señales que inducen la activación de la cascada de caspasas en el proceso apoptótico, la ruta intrínseca o mitocondrial, y la ruta extrínseca o mediada por receptores de muerte.

2.3.1.1. Ruta intrínseca de la apoptosis.

Diversos estímulos apoptóticos convergen en la inducción de la apoptosis a través de cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, lo que conduce a la activación de la caspasa iniciadora (caspasa-9) (Figura 6).

Un paso crítico en la activación de esta ruta es la liberación selectiva de polipéptidos desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citoplasma, como el componente de la cadena de transporte electrónico citocromo *c*^{69, 72}. A continuación, el citocromo *c* se une a una molécula de andamiaje denominada Apaf-1 (factor activador de proteasas apoptóticas-1), que tras un cambio conformacional promovido por 2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato (dATP), se une a la procaspasa-9^{69, 72}. Finalmente, el conjunto de múltiples moléculas de Apaf-1 y la caspasa-9 activa forman un complejo de más de 700 kDa denominado "apoptosoma"^{69, 72} que induce la activación proteolítica de la caspasa-3, inicia el desensamblaje celular y provoca la muerte programada de la célula^{68, 69, 72}.

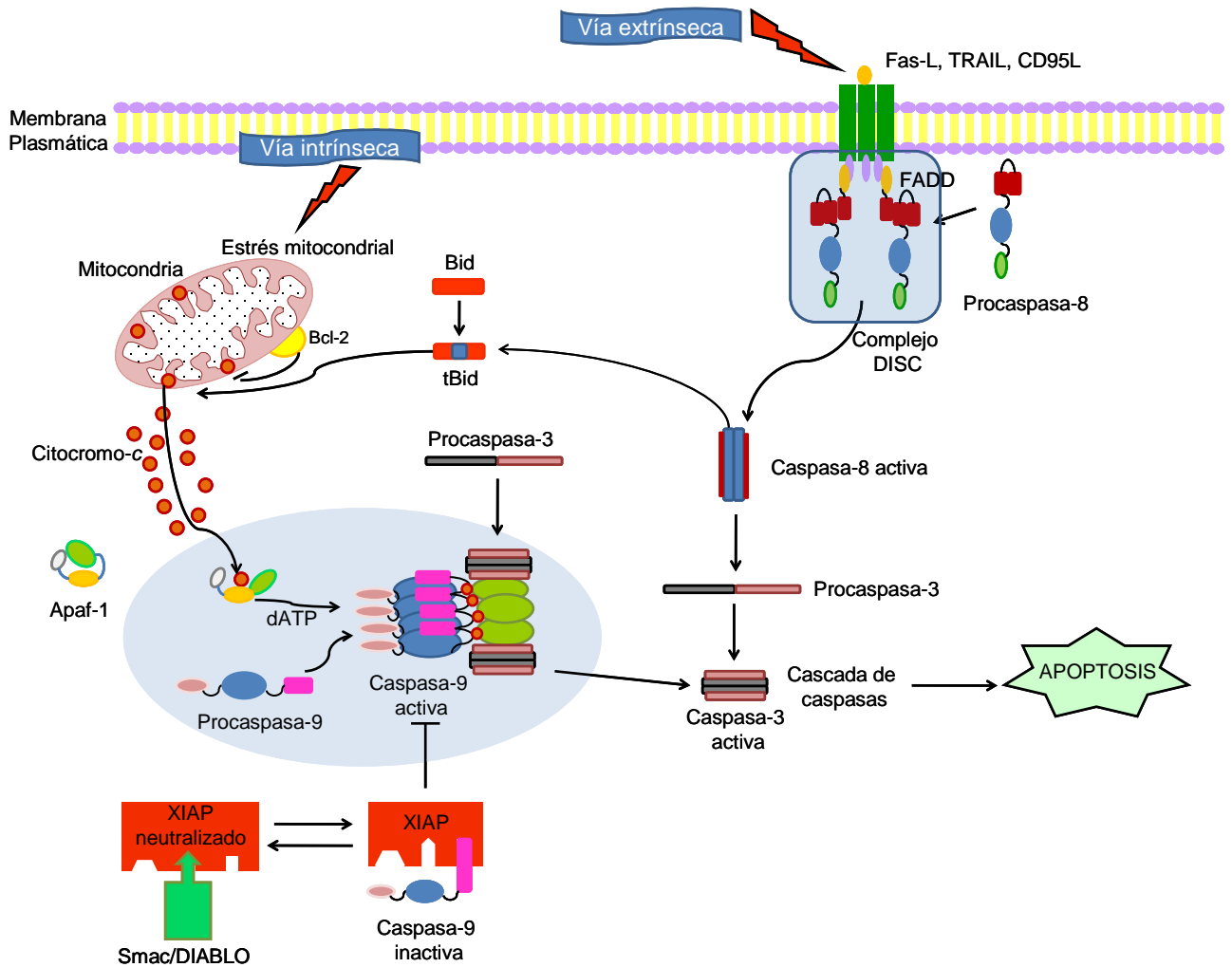


Figura 6. Rutas de señalización implicadas en la inducción de apoptosis.

(Adaptado de MacFarlane, M. 2004)⁶⁹.

Los miembros de la familia *bcl-2* (gen 2 del linfoma de células B) constituyen las principales moléculas reguladoras de la vía intrínseca de la apoptosis⁷³ (Figura 7). Se han descrito aproximadamente 20 polipéptidos que dependiendo de su función y estructura pueden dividirse en tres grupos⁷³:

- i Grupo I: se incluyen los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, etc.). Se caracterizan por contener 4 dominios BH (dominio de homología Bcl-2) conservados (BH1-BH4). Además, la mayoría de los miembros de este grupo contiene un dominio transmembrana C-terminal que los une a la superficie citoplásmica de las membranas intracelulares, como la membrana mitocondrial externa.

INTRODUCCIÓN GENERAL

- ii Grupo II: en este grupo se encuentran los miembros proapoptóticos que se caracterizan porque carecen del dominio BH4 N-terminal, pero contienen otros dominios BH (Bax, Bak y Bok/mtd)⁷³.
- iii Grupo III: en este grupo se incluyen los miembros proapoptóticos que sólo comparten una secuencia limitada de homología en el dominio BH3 con el resto de los miembros de la familia Bcl-2 (Bid, Bad, Bik, Bim, PUMA, NOXA, etc.)⁷³.

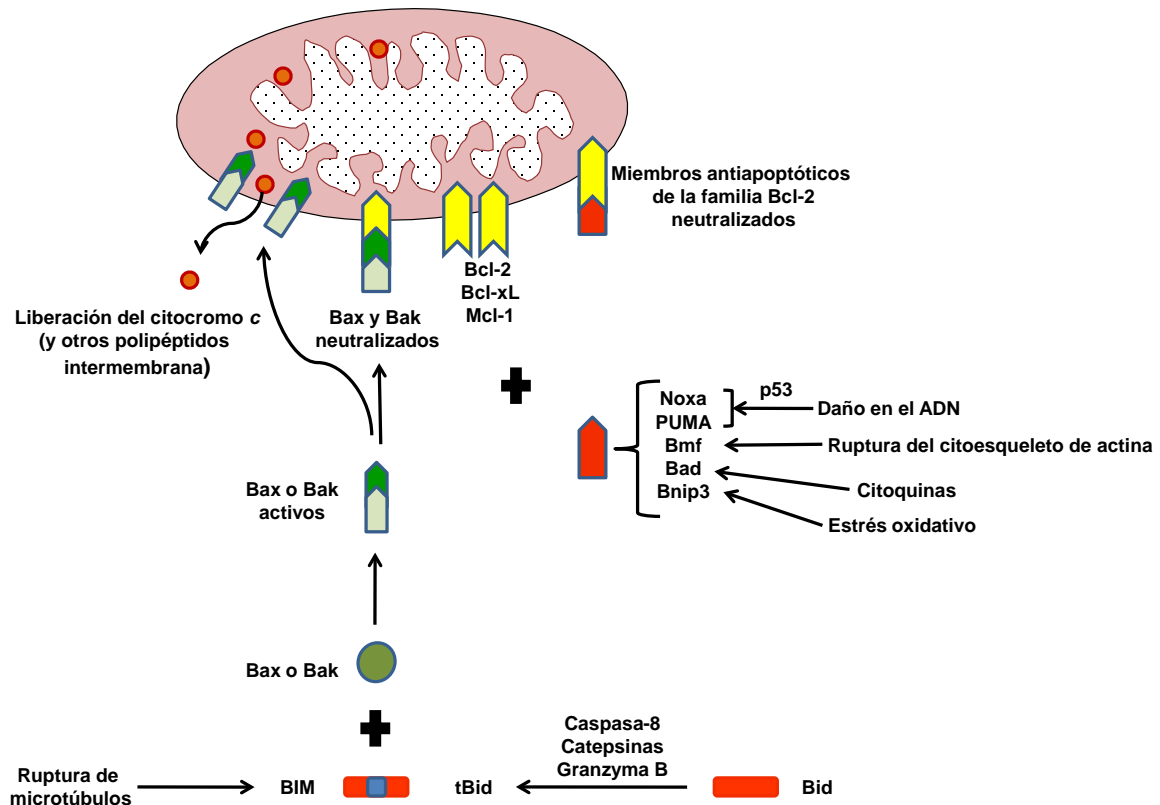


Figura 7.-Modulación de los miembros de la familia de proteínas Bcl-2.

(Adaptado de Cory, S. y col. 2003)⁷³.

El balance entre los niveles de expresión y el estado de los miembros pro- y anti-apoptóticos de esta familia de proteínas va a determinar la liberación del citocromo *c*^{69, 73}. Bax y Bak son los miembros encargados de mediar directamente la liberación del citocromo *c* al citoplasma⁷³ (Figura 7).

2.3.1.2. Ruta extrínseca de la apoptosis.

La activación de esta ruta apoptótica comienza en la superficie celular tras la unión de un ligando específico, que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF, Fas-L, TRAIL, etc) al dominio extracelular de su respectivo receptor de muerte, perteneciente a la superfamilia del receptor del TNF (TNFR)⁶⁹. El conjunto de TNFR tiene en su región intracelular los “dominios de muerte” (DD) esenciales para transducir el estímulo apoptótico, siendo la ruta de señalización mediada por el receptor de muerte Fas la que mejor se conoce.

El ligando de Fas (Fas-L) se une a su receptor e induce la agregación de otros receptores de Fas, los cuales una vez activados reclutan a las proteínas adaptadoras FADD, que también tienen en su estructura dominios DD. Las proteínas FADD poseen además un “dominio efector de muerte” (DED) que les sirve para reclutar a las caspasas iniciadoras (caspasas-8 ó -10)^{69, 74}. El ensamblaje de todas estas proteínas forma un complejo denominado complejo de señalización inducido por muerte (DISC) que conduce a la autoactivación y liberación de las caspasas-8 ó -10 activas, para a continuación, promover la activación proteolítica de las caspasas efectoras (caspasas-3 y/ó -7)^{69, 74}. En algunas células denominadas células de tipo I, la activación de estas caspasas efectoras es suficiente para inducir apoptosis⁷⁴ (Figura 6), mientras que en las células tipo II, la inducción de la apoptosis requiere una amplificación de la señal a través de la interacción de las vías de señalización extrínseca e intrínseca. De esta manera, las caspasas iniciadoras (caspasas-8 y/ó -10) promueven la activación proteolítica de Bid, lo que resulta en la liberación de proteínas mitocondriales, como el citocromo *c*, y la posterior activación de la procaspasa-9⁶⁹.

2.3.2. Inhibidores de la apoptosis.

La apoptosis también está regulada por las denominadas proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs)^{69, 71}. Esta familia de proteínas está constituida por miembros específicos de tejido (c-FLIP, BAR, ARC, NAIP, survivina, etc.) y miembros ubicuos (XIAP, c-IAP1 y c-IAP2)^{69, 71} (Figura 6). Los miembros específicos de tejido bloquean el proceso apoptótico mediante la inhibición de las caspasas iniciadoras de la ruta de receptores de muerte (caspasa-8), mientras que los miembros ubicuos pueden inhibir directamente a las caspasas efectoras activas (caspasas-3 y -7) y bloquear la activación de la caspasa-9^{69, 71}. A su vez, los inhibidores

de apoptosis están regulados por la acción de otras proteínas mitocondriales (Smac/DIABLO) que son requeridas para la activación completa de las caspasas en muchos casos^{69, 71}.

2.4. Promoción: Rutas de proliferación y supervivencia.

La tumorigénesis y la progresión tumoral son consecuencia del desequilibrio entre la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Así, en las células tumorales, la activación de las rutas de señalización relacionadas con la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) y las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) se ha relacionado con la expresión de ligandos paracrinos que promueven el crecimiento y la supervivencia celular tras la exposición a algún tipo de estrés, con lo que estas proteínas sólo se expresan en altos niveles en las células transformadas^{75, 76}.

2.4.1. Fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K)/AKT (proteína quinasa B).

Las fosfatidil-inositol 3-quinosas (PI3Ks) constituyen una familia conservada de lípidoquinasas que catalizan la fosforilación de los fosfatidilinositoles (PtdIns) de membrana en la posición D3 del anillo inositol, siendo el fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato (PIP₃) el más común⁷⁷ (Figura 8). Estas quinasas son heterodímeros formados por una subunidad catalítica, p110, y una subunidad reguladora, siendo p85 la más común.

Las PI3Ks se clasifican dependiendo de la selectividad de sustrato, y se dividen en cinco clases (IA, IB, II, III y IV), si bien sólo la PI3K de clase IA, cuya función se asocia a la transducción de señales de receptores tirosina-quinosas, se ha relacionado con el cáncer en humanos⁷⁵. Por su parte, la clase IB transduce señales de receptores de membrana acoplados a proteínas G, y además puede activar a la PI3K-IA mediante el reclutamiento de tirosina-quinosas intracelulares⁷⁵.

La PI3K controla varias funciones clave relacionadas con la biología del cáncer, entre las que se incluyen la proliferación, supervivencia celular, migración y angiogénesis^{75, 77}.

La actividad de la PI3K está regulada por dos fosfatasas (Figura 8): PTEN (fosfatasa de homología a tensina), que es un supresor tumoral, ya que hidroliza al PIP₃ localizado en la posición 3', causando su inactivación y la inhibición de la vía de señalización^{77, 78} y, SHIP,

fosfatasa que actúa sobre el PIP₃ localizado en la posición 5' para generar el fosfatidilinositol-(3,4)-difosfato (PIP₂), que es un segundo mensajero^{77, 78}.

La serina/treonina quinasa AKT (también denominada PKB) es una de las principales diana de PIP₃, y en humanos se han descrito 3 isoformas diferentes (AKT1, AKT2 y AKT3).

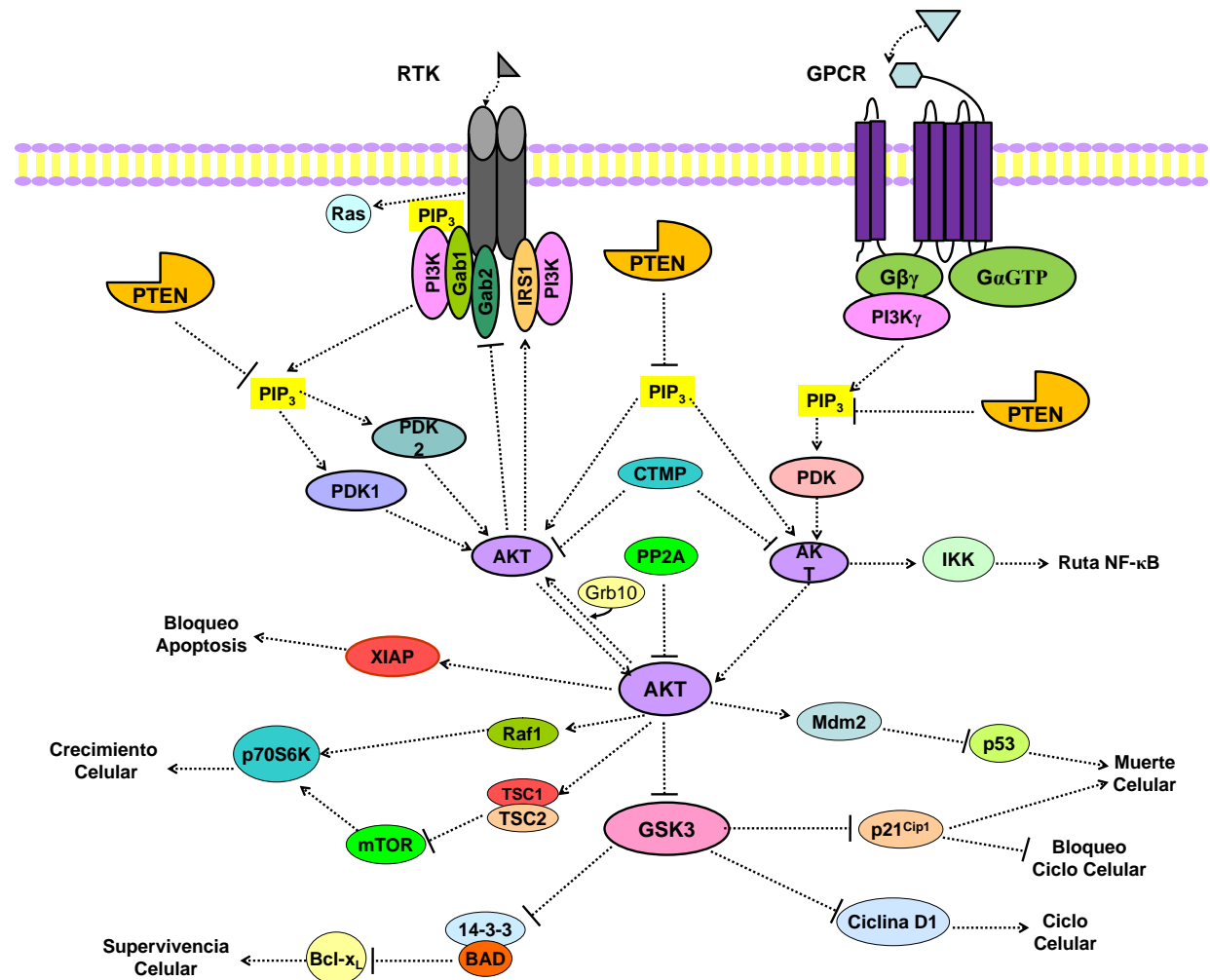


Figura 8. Vía de señalización PI3K/AKT. (Adaptado de Smith, D.L. 2007)⁷⁵.

La unión de AKT a PIP₃ provoca un cambio conformacional en AKT que hace que sea fosforilada y, por tanto, activada por las quinasa dependientes de fosfatidilinositol (PDKs)⁷⁶. Entre las dianas de AKT se incluyen múltiples factores de transcripción y proteínas de señalización, de manera que la activación de AKT deriva en la disminución de los niveles de expresión o actividad de diversas proteínas proapoptóticas, como FasL y Bim^{75, 76, 79}, y en el incremento de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-x_L, XIAPs^{75, 76, 80} y de las proteínas de

supervivencia como la propia AKT^{75, 76}. La AKT también promueve el ciclo celular mediante la inhibición de la regulación de los puntos de control, como la fosforilación e inhibición de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas p21^{Cip/WAF1} y p27^{Kip1}^{75, 76}, y glucogenosintasas (GSK3- α y β), promoviendo la glicolisis en la célula y, por tanto, el desarrollo celular⁷⁵.

En cuanto al papel de AKT en cáncer, está bien establecido, y se ha descrito que su activación contribuye directamente a la supervivencia y proliferación de las células cancerígenas, así como al aumento de tamaño de las mismas^{48, 76}.

2.4.2. Proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPKs).

Otra familia de proteínas cuya activación ha sido ampliamente relacionada con la tumorigénesis, tanto en la etapa de iniciación como en la de progresión, es la de las MAPKs^{75, 81}. Estas proteínas constituyen una superfamilia de serina/treonina-quinatas implicadas en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación y la muerte celular programada^{82, 83}.

La activación de las MAPKs se puede producir por numerosos factores de crecimiento y mitógenos que promueven diversos sucesos de fosforilación catalizados por la activación secuencial de una cascada de proteínas quinasa (MAP3K \rightarrow MAP2K \rightarrow MAPK) (Figura 9) que, en última instancia, induce la translocación de las MAPKs al núcleo donde, activan varios factores de transcripción diana mediante su fosforilación^{81, 83}.

Dentro de las MAPKs se distinguen tres subfamilias de proteínas: quinasas reguladas extracelularmente (ERKs), quinasas amino terminal de c-Jun (JNKs), y proteínas quinasas p38 (p38-MAPK)^{82, 83} (Figura 9).

Las ERKs poseen dos isoformas de 44 y 42 kDa denominadas ERK1 y ERK2, respectivamente⁸¹⁻⁸³. Su activación se produce principalmente por factores de crecimiento a través de la ruta Ras/Raf/MEK o por ésteres forbólicos a través de la vía de señalización PKC-Raf-MEK^{81, 83}. La estimulación de las ERK1/2 se relaciona principalmente con los procesos de supervivencia y proliferación celular⁸¹⁻⁸³, la activación de factores de transcripción (AP-1)^{83, 84} y de la quinasa S6 ribosomal (RSK), que promueve la supervivencia a través de la fosforilación de moléculas diana como la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB). Así mismo, la activación de las ERKs también se asocia con la fosforilación e

inactivación de miembros proapoptóticos de la familia de genes *bcl-2* como Bad^{81, 82}. Además, estudios recientes han mostrado un papel clave de las ERKs en los procesos de invasión y metástasis, ya que en las células cancerígenas la activación sostenida de estas quinasas induce la expresión de metaloproteasas (MMP), que degradan proteínas de la matriz extracelular (ECM) y promueven la invasión celular y la metástasis^{81, 83, 85}.

Cascada de MAPkinasas

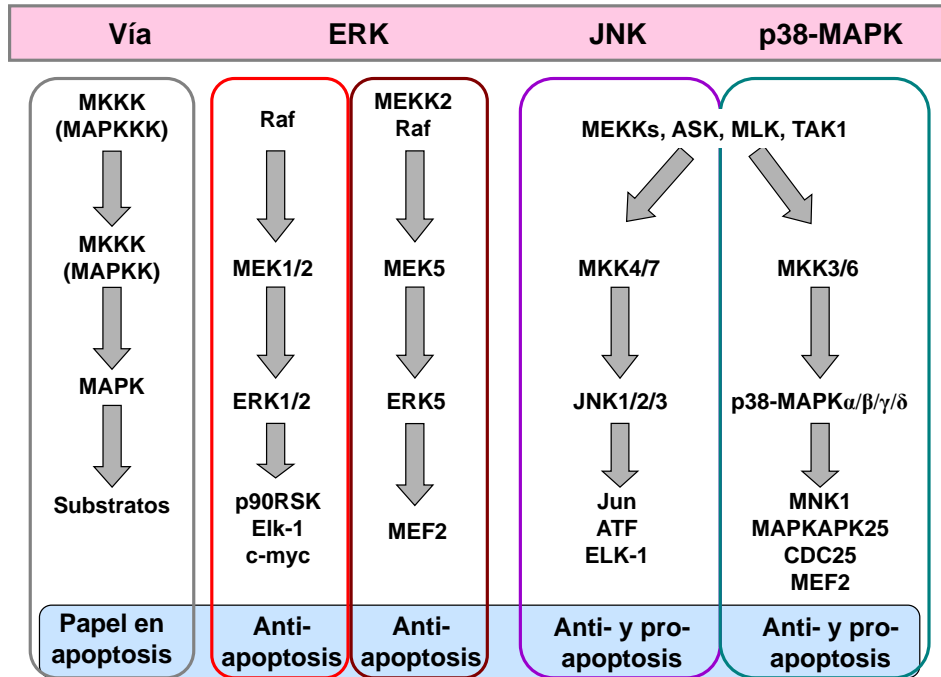


Figura 9. Cascada de MAPKs. (Adaptado de Wada, T. 2004)⁸².

La activación de las JNKs, motivada por diferentes estímulos de estrés, se relaciona de manera general con la inducción de la apoptosis⁸⁶⁻⁸⁸; de hecho, originalmente las JNKs se denominaron proteínas quinasa activadas por estrés (SAPK). En mamíferos, se han descrito tres isoformas de JNKs, JNK1, JNK2 y JNK3, las dos primeras son ubicuas y JNK3 es específica de los tejidos neuronal y cardíaco⁸⁷.

La activación de las JNKs está relacionada tanto con la inducción de apoptosis, como se ha demostrado en los hepatocitos⁸⁸, como con la estimulación de la supervivencia/proliferación celular^{87, 89}. Se ha descrito que las JNKs desarrollan una función pro- o anti-apoptótica dependiendo del tipo celular, naturaleza del estímulo, duración de su activación y la regulación de otras vías de señalización^{88, 89}. Estas enzimas catalizan la

fosforilación del factor de transcripción c-Jun en su secuencia amino-terminal. Además, las JNKs promueven la activación de distintos factores de transcripción como p53 o c-Myc^{87, 89, 90} y la fosforilación de factores no transcripcionales como los miembros de la familia de genes *bcl-2* (Bcl-2, Bcl-x_L, Bim y Bad)^{87, 89, 91}.

Las p38-MAPKs, por lo general, son activadas simultáneamente con las JNKs por estímulos de estrés⁸³. Se conocen cuatro isoformas (α , β , γ y δ)⁹² y su activación, de manera similar a las JNKs, se relaciona con la inducción de muerte celular⁹³, la promoción de la supervivencia⁹⁴, la proliferación⁹⁴ y la diferenciación celular⁹⁴. La p38-MAPK sensibiliza a los cardiomiocitos y fibroblastos derivados de ratón para la inducción de apoptosis cuando se privan de suero, produciéndose el aumento de los niveles de proteínas proapoptóticas mitocondriales (Bax) y la disminución de señales relacionadas con la supervivencia celular (p-ERK1/2)⁹³. De manera similar, en la línea de carcinoma de colon HCT116, se ha observado que la apoptosis inducida por cisplatino a través de un aumento de ROS requiere la activación de la p38-MAPK por p53, que a su vez es activado por la p38-MAPK mediante un mecanismo de retroalimentación positiva⁹⁵.

2.4.3. Proteína quinasa C (PKC).

La familia de la proteína quinasa C (PKC) está constituida por diversas isoenzimas que se clasifican en tres categorías (clásica, nueva y atípica) y presentan funciones y patrones de distribución distintos⁹⁶ (Figura 10).

La PKC α se incluye en la subfamilia de las PKCs clásicas, que se caracterizan por ser calcio-dependientes y se relaciona con los procesos de supervivencia celular⁹⁶. En este sentido, se ha descrito que la aparición de la resistencia a la quimioterapia en las células cancerígenas se acompaña de un incremento en los niveles de esta proteína⁹⁷. Así, la PKC α aparece sobreexpresada en células de cáncer de mama⁹⁶. Además, se ha descrito que la PKC α puede inhibir la apoptosis a través de la fosforilación y activación de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, y de la activación de proteínas relacionadas con la supervivencia como AKT^{96, 98}. Sin embargo, en células normales puede tener efectos anti-proliferativos al inducir la parada del ciclo celular en G1, activación de las ERKs e inhibición de p21 y p27⁹⁶.

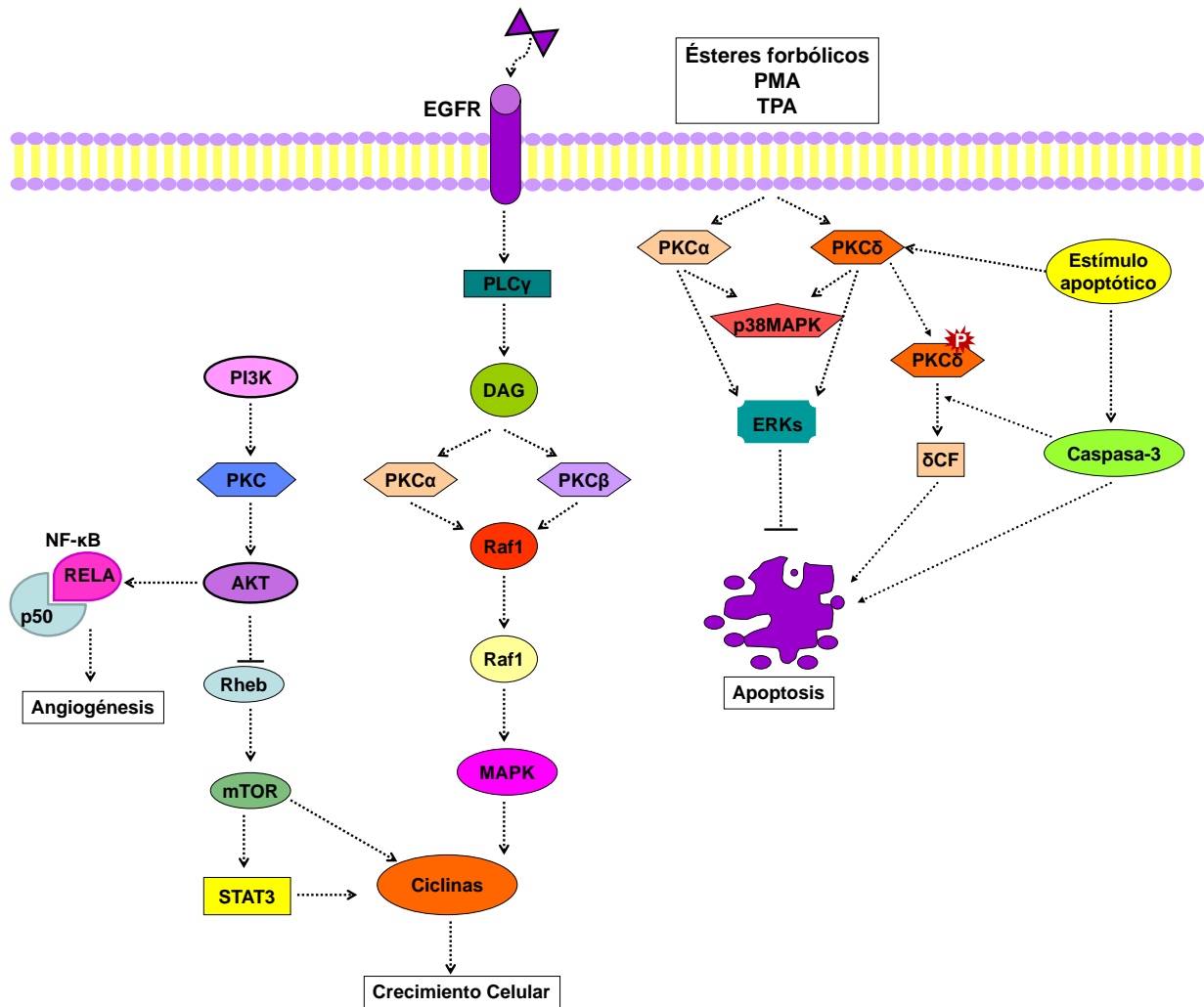


Figura 10. Señalización de la familia PKC. (Modificado de Ali, A.S. 2009 y Reyland, M.E. 2007)^{96, 99}.

La PKC δ pertenece a la subfamilia de las PKCs nuevas, que a diferencia de las PKCs clásicas son quinasas independientes de calcio. La activación de PKC δ se ha relacionado con un efecto tanto protector como inductor de la apoptosis^{96, 98}. Así, se ha descrito que esta quinasas puede ser activada por diversos estímulos apoptóticos (genotóxicos, estrés oxidativo, receptores de muerte) que promueven su fosforilación en residuos tirosina y su posterior translocación hacia el núcleo, donde es activada proteolíticamente por la caspasa-3⁹⁹. Una vez activa, la PKC δ puede disminuir los niveles de las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2), incrementar los niveles de las proteínas pro-apoptóticas (Bax)¹⁰⁰ o disminuir la expresión de ciclinas para conducir a la parada del ciclo celular⁹⁶. No obstante, la activación de PKC δ también se ha relacionado con la regulación de la proliferación, adhesión y migración en células cancerígenas de riñón⁹⁶ y con la señalización anti-apoptótica llevada a cabo por el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) en la línea celular neuronal PC12¹⁰¹.

2.4.4. Factores de transcripción relacionados con el estrés oxidativo.

Los factores de transcripción sensibles al estrés oxidativo NF- κ B, AP-1 y Nrf2 desarrollan un papel clave en el sistema de defensa antioxidante de la célula, así como en los procesos de proliferación y supervivencia celular^{102, 103}, por lo que su modulación está estrechamente relacionada con la apoptosis y el cáncer^{104, 105}.

2.4.4.1. Factor nuclear kappaB (NF- κ B).

La familia del factor de transcripción NF- κ B está formada por cinco genes que codifican para siete proteínas: NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p110), RelA (p65), c-REL y RelB. Las tres últimas proteínas se sintetizan ya maduras, mientras que p105 y p100 sufren un proceso de proteólisis para su maduración, dando lugar a p50 y p52, respectivamente^{106, 107}. Todas estas proteínas comparten un dominio de homología Rel (RHD) que interviene en su dimerización y en la interacción con las distintas isoformas de su inhibidor específico (I κ B α , β , ϵ y Bcl-3)¹⁰⁷.

En la mayoría de los tipos celulares, los dímeros de NF- κ B se encuentran en el citoplasma unidos a la proteína inhibidora del elemento kappa B (I κ B), y en esta situación son transcripcionalmente inactivos. La fosforilación de estas proteínas inhibidoras promueve su propia ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma, lo que permite la liberación del dímero de NF- κ B y su translocación al núcleo donde regula la transcripción de genes que codifican para un gran número de proteínas (citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular y proteínas pro- y anti-apoptóticas)^{106, 107} (Figura 11). La I κ B es fosforilada principalmente por las quinasas del inhibidor del elemento kappaB (IKKs)^{106, 107}, constituidas por dos subunidades catalíticas (α y β) y una subunidad reguladora IKK γ (NEMO)^{106, 107} (Figura 11).

En cuanto a la activación de la vía del NF κ B, se han propuesto diferentes mecanismos moleculares (Figura 11). La *ruta clásica*, promovida principalmente por infecciones microbianas o virales, o por la exposición a citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento, conduce a la degradación de I κ B inducida por su fosforilación^{106, 107}. En esta ruta participan principalmente los dímeros de NF- κ B p50:RelA y p50:c-Rel y depende principalmente de la acción de la subunidad IKK β ¹⁰⁶.

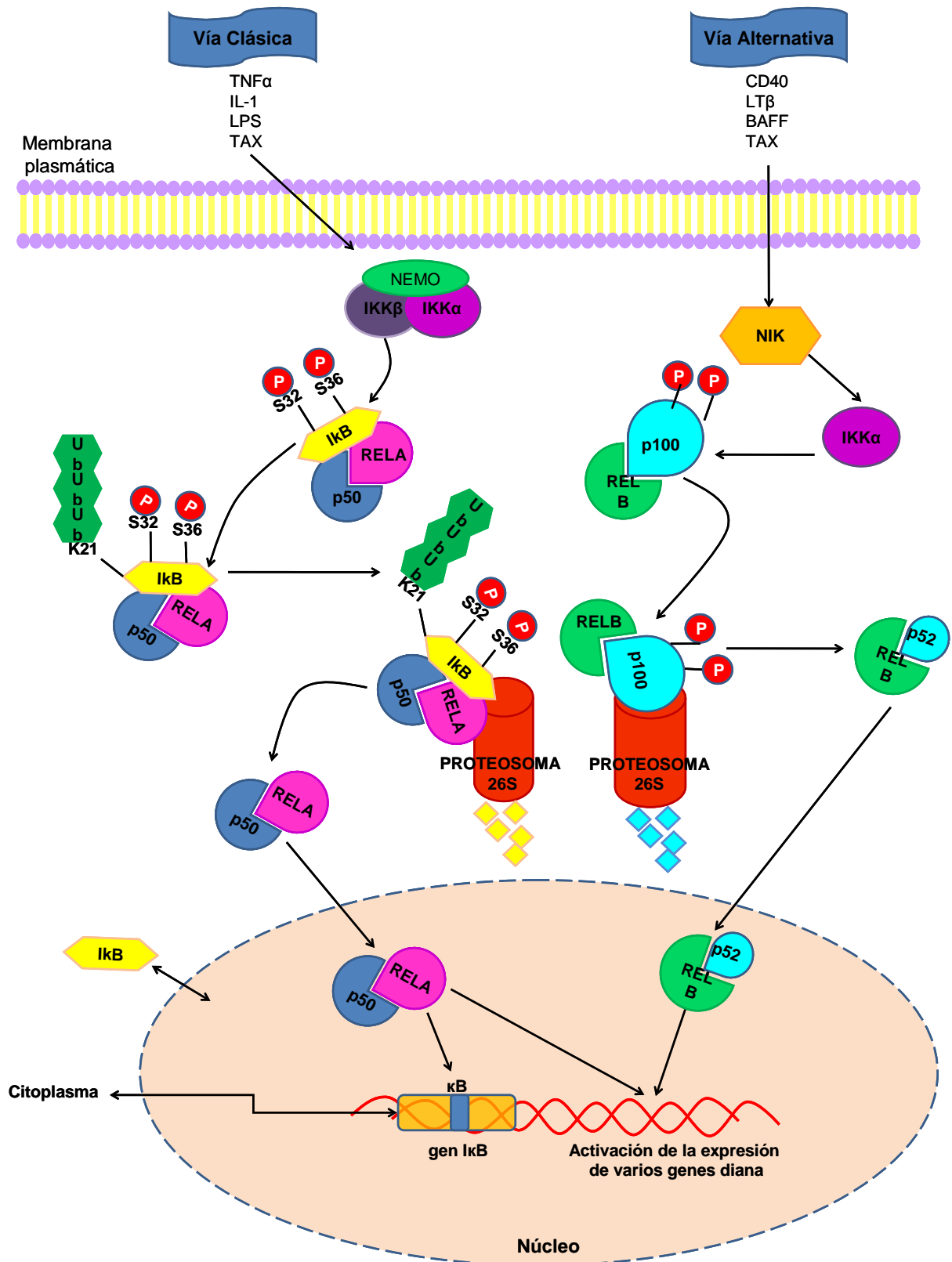


Figura 11. Rutas de activación de NF- κ B. (Adaptado de Chen, L.F. et al. 2004)¹⁰⁸.

INTRODUCCIÓN GENERAL

En la *ruta alternativa*, cuya activación es promovida principalmente por los miembros de la familia del TNF α , se activa la quinasa inductora del NF- κ B (NIK), que a su vez, induce la actividad catalítica de la subunidad IKK α sobre el dímero de NF- κ B p100/RelB. De manera más concreta, IKK α fosforila a p100, y ello promueve la maduración proteolítica de p52/RelB y su posterior translocación al núcleo donde activa la expresión de sus respectivos genes diana¹⁰⁶ (Figura 11).

En las células normales, la activación del NF- κ B sólo tiene lugar bajo los estímulos adecuados y regresa a su estado inactivo tras la acción de los mecanismos reguladores pertinentes¹⁰⁷. Sin embargo, en las células tumorales, diversas alteraciones moleculares pueden promover la activación constitutiva del NF- κ B y, por tanto, la expresión de sus genes diana relacionados con la promoción del ciclo celular, como la ciclina D1^{106, 107} y c-Myc^{106, 107}, o con la inhibición de la apoptosis como los IAPs^{106, 107} y miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (Bcl-xL)^{106, 107}.

Las rutas Ras/MAPKs y PI3K/AKT, que regulan la supervivencia y muerte celular, también pueden promover la activación de NF- κ B^{106, 107}. En la mayoría de las circunstancias, predominan las señales de supervivencia, pero en las condiciones en las que se compromete la actividad de IKK β o de NF- κ B, la activación de este factor de transcripción conduce a la muerte celular^{106, 107}.

2.4.4.2. Proteína activadora-1 (AP-1).

El factor de transcripción AP-1 es un complejo dimérico compuesto principalmente por miembros de la familia de genes *jun* (Jun, JunB y JunD) y *fos* (Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2), aunque también forma complejos heterodiméricos con algunos miembros de las subfamilias del factor activador de transcripción (ATF1, ATF-2 y ATF-3) y de la proteína de dimerización de Jun (JDP-1 y JDP-2) con los que comparte una similitud estructural¹⁰⁹.

El factor AP-1 está regulado por una amplia variedad de estímulos fisiológicos y patológicos entre los que se incluyen las citoquinas, factores de crecimiento, señales de estrés, infecciones y estímulos oncogénicos¹⁰². Esta regulación involucra tanto la transcripción de los genes *fos* y *jun* como la actividad de los dímeros de AP-1 preexistentes^{102, 109}. El mecanismo de regulación post-translacional implica la hiperfosforilación de los miembros de AP-1, Fos y

Jun, a través de la activación de las MAPKs y el estrés celular^{88, 102} (Figura 12). Una vez que estas quinasas están activas, las JNKs se translocan al núcleo y fosforilan a c-Jun en su dominio N-terminal, lo que aumenta su potencial de transactivación⁸⁸. Por el contrario, la regulación de la actividad de Fos aún no está muy clara y parece que entre los posibles candidatos moduladores se encuentran las quinasas relacionadas con Fos (FRK)^{102, 109}, la quinasa S6 ribosomal (RSK) y las ERKs^{102, 109}.

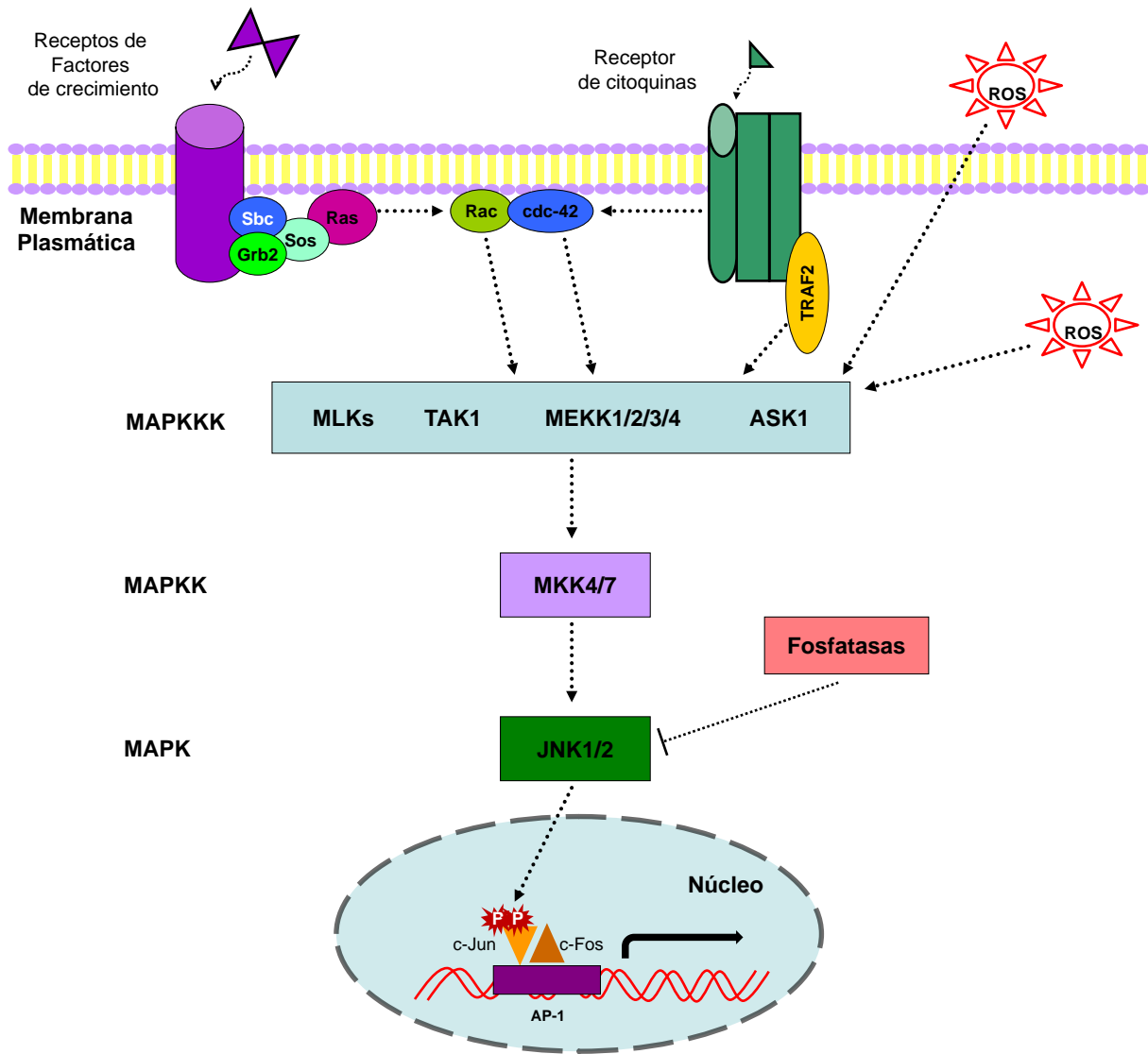


Figura 12. Regulación de la ruta de señalización JNK/AP-1. (Adaptado de Czaja, M.J. 2003)⁸⁸.

La actividad de AP-1 está estrechamente relacionada con los procesos de proliferación, diferenciación y transformación celulares^{102, 109}. AP-1 se ha considerado como un marcador de decisión celular que determina la supervivencia o muerte de la célula en respuesta a

determinados estímulos^{88, 102}. En este sentido, se ha descrito que AP-1 puede regular la expresión de genes relacionados con el ciclo celular como las ciclinas (D1, A y E) o p53¹⁰². Sin embargo, AP-1 también se puede comportar como un factor pro-apoptótico, dado que se ha demostrado que la activación de c-Jun por las JNKs, estimuladas por los receptores de muerte como FasL, promueve la expresión de genes proapoptóticos como FasL o TNF α ^{88, 102}. No obstante, en determinados sistemas celulares, AP-1 puede tener un papel antiapoptótico, y se requiere su activación para la supervivencia de la célula. Así, estudios recientes han descrito que la sobreexpresión de c-Fos incrementa la proliferación de los hepatocitos humanos¹¹⁰, y en los hepatocitos fetales se requiere la expresión de Jun para su supervivencia durante el desarrollo embrionario¹¹¹.

Como se ha mencionado anteriormente, AP-1 puede ser estimulado por señales oncogénicas, y este hecho, ligado a la identificación de oncoproteínas retrovirales homólogas a Fos y Jun (v-Fos y v-Jun), demuestran la importancia del papel de AP-1 en la carcinogénesis¹¹².

2.4.4.3. Factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2p45 (Nrf2).

Este factor de transcripción forma parte de la familia de proteínas NF-E2 que se caracteriza por presentar una estructura en forma de cremallera con residuos de leucina^{104, 113}, y constituye una de las principales dianas en el desarrollo de estrategias quimiopreventivas frente al cáncer¹¹³. Nrf2 es esencial en la regulación de la detoxificación de los agentes carcinogénicos y en la modulación del sistema de defensa antioxidante de la célula, ya que coordina la inducción de genes que codifican para enzimas citoprotectoras o de respuesta a diversos estímulos de estrés [NAD(P)H:quinona oxidoreductasa-1 (NQO1), superóxido dismutasa (SOD), GST, GPx, hemooxigenasa-1 (HO-1), glutamato cisteína ligasa (GCL), catalasa y tioredoxina]¹¹³⁻¹¹⁵. Además, Nrf2 desempeña funciones anti-inflamatorias^{104, 114, 115}.

En condiciones normales, Nrf2 se encuentra en el citoplasma de la célula formando un complejo con la proteína represora-1 asociada a ECH (Keap-1). Esta interacción permite la ubiquitinación de Nrf2 por la ubiquitin-ligasa funcional formada por la asociación de Keap1 con culina 3 (Cul3), y su posterior degradación proteosomal¹¹⁶. Sin embargo, en situaciones de estrés, Nrf2 se transloca al núcleo donde, junto con otros factores de transcripción, se une al

elemento de respuesta antioxidante (ARE) para coordinar la expresión de sus genes dianas^{104, 113, 115}.

Dado el importante papel del Nrf2 en la detoxificación de los agentes carcinogénicos, una alteración en la modulación de su vía de señalización puede ser crucial en la iniciación del cáncer^{104, 113}. La primera evidencia sobre este aspecto se observó por primera vez en el estudio del desarrollo del hepatocarcinoma celular, donde la expresión de Nrf2 y GSTP1 estaban incrementadas¹¹⁷. En otros casos, el aumento de los niveles proteicos de Nrf2 en las células tumorales se debe a mutaciones en Keap1, como se ha descrito en las líneas tumorales de cáncer de pulmón¹¹⁸ y de cáncer de mama¹¹⁹. Además, recientemente, se ha observado que en las células cancerígenas ya iniciadas, el Nrf2 puede incrementar sus niveles de expresión, lo que confiere una mayor protección y quimioresistencia a estas células frente a los agentes terapéuticos y contribuye a la promoción del cáncer^{105, 120}.

2.5. Consideraciones generales sobre la señalización molecular en el cáncer de hígado.

El HCC es el quinto tipo de cáncer más frecuente en el mundo y, en la actualidad, supone la tercera causa de muerte asociada a esta enfermedad⁴⁷.

La etiología de la hepatocarcinogénesis se ha relacionado con las infecciones virales y el abuso de alcohol, que conducen a la hepatitis crónica y cirrosis como estado preneoplásico^{47, 84, 121}. No obstante, los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del hepatocarcinoma celular aún no están totalmente claros. En este sentido, se ha descrito que el HCC está relacionado con un incremento de la activación de la ruta Wnt/ β -catenina a causa de mutaciones en el proto-oncogen β -catenina¹²² o en los inhibidores de dicha ruta como Axin 1 y Axin 2¹²³. No obstante, en todos los casos, se promueve un aumento de la expresión de genes antiapoptóticos o de genes relacionados con la proliferación celular y la angiogénesis^{84, 121}.

Otra de las alteraciones más comunes observadas en el HCC es la presencia de mutaciones en el gen supresor de tumores *p53*^{84, 121, 122} y la alteración de la regulación de la vía de señalización de la proteína de retinoblastoma-1 (pRb)^{84, 121}; de hecho, en diversos tumores celulares, se ha observado una fuerte correlación entre la falta de pRb y la falta de funcionalidad de *p53*¹²⁴.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Generalmente, la señalización de la vía PI3K/AKT está alterada en el HCC^{84, 121, 125}. La expresión del principal inhibidor de esta ruta, PTEN está reducida o es nula en la mitad de los casos de HCC¹²⁵, lo que ha llevado a sugerir que los niveles de AKT fosforilada sean considerados como un marcador de agresividad del hepatocarcinoma celular¹²⁶.

La activación sostenida de la ruta de las MAPK-ERKs se ha correlacionado directamente con la promoción del HCC^{81, 84, 121, 127}. Así, algunos estudios han descrito que una alteración en la modulación de la proteína Spread, un inhibidor de la ruta Ras/Raf/ERK, está relacionada con el desarrollo del cáncer hepático¹²⁷. Además, se ha observado que mediante la activación de la quinasa RSK se produce la fosforilación e inactivación de diversas proteínas proapoptóticas (Bad)^{81, 82}. De manera similar, la alteración de las rutas de los factores de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento tumoral- β (TGF- β) también se han relacionado ampliamente con el desarrollo del HCC^{84, 121}. Respecto a la familia de proteínas quinasa C, se debe mencionar que la sobreexpresión de las isoformas PKC α y PKC δ es frecuente en la mayoría de las líneas celulares de hepatocarcinoma humano⁹⁶.

La inflamación constituye otro factor importante en el desarrollo del cáncer, incluido el HCC. Se ha descrito que la activación sostenida del NF- κ B en el hígado es característica del hepatocarcinoma celular¹²⁸, ya que promueve la expresión de los miembros antiapoptóticos de la familia de genes *bcl-2* y de los inhibidores de caspasas^{47, 84}.

La activación de AP-1 también se ha relacionado con el desarrollo de HCC tras la infección del virus de la hepatitis B¹²¹. Además, durante el desarrollo tumoral hepático, Jun, uno de los principales componentes de AP-1, bloquea la apoptosis porque antagoniza las acciones de p53¹²⁹. También, recientemente, se ha descrito la implicación del factor de transcripción Nrf2 en el desarrollo de HCC, y se ha asociado con el incremento de los niveles de GST-P en los hepatocitos tumorales, ya que el gen de esta enzima no se expresa en células hepáticas normales¹¹⁷.

La mayoría de las alteraciones genéticas que se observan en el HCC se deben a un desequilibrio entre los miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia de genes *bcl-2*. El gen *bcl-xL* aumenta su expresión en un gran porcentaje de casos de HCC, al contrario que otros miembros, como *bax* o *bcl-xs*, que presentan niveles disminuidos^{47, 84}.

De todo lo anterior se deduce que un gran número de eventos moleculares describen la progresión del hepatocarcinoma celular y parecen comprometer el balance entre las señales de supervivencia y muerte. De esta manera, algunas moléculas fisiológicamente proapoptóticas disminuyen su expresión o se inactivan en el HCC, aunque el desequilibrio entre la supervivencia y la muerte se debe principalmente al aumento de los niveles de expresión de las señales antiapoptóticas en los hepatocitos⁸⁴.

3. Polifenoles de la dieta y cáncer.

En el desarrollo del cáncer, además del componente genético, los factores ambientales tienen un papel muy importante, y la dieta es una de las principales variables⁴⁹. De hecho, existe una amplia variedad de sustancias de la dieta que pueden estimular el desarrollo y crecimiento tumoral en animales de experimentación al transformar las células normales en células cancerosa¹³⁰⁻¹³². Sin embargo, en los últimos años, se ha observado una relación entre un alto consumo de frutas y verduras y un menor riesgo de desarrollar cáncer^{23, 23, 133-135}. En este sentido, diversos estudios realizados en diferentes líneas celulares, modelos animales y ensayos epidemiológicos sugieren el papel protector de los polifenoles de la dieta frente al riesgo de padecer cáncer^{3, 23, 49, 51}. Esta actividad protectora de los polifenoles no sólo se asocia a sus propiedades anticarcinogénica y antimutagénica, sino también a sus actividades antioxidante y anti-inflamatoria^{3, 49}.

3.1. Estudios epidemiológicos.

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de determinados alimentos vegetales o ciertos polifenoles proporciona un efecto protector frente al desarrollo de distintos tipos de cáncer. Así, la ingesta de una bebida rica en isoflavonas de la soja ha mostrado una correlación negativa frente al riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, de mama o de colon⁵¹ (Tabla 2). No obstante, se ha de mencionar que el consumo de ciertos alimentos puede presentar un efecto beneficioso frente al desarrollo de un tipo de cáncer determinado y no tener efecto frente a otro. En este sentido, diversos estudios epidemiológicos han relacionado el consumo de té verde con una disminución del riesgo de padecer cáncer de mama, de esófago y de estómago⁵¹; sin embargo, el consumo de esta bebida rica en catequinas no parece mostrar ningún efecto respecto al riesgo de padecer cáncer de páncreas⁵¹ (Tabla 2).

INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla 2. Estudios epidemiológicos en los que se analiza el posible efecto preventivo de diversos alimentos vegetales o polifenoles puros frente al riesgo de padecer distintos tipos de cáncer en humanos. (Adaptado de Ramos, S. 2008)⁵¹.

Alimento/ Polifenol	Población de estudio	Tipo de cáncer	Efecto
Té verde	♀	Cáncer de mama	Disminuye el desarrollo de cáncer.
	♀ y ♂	Cáncer pancreático	No disminuye el riesgo de padecer cáncer
	♀ y ♂	Cáncer esófago y gástrico	Reduce el desarrollo del cáncer.
Catequinas	♀	Cáncer rectal	Reduce el desarrollo del cáncer.
Café	♀	Cáncer de endometrio	Reduce el desarrollo del cáncer.
	♀ y ♂	Cáncer colorectal	No disminuye el riesgo de cáncer
	♀ y ♂	Hepatocarcinoma	Disminuye el desarrollo de cáncer.
Soja	♂	Cáncer de pulmón	Disminuye el desarrollo de cáncer.
	♀	Cáncer de mama	Disminuye el desarrollo de cáncer.
	♀	Cáncer colorectal	Disminuye el desarrollo de cáncer.
Manzana	♀ y ♂	Cáncer de colon	Reduce el desarrollo del cáncer.
	♀	Cáncer colorectal	Reduce el desarrollo del cáncer.
	♂	Cáncer de pulmón	No disminuye el riesgo de padecer cáncer.
	♀	Cáncer de pulmón	Reduce el desarrollo del cáncer.
Quercetina	♂	Cáncer de pulmón	Reduce el desarrollo del cáncer.
	♀ y ♂	Cáncer gástrico	Reduce el desarrollo del cáncer.

De manera similar, se ha mostrado una relación inversa entre el consumo de una bebida rica en ácidos hidroxycinámicos como el café (2 tazas/día) y el riesgo de desarrollar cáncer hepático y cáncer de endometrio⁵¹; sin embargo, no parece que el café disminuya el riesgo de padecer cáncer colorectal⁵¹ (Tabla 2).

Numerosos estudios epidemiológicos han ensayado también el efecto de los compuestos polifenólicos puros presentes en los alimentos. La ingesta de las catequinas presentes en el té se relaciona con una disminución del riesgo de desarrollar cáncer de colon⁵¹ (Tabla 2) y la ingesta de quercetina previene el cáncer de estómago⁵¹ (Tabla 2). Sin embargo, en determinados casos, el efecto asociado al consumo de estos compuestos no se correlaciona con el efecto ligado a los

alimentos donde se encuentran de manera abundante. Así, el consumo de quercetina tiene un efecto preventivo frente al cáncer de pulmón en la población masculina⁵¹ (Tabla 2); sin embargo, la ingesta de manzana, aunque muestra una relación inversa frente al desarrollo de cáncer de pulmón en las mujeres, no tiene ningún efecto frente a este tipo de cáncer en los hombres⁵¹ (Tabla 2).

3.2. Estudios en animales de experimentación.

Diversos estudios han evaluado la eficacia de los polifenoles en modelos animales de carcinogénesis (Tabla 3). Los efectos anticarcinogénicos del té y sus polifenoles frente al desarrollo de distintos tipos de cáncer (cavidad oral, esófago, estómago, intestino, colon, piel, hígado, vesícula biliar, próstata y mama) han sido ampliamente descritos en diversos modelos animales^{136, 137}. En particular, se ha mostrado que epigallocatequina-3-galato (EGCG) ejerce un efecto dosis-dependiente sobre la reducción del cáncer de intestino en ratones APC^{min/+} a través de la disminución de los niveles de las proteínas implicadas en la proliferación celular como c-Myc, p-AKT y p-ERKs 1/2⁵¹ (Tabla 3). Además, este flavanol es capaz de inhibir el desarrollo del cáncer de pulmón inducido por 4-metilnitrosamina-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) durante la etapa de iniciación o progresión del cáncer en ratones y hamsters⁵¹ (Tabla 3). Sin embargo, otro estudio muestra que la administración de EGCG en el agua de bebida de ratas con cáncer mamario no parece frenar el desarrollo tumoral⁵¹ (Tabla 3).

La administración de otros polifenoles, como la quercetina, reduce el tamaño y la invasividad del carcinoma mamario inducido por 9,10-dimetil-benzoantraceno (DMBA) en ratas Wistar albinas hembras, previene el desarrollo de lesiones preneoplásicas durante la carcinogénesis hepática inducida por dietilnitrosamina (DEN) y suprime la actividad tumorigénica de diferentes agentes carcinogénicos en ratas con cáncer de colon⁵¹ (Tabla 3).

Entre las isoflavonas de la soja, la genisteína parece poseer un importante papel protector frente a la carcinogénesis en animales; así, se ha demostrado que la administración de esta isoflavona o una dieta rica en soja reducen el desarrollo tumoral mamario en ratas, la prostatitis severa y el cáncer de ovario⁵¹ (Tabla 3). De manera similar, en ratones, se ha observado que la suplementación de la dieta con genisteína inhibe la metástasis pulmonar y el desarrollo de cáncer de piel inducido por luz UV⁵¹ (Tabla 3). En contra de estos resultados, Hsieh y colaboradores¹³⁸ han descrito que la genisteína promueve la actividad de iniciación

INTRODUCCIÓN GENERAL

tumoral del DMBA en el tejido mamario de ratones inyectados con células de adenocarcinoma mamario (MCF-7).

Tabla 3. Estudio sobre el efecto anticancerígeno de polifenoles puros o alimentos ricos en polifenoles sobre animales de experimentación. (Adaptado de Ramos, S. 2008)⁵¹.

Polifenol	Animal	Tipo de cáncer	Efecto
EGCG	Ratones	Intestino	Reduce el desarrollo tumoral
	Ratones	Pulmón	Disminuye el desarrollo del cáncer
	Hamsters	Pulmón	Disminuye el desarrollo del cáncer
	Ratas	Mama	No reduce el desarrollo tumoral
Quercetina	Ratas	Mama	Reduce invasividad del cáncer
		Hígado	Previene el desarrollo tumoral
	Ratas	Colon	Disminuye el desarrollo de cáncer
Genisteína	Ratas	Mama	Reduce el desarrollo tumoral
		Próstata	Disminuye el desarrollo tumoral
		Ovario	Reduce el desarrollo tumoral
	Ratones	Mama	Promueve la iniciación tumoral
	Ratones	Pulmón	Inhibe metástasis
	Ratones	Piel	Inhibe metástasis
Resveratrol	Ratas y ratones	Próstata	Reduce el desarrollo tumoral
		Mama	Inhibe actividad de DMBA
		Neuroblastoma	Inhibe acción de células Neuro-2A
Aceite de Oliva	Ratas	Colon	Reduce el cáncer asociado a alimentos fritos con otro tipo de aceites
		Mama	No promueve el cáncer inducido por DMBA
Café	Ratas	Mama	Reduce el numero de tumores
	Ratones	Hígado	Inhibe invasión y metástasis
Ácido clorogénico	Hamsters	Hígado	Inhibe acción de MAM

Los estilbenos también han mostrado un efecto anticarcinogénico frente al desarrollo de distintos tipos de cáncer. En concreto, en ratas y ratones se ha puesto de manifiesto que el resveratrol es capaz de prevenir el cáncer de próstata e inhibir la actividad carcinogénica del DMBA y de las células Neuro-2A (inyección subcutánea) para inducir un cáncer de mama o un neuroblastoma, respectivamente⁵¹ (Tabla 3). Además, se ha descrito que una dieta rica en

aceite de oliva no estimula el desarrollo del cáncer de mama inducido por DMBA en ratas⁵¹ (Tabla 3). De hecho, recientemente se ha observado que este tipo de aceite reduce el desarrollo del cáncer de colon asociado al consumo de alimentos fritos y ricos en grasas saturadas⁵¹ (Tabla 3).

Respecto a la actividad anticancerígena de los ácidos fenólicos, los constituyentes del café pueden prevenir la carcinogénesis en diversos modelos animales⁵¹. En este sentido, Nagasawa y colaboradores¹³⁹ han mostrado que los frutos del café reducen el número de tumores de mama espontáneos en ratones (Tabla 3). Por su parte, Miura y colaboradores¹⁴⁰ han puesto de manifiesto que la incorporación del extracto de café en la dieta de ratas con hepatoma suprime la invasividad celular y metástasis (Tabla 3). Además, el ácido clorogénico reduce el número de tumores hepáticos en hamsters inducidos tras la inyección de acetato metilazoximetanol (MAM)¹⁴¹ (Tabla 3).

3.3. Efectos quimiopreventivos de los polifenoles en cáncer.

Los polifenoles de la dieta pueden interferir en las distintas etapas de desarrollo de la carcinogénesis a través de varios mecanismos (Figura 13), y sus efectos van a depender del tejido o tipo celular, así como de la dosis y duración del tratamiento. En la mayoría de los casos, los mecanismos de acción molecular ligados al efecto anticarcinogénico de los polifenoles se ha estudiado *in vitro* y en modelos animales, aunque aún existe un gran desconocimiento de los mismos.

3.3.1. Actividad antioxidante.

Una generación excesiva de ROS puede contribuir a la iniciación tumoral⁴⁸. En esta etapa temprana del desarrollo del cáncer, los polifenoles, gracias a su actividad antioxidante, pueden prevenir del daño oxidativo al DNA causado por los radicales libres o los agentes carcinogénicos e impedir el proceso de iniciación de la carcinogénesis^{49, 51}. Dicho bloqueo puede tener lugar a través de diferentes mecanismos: 1) captación directa de los radicales libres, 2) quelación de los cationes divalentes implicados en reacciones de Fenton y 3) modulación de las enzimas relacionadas con el estrés oxidativo^{49, 51}.

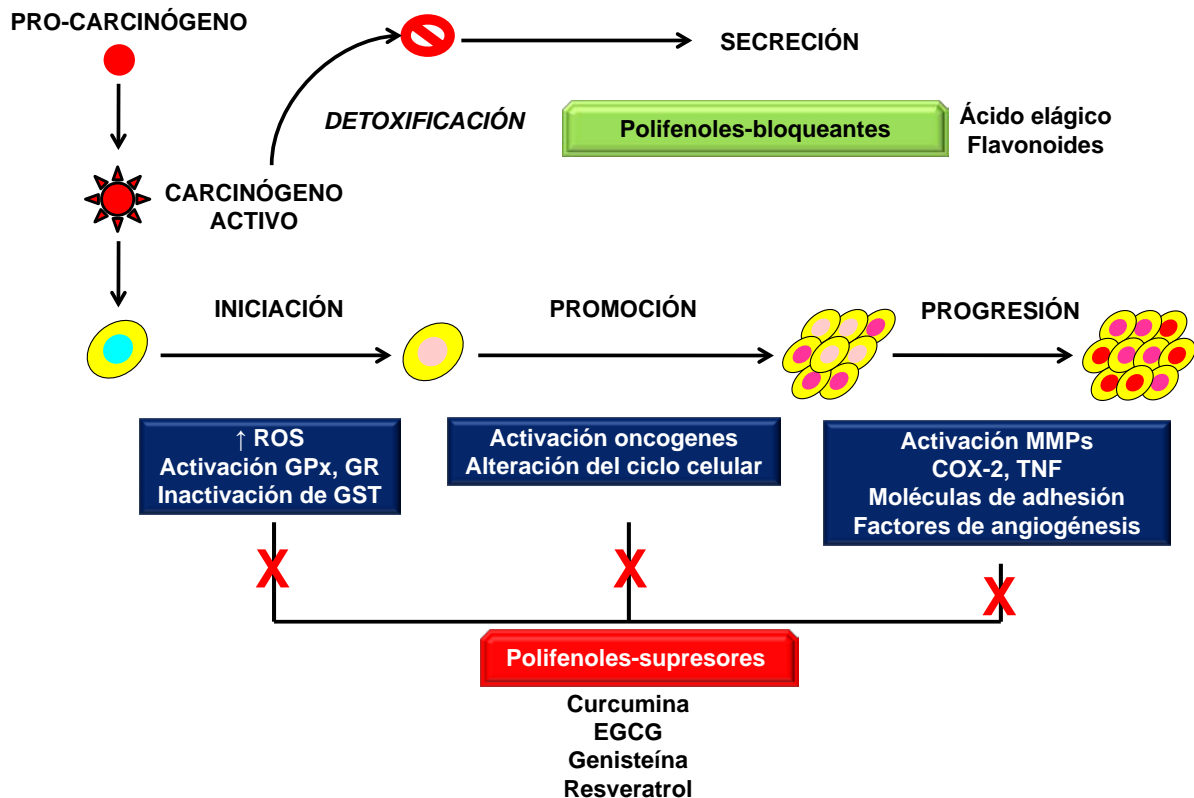


Figura 13.- Fases de intervención de los polifenoles en el proceso de carcinogénesis.

(Adaptado de Surh, Y.J. 2003)⁴⁹.

La quercetina posee una importante actividad anticancerígena que con frecuencia se relaciona con su efecto antioxidante. Este flavonol disminuye la aparición de tumores durante la fase de iniciación de la hepatocarcinogénesis inducida por DEN a través de la estimulación del sistema de defensa antioxidante de las células, incrementa los niveles de GSH y la actividad de las enzimas antioxidantes (GPx, SOD y catalasa)¹⁴². De manera similar, en la línea celular HepG2, se ha observado que la quercetina y otros polifenoles (rutina, EGCG) estimulan el sistema de defensa antioxidante de la célula mediante el incremento de las reservas de GSH y la expresión de las enzimas de defensa antioxidante, como la GPx, lo que induce cambios favorables que previenen o retrasan condiciones que favorecen el estrés oxidativo¹⁴³⁻¹⁴⁵.

EGCG y genisteína son también importantes captadores de radicales libres. La genisteína protege a las neuronas del estrés oxidativo inducido por agentes pro-oxidantes como el *tert*-butilhidroperóxido (*t*-BOOH). Por su parte, EGCG reduce el estrés oxidativo causado por el H₂O₂ en las células HepG2 a través de un incremento de los niveles de enzimas antioxidantes, lo que resulta en un aumento de las reservas de GSH¹⁴⁵. No obstante, otros polifenoles como la

luteolina, apigenina, hesperidina y naringenina no son capaces de impedir la apoptosis inducida por el H₂O₂ en las células endoteliales (HUVEC); sin embargo, cuando estas células se incuban en las mismas condiciones con otros polifenoles, como EGCG o quercetina, se inhibe la apoptosis inducida por H₂O₂ y se restaura la viabilidad celular¹⁴⁶.

Los polifenoles de la dieta también pueden actuar como pro-oxidantes dependiendo del tipo celular, dosis o duración del tratamiento, ya que pueden aumentar la producción de las ROS e inducir apoptosis en las células cancerígenas, lo que puede prevenir o disminuir el desarrollo tumoral. Así, la quercetina y la EGC inducen apoptosis en las células de cáncer de mama MDA-MB-468¹⁴⁷ y de adenocarcinoma pulmonar H661¹⁴⁸ respectivamente, a través de un incremento de los niveles intracelulares de ROS que provoca la formación de H₂O₂. De manera similar, EGCG induce apoptosis en las células de mieloma mediante la modificación del sistema redox (incremento de la generación de las ROS), ya que la adición de catalasa o SOD bloquea la apoptosis inducida por esta catequina¹⁴⁹.

3.3.2. Efecto sobre las enzimas de fase I y II. Elemento de respuesta antioxidante (ARE).

Durante la fase de iniciación del cáncer los polifenoles pueden intervenir sobre el metabolismo de los agentes carcinogénicos mediante: 1) la inhibición de las enzimas antioxidantes de fase I, como el citocromo P450 (CYP), que llevan a cabo reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis, hidratación e isomerización, y/o 2) la activación o modulación de la expresión génica de las enzimas detoxificantes de fase II, que están implicadas en reacciones de glucuronidación, sulfatación, acetilación, metilación y conjugación^{49, 51, 148}.

Diversos estudios *in vitro* han descrito que el efecto de los polifenoles sobre la modulación de las enzimas de fase I está relacionada con su estructura química y el tipo de reacción. En este sentido, se ha observado que los polifenoles como la quercetina, apigenina, miricetina, kaempferol y EGCG pueden inhibir el CYP1A1, lo que contrasta con el leve efecto de otros polifenoles como la naringenina, hesperetina, naringina, hesperidina o rutina¹⁵⁰. Del mismo modo, parece que los flavanoles son más eficaces que los flavonoles para inhibir a la enzima antioxidante quinona reductasa (QR)¹⁵⁰.

El efecto quimiopreventivo o protector de los polifenoles del té negro y verde frente a la inducción de distintos tipos de cáncer en animales se ha relacionado con su capacidad para modular el estado oxidativo de la célula. Dicha regulación se produce a través de la disminución de la actividad de las enzimas de fase I (CYP1A1, CYP1B1, citocromo b5 reductasa, QR) o mediante el incremento de la expresión de enzimas de fase II (GST, UDP-glucuronosiltransferasa)^{49, 51}. De manera similar, se ha demostrado que los polifenoles presentes en la manzana, como la quercetina, pueden proteger a las células LT97 de adenocarcinoma de colon frente a un posible daño oxidativo mediante el aumento de la expresión de las enzimas de fase II como GST y UDP-glucuronosiltransferasa¹⁵¹. Por su parte, el ácido clorogénico desarrolla un papel quimioprotector frente al 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA) en las células epidérmicas de ratón JB6 mediante el incremento de la actividad de las enzimas de fase II GST y NQO¹⁵², al igual que el resveratrol promueve la activación de la NQO-1 en las células de hepatoma de ratón¹⁵³.

La acción antioxidante de la mayoría de los polifenoles está mediada por el elemento de respuesta antioxidante (ARE) (5'-(G/A)TGACNNNGC(G/A)-3'), que se localiza en la región promotora de los genes de diversas enzimas antioxidantes y de metabolización de xenobióticos¹¹³. Así, los polifenoles del té negro desempeñan un papel protector frente al daño oxidativo en las células hepáticas y pulmonares de ratón, dado que inducen el incremento de los niveles de las enzimas detoxificantes de fase II GST y NQO1, y promueven la unión de Nrf2 al ARE¹⁵⁴. Por su parte, la quercetina protege a las células HepG2 de un daño oxidativo, induce el incremento de la expresión de NQO-1 a través de la activación de la vía de señalización de Nrf2¹⁵⁵, al igual que el ácido clorogénico, que en las células epidérmicas de ratón JB6 promueve la unión de Nrf2 al ARE e incrementa la expresión de GSTA1¹⁵². De manera similar, el café aumenta la expresión de las enzimas de fase II GST y aldo-ceto reductasa (AKR) a través de la inducción de Nrf2 como mecanismo quimiopreventivo de la hepatocarcinogénesis¹⁵⁶.

3.3.3. Efecto sobre las rutas apoptóticas.

Muchos polifenoles desempeñan su papel quimiopreventivo frente a la carcinogénesis a través de la inducción de la apoptosis^{3, 51}. En este sentido, se ha de destacar que las células tumorales parecen ser más sensibles al efecto pro-apoptótico de los polifenoles que las células normales. Así, se ha observado que EGCG promueve la diferenciación celular en los queratinocitos normales mediante la activación de las MAPKs (MEKK1, MEK3 y p38),

mientras que en las células cancerígenas reduce la proliferación celular mediante la disminución de la activación de AP-1¹⁵⁷.

En relación al efecto de los polifenoles sobre los procesos de proliferación/supervivencia y muerte celular, se ha de mencionar que éste puede variar en función de la dosis utilizada. Así, las bajas concentraciones de quercetina, polifenoles del té verde y EGCG pueden promover mecanismos de supervivencia mediante la activación de la vía de las MAPKs (ERKs, JNKs)¹⁵⁸ o el incremento de los niveles de p-AKT^{159, 160}. Por el contrario, las altas concentraciones de los polifenoles, como la quercetina, pueden ejercer un efecto pro-apoptótico mediante la activación de la cascada de caspasas¹⁵⁸ y la reducción de los niveles fosforilados de AKT y ERKs^{159, 160}.

EGCG puede inducir la muerte celular programada en varias líneas celulares de cáncer a través de la activación de las proteínas involucradas en la cascada apoptótica como las caspasas-3, -8 y -9^{161, 162}, la liberación mitocondrial del citocromo *c*, las proteínas Smac/DIABLO y el factor inductor de apoptosis (AIF)^{149, 163}, y la inhibición de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP2, XIAP, Bcl-2, Bcl-x_L y Bid)¹⁶². En ciertos casos, la inducción de apoptosis por EGCG implica la activación de las dos rutas apoptóticas¹⁶¹. En células de sarcoma 180, se ha observado que este flavanol induce la parada del ciclo celular en G2/M, disminuye los niveles de Bcl-2 y c-Myc e incrementa los niveles de p53 y Bax¹⁶⁴, al igual que en las células de cáncer de próstata PC-3 donde además induce la activación de poli-ADP-ribosa-polimerasa γ (PARP γ)¹⁶⁵. De manera similar, en la línea de cáncer de próstata LNCaP, las teaflavinas del té inducen apoptosis a través del incremento de la expresión del gen *p53*, el aumento de la relación Bax/Bcl2, la liberación de citocromo *c* y la activación de las caspasas -3 y -9¹⁶⁶. Sin embargo, no todos los polifenoles son capaces de inhibir el crecimiento de las líneas celulares cancerígenas. Así, la epicatequina no mostró ningún efecto sobre las células de cáncer de colon HT-29¹⁶⁷ y tampoco la rutina en las células Caco-2¹⁶⁸, por lo que se consideran como polifenoles inactivos respecto a su capacidad de inducir apoptosis.

La quercetina puede inducir apoptosis en diversas líneas celulares cancerígenas, observándose alteraciones morfológicas, fragmentación del DNA¹⁶⁹, activación de las proteínas proapoptóticas de la familia de genes *bcl-2* (Bax)⁹⁸, disminución de las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-x_L y Bcl-2)¹⁵⁹, activación de las caspasas (caspasas-3,-7,-9)¹⁵⁹, liberación del citocromo *c* al citosol¹⁷⁰ y activación de PARP¹⁵⁹. Además, la administración simultánea de varios polifenoles fenólicos puede tener un efecto sinérgico en la inducción de apoptosis de las

INTRODUCCIÓN GENERAL

células cancerígenas, como se ha observado para la quercetina y el ácido elágico en las células sanguíneas de pacientes con leucemia¹⁷¹. Por su parte, el ácido elágico solo puede inducir apoptosis a través de la activación de la vía mitocondrial¹⁶⁸.

La curcumina induce apoptosis a través de la activación de la vía mitocondrial o la vía de los receptores de muerte en diversas líneas de cáncer de colon^{172, 173}. De manera similar, en las células de carcinoma pulmonar HLF, la luteolina incrementa los niveles de Fas y disminuye la expresión de survivina y STAT3¹⁷⁴, mientras que en las células HepG2 induce la activación de las caspasas-3 y -9, la liberación del citocromo *c* y el aumento de la translocación de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak hacia la mitocondria⁸⁶.

Entre los ácidos fenólicos, se ha descrito que en la línea de cáncer de colon HT-29, el ácido clorogénico y los ácidos *p*-hidroxibenzoicos no pueden inhibir el crecimiento celular¹⁶⁷; sin embargo, se ha demostrado que el ácido clorogénico y los ácidos *o*- y *m*-cumáricos son capaces de inhibir la proliferación de los preadipocitos 3T3-L1 a través de la inducción de la parada del ciclo celular en fase G1 ¹⁷⁵.

3.3.4. Efecto sobre las vías de proliferación y supervivencia.

La modulación de las vías de transducción de señales PI3K/AKT, MAPKs(ERKs, JNKs, p38MAPKs), PKCs, AP-1 y NF- κ B está relacionada con la regulación de la supervivencia, proliferación celular y la muerte celular programada^{76, 83}.

3.3.4.1. Efecto sobre las vías de señalización PI3K/AKT, MAPKs y PKCs.

El efecto anticarcinogénico de EGCG en las células de músculo liso se ha atribuido a la inhibición de la PI3K y la disminución de la fosforilación de las ERKs¹⁷⁶. Además, las teaflavinas y EGCG inhiben la vía PI3K/AKT a través de la disminución de los niveles de ambas subunidades de la PI3K (p85 y p110) y la reducción de los niveles fosforilados de AKT y ERK-1/2^{177, 178}.

El efecto apoptótico de la quercetina en células de melanoma de ratón B16-BL6 implica la inhibición dosis-dependiente de la isoforma PKC α y la translocación desde el citosol al núcleo de PKC δ ⁹⁸. Por su parte, la apoptosis inducida por la curcumina en varias líneas celulares

cancerígenas implica, además de la parada del ciclo celular, la inhibición de la fosforilación de AKT¹⁷³. De manera similar, las proantocianidinas presentes en la manzana inducen apoptosis en las células de cáncer de colon SW620 mediante el incremento de las MAPKs (ERK1/2 y JNKs) y de la actividad de PKC¹⁷⁹. Por el contrario, EGCG protege a las células PC12 frente al estrés oxidativo al inducir la translocación de PKC α hacia la membrana plasmática¹⁸⁰.

El tratamiento con genisteína de las células epiteliales mamarias MCF-10F supone la activación de p38-MAPK y la inactivación de ERK1/2, sin modificar la actividad de las JNKs¹⁸¹, mientras que la apoptosis que la luteolina induce en las células HepG2 implica la activación de las JNKs⁸⁶. De manera similar, las antocianidinas inducen apoptosis en las células sanguíneas de pacientes con leucemia a través de la activación de las JNKs y de p38-MAPK dependientes de ROS¹⁸².

3.3.4.2. Efecto sobre los factores de transcripción NF- κ B, AP-1 y Nrf2.

EGCG es capaz de inducir apoptosis en diversas líneas cancerígenas, como las células de hepatocarcinoma (HLE, HepG2, HuH-7, PLC/PRF/5)¹⁶² y la línea celular de cáncer de mama NF639¹⁷⁷. Este proceso de muerte causa la disminución de los niveles de NF- κ B (p65 ó p50)¹⁶²⁻¹⁷⁷, la activación de su principal inhibidor (I κ B)¹⁸³ o la inhibición de IKK¹⁸⁴. Por su parte, la apoptosis inducida por las teaflavinas implica además de un descenso de los niveles fosforilados de las ERKs y la p38-MAPK, la disminución en la expresión de NF- κ B¹⁶⁶.

La curcumina inhibe la actividad de NF- κ B, la fosforilación de I κ B y la acción de IKK, lo que conduce a la supresión de la activación de la AKT e induce la parada del ciclo celular en G1/S y la apoptosis¹⁷³. De manera análoga, las isoflavonas, como la genisteína, inhiben el crecimiento celular e inducen apoptosis en las células de cáncer de mama mediante la inhibición de AKT, ERKs, NF- κ B y AP-1¹⁸⁵.

Todos estos resultados sugieren que la inactivación de NF- κ B por los polifenoles está mediada en parte por la inactivación de las quinasas AKT y/o MAPKs, y apunta hacia la existencia de una conexión entre estas vías de señalización¹⁸⁵.

Por otro lado, se ha observado que los flavonoides, como EGCG, impiden la activación de AKT y NF- κ B promovida por la exposición repetida a leves estímulos de estrés (H₂O₂),

favoreciendo la inducción del proceso apoptótico ante una situación de estrés agudo¹⁸⁶. De manera similar, EGCG y la EC impiden la activación de AKT inducida por diversos agentes carcinógenos como la radiación UV o el PMA, necesaria para estimular la vía de señalización del NF- κ B e inducir la muerte celular programada. En esta situación, se produce la inhibición del proceso apoptótico promovido por estos agentes mediante la restauración de los niveles de expresión de miembros de la familia de proteínas Bcl-2 y la disminución de los niveles de FasL¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Por su parte, el ácido clorogénico protege a las células epiteliales de ratón JB6 frente a la carcinogénesis inducida por UVB o TPA a través de la transactivación de AP-1 y NF- κ B¹⁵². Las bajas concentraciones de ácido clorogénico disminuyen los niveles fosforilados de JNKs, p38-MAPK y MAPK4, siendo necesarias dosis elevadas para inhibir la activación de las ERKs inducida por los agentes carcinogénicos¹⁵².

3.4. Polifenoles y ensayos clínicos en humanos.

Dadas las numerosas evidencias *in vitro* e *in vivo* de los efectos quimiopreventivos de un gran número de polifenoles, en las dos últimas décadas se han realizado también diversos ensayos clínicos en humanos para analizar la farmacocinética, eficacia y seguridad de estos compuestos⁵¹.

En un estudio llevado a cabo con pacientes con cáncer de próstata que consumieron diariamente zumo de granada, con un contenido de ácido gálico total equivalente a 570 mg, se observó que el zumo era bien tolerado y los pacientes mostraban una importante mejoría del cáncer de próstata sin observarse ningún efecto secundario destacable¹⁸⁹.

Los polifenoles del té verde han sido uno de los compuestos más estudiados. En muestras histológicas y citológicas de pacientes con ciertas enfermedades incurables se demostró que distintas dosis de extracto de té verde (4,2 g/m² una vez al día o 1 g/m² tres veces al día), aunque no resultaban tóxicas y presentaban una buena tolerancia, no inducían una mejoría de ninguna de estas patologías^{190, 191}. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que los polifenoles del té verde presentan una actividad antineoplásica en pacientes con cáncer de próstata que recibieron una dosis diaria de 6 g de té verde administrada en un total de 6 dosis¹⁹², al igual que en pacientes con hepatocarcinogénesis que tomaron 4 cápsulas diarias con un contenido de 500-1000 mg de polifenoles de té verde¹⁹³.

La curcumina es otro polifenol cuya actividad quimiopreventiva en humanos ha sido ampliamente cuestionada, ya que aún no se ha demostrado en ningún estudio clínico su eficacia frente al cáncer. En un estudio de 15 pacientes con cáncer colorectal, la administración de 36-180 mg diarios de extractos de curcumina durante 4 meses mostró que es bien tolerado por el organismo y no se observaron dosis limitantes de toxicidad¹⁹⁴.

OBJETIVOS GENERALES

En nuestro grupo de trabajo se ha puesto a punto un modelo de estrés oxidativo en células hepáticas (HepG2). Trabajos previos realizados en dicho modelo han demostrado un efecto protector de las concentraciones fisiológicas de los extractos polifenólicos de frutas¹⁹⁵ y de los polifenoles puros¹⁴⁴. Cuando las dosis de estos compuestos fenólicos se incrementan, se produce el efecto contrario, la inducción de la apoptosis¹⁹⁶. Sin embargo, los procesos moleculares responsables de estos efectos aún no han sido analizados y constituyen el **objetivo principal** de este trabajo. En este sentido, la línea de hepatocarcinoma celular humano HepG2 permite valorar el potencial efecto anticancerígeno de los polifenoles de la dieta (quercetina) mediante el estudio de las señales moleculares que regulan la apoptosis, proliferación y supervivencia celular. Además, esta línea celular se considera uno de los modelos experimentales *ex vivo* que reproduce con mayor fidelidad al hepatocito humano, con lo que también permite evaluar el potencial efecto protector de los polifenoles de la dieta (epicatequina y ácido clorogénico). De manera similar, la puesta a punto de un modelo animal de daño oxidativo hepático posibilita valorar *in vivo* el potencial efecto protector de una dieta suplementada con un alimento rico en polifenoles (cacao). Con este fin, se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudiar el efecto directo de la quercetina en las células HepG2. Análisis de la modulación de proteínas clave en los procesos de proliferación/supervivencia y/o muerte celular.
2. Evaluar el efecto de la epicatequina y el ácido clorogénico en línea celular HepG2. Análisis del estado redox y de la señalización molecular relacionada con la proliferación, supervivencia y/o muerte celular.
3. Determinar del potencial efecto protector de una dieta rica en cacao frente al daño oxidativo inducido por dietil-*N*-nitrosamina en el hígado de la rata. Valoración de los sistemas de defensa antioxidante y detoxificante e implicación de proteínas clave relacionadas con la proliferación, supervivencia y/o muerte celular.

RESULTADOS

I. Efecto apoptótico de la quercetina en las células HepG2.

Antecedentes.

1. Generalidades.

La quercetina (Figura 1.1) es uno de los flavonoides más estudiados por su abundancia y ubicuidad en los alimentos de la dieta como la manzana, cebolla, cereza, y brócoli. Su ingesta diaria oscila entre 5 y 40 mg/día²² y se ha estimado que puede alcanzar hasta 200-500 mg/día en las personas con una elevada ingesta de frutas y verduras, sobre todo en aquellos que ingieren la piel de las mismas⁹.

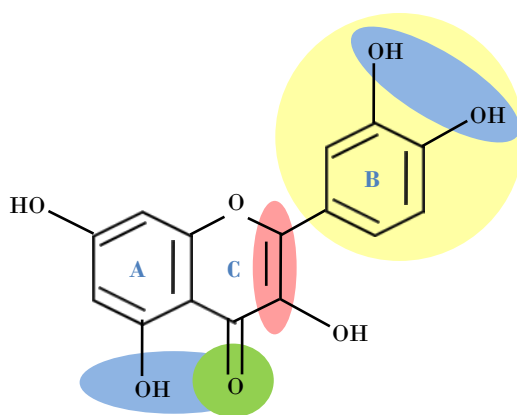


Figura 1.1. Estructura química de quercetina.

En las plantas o alimentos de origen vegetal, la quercetina, al igual que la mayoría de los polifenoles, se encuentra mayoritariamente conjugada en forma de glucósidos como la quercitrina o la rutina^{4, 197}. Los individuos sanos absorben hasta un 53% de la quercetina tras la ingesta de 100 mg del flavonoide, de la cual hasta un 93% es metabolizada: más del 90% se metaboliza en el intestino delgado y hasta un 3% en el hígado^{4, 198}. Sin embargo, si se administran dosis altas de quercetina, su metabolismo ya no tiene lugar mayoritariamente en el intestino, sino en el hígado¹⁹⁹.

Los principales metabolitos de la quercetina que se encuentran en el plasma son conjugados de sulfatos y glucurónidos, además de quercetina-*O*-metilada y glucurónidos de quercetina-*O*-metilada, que resultan de la acción de catecol-metil-*O*-transferasas (COMT) en el hígado y los riñones^{38, 197, 198}. Por otro lado, si la quercetina alcanza la microflora colónica, puede ser degradada y generar diferentes ácidos fenólicos y dióxido de carbono^{4, 197, 198}.

La concentración máxima de quercetina en el plasma humano es de 1,5 $\mu\text{mol/L}$ dos horas después de una ingesta de cebolla que equivale a 50 mg de quercetina¹⁹⁷. No obstante, estudios recientes realizados en animales de experimentación (cerdos y ratas) han demostrado que la ingesta diaria repetida de alimentos ricos en quercetina resulta en la acumulación de la aglicona y sus metabolitos en el cuerpo³⁷. En general, los metabolitos de quercetina presentan una menor capacidad para captar radicales libres en comparación con el flavonoide; sin embargo, las agliconas de quercetina se pueden liberar de sus metabolitos glucuronidados por aumento de la actividad β -glucuronidasa, lo que puede ocurrir durante el proceso de inflamación¹⁹⁷.

La quercetina posee una gran variedad de propiedades biológicas con potencial aplicación clínica por sus posibles efectos beneficiosos para la salud^{49, 200}. En este sentido, en 1998, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasificó a la quercetina como un compuesto sin riesgo para el ser humano²⁰¹. Además, diversos estudios realizados *in vitro* e *in vivo* para analizar las potenciales propiedades genotóxicas y carcinogénicas de la quercetina sostienen que los niveles de este flavonol que se ingieren de manera habitual (5-40 mg/día) no conllevan ningún efecto adverso para la salud²⁰².

Entre las diferentes propiedades que hacen de este flavonoide un potencial agente preventivo y/o terapéutico natural frente a las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como el cáncer, destacan su actividad antioxidante, anticancerígena y antiinflamatoria^{22, 51}. En este sentido, diversos estudios epidemiológicos realizados con manzana han demostrado que su consumo diario reduce el riesgo de padecer cáncer de colon y de pulmón^{203, 204}. Además, algunos trabajos han mostrado que la quercetina puede retrasar o prevenir el desarrollo tumoral en modelos animales²⁰⁵⁻²⁰⁹. De manera análoga, la quercetina tiene efectos citotóxicos y antiproliferativos sobre diversas líneas celulares cancerígenas, llegando a causar la muerte celular principalmente mediante la inducción de la apoptosis^{98, 159, 169, 210}.

Estos resultados tan prometedores en relación con su potencial preventivo han derivado en la rápida incorporación al mercado de la quercetina. En Japón, este flavonoide se encuentra entre los aditivos de alimentos permitidos ²¹¹, e incluso pueden encontrarse en el mercado suplementos nutricionales que contienen entre 200 y 500 mg de quercetina, con recomendaciones de hasta 1000 mg diarios. Sin embargo, se ha de destacar que aún existe un

gran desconocimiento acerca del mecanismo de acción molecular de la quercetina en relación con su actividad anticancerígena.

2. Efecto de la quercetina sobre la modulación de la muerte celular programada.

La quercetina parece capaz de promover la apoptosis en diversas líneas celulares cancerígenas a través de varios mecanismos. Choi y colaboradores²¹⁰ han demostrado que una concentración 100 $\mu\text{mol/L}$ de quercetina induce apoptosis asociada a una parada del ciclo celular en la fase G1 en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-453. Además, en la línea celular de glioma U138M, la quercetina para el ciclo celular en G2²¹², mientras que en las células de carcinoma escamoso oral SCC-9, lo hace en la fase S, aunque de manera secundaria también indujo necrosis, tipo de muerte celular que se puso de manifiesto mediante la valoración de los niveles de LDH²¹³.

Durante la inducción del proceso apoptótico puede tener lugar la fragmentación del DNA. Así, Sasaki y colaboradores¹⁶⁹ han demostrado que la quercetina induce apoptosis en la línea celular neuronal PC12, fragmentación del DNA y activación de la cascada de caspasas. De manera más concreta, en las células de cáncer de próstata PC-3, la quercetina activa las caspasas clave de la vía mitocondrial (caspasa-3 y caspasa-9)²¹⁴, mientras que en las células LNCaP la apoptosis inducida por quercetina requiere además la activación de la caspasa iniciadora clave de la vía de los receptores de muerte (caspasa-8)^{214, 215}. Otro estudio realizado sobre la línea celular de hepatoma de rata H4IIE describe que las altas concentraciones de quercetina inducen apoptosis mediante el incremento de las caspasas-7, -9 y -3²¹⁶.

Diversas alteraciones ligadas a la inducción del proceso apoptótico por la quercetina incluyen el incremento de los niveles de PARP activa^{159, 215}, la disminución de los niveles de expresión de proteínas de choque térmico como Hsp90²¹⁴ y el desequilibrio entre los niveles proteicos de los miembros anti- (Bcl-xL, Bcl-2) y pro-apoptóticos (Bax y Bad) de la familia de genes *bcl*-2¹⁵⁹. En este sentido, Lee y colaboradores²¹⁵ han demostrado que la quercetina provoca apoptosis en la línea celular LNCaP mediante la disminución de los niveles de expresión de Bcl-xL, el aumento de la translocación de Bax hacia la membrana mitocondrial y la activación de Bad.

3. Efecto de la quercetina sobre la modulación de las vías de señalización clave en proliferación/supervivencia.

La quercetina puede inhibir la vía de señalización PI3K/AKT e inducir apoptosis²¹⁷. Así, Gulati y colaboradores²¹⁸ han descrito que este flavonol inhibe la fosforilación de la AKT en la línea celular de cáncer de mama HCC1937, al igual que Kim y colaboradores en las líneas de adenocarcinoma de próstata DU-145 y LNCaP²¹⁹.

El daño citotóxico y/o la inhibición de la supervivencia celular provocados por la quercetina también puede ir ligado a una modulación de las ERKs. De este modo, la quercetina disminuye la viabilidad de la línea celular de glioma A172, causa un descenso en los niveles fosforilados de AKT y de ERKs, junto con un incremento de la actividad caspasa-3 y una disminución de los niveles de expresión de las proteínas anti-apoptóticas XIAP y survivina²²⁰. No obstante, se ha de mencionar que el efecto citotóxico que la quercetina provoca en diversas líneas celulares se ha relacionado tanto con la activación como con la inhibición de las ERKs. Así, en neuronas corticales primarias, el daño citotóxico provocado por la quercetina se debe a una inhibición de los niveles activos de estas quinasas¹⁶⁰, mientras que en células de cáncer de próstata (DU-145 y PC3) y cáncer de pulmón (A549), la inducción de la apoptosis mediada por este flavonoide implica el incremento de los niveles activos de las ERKs^{159, 217}.

Otras MAPKs, como JNKs y p38, también pueden verse moduladas por la acción de la quercetina. Este flavonol acelera la apoptosis inducida en las células osteoblásticas MC3T3-E1 por el TNF a través de la activación de las JNKs²²¹. Por su parte, Ishikawa y colaboradores²²² han demostrado que el efecto antiapoptótico de la quercetina en la línea celular SM43 se relaciona con la inhibición de la vía JNK/AP-1.

En relación con la p38-MAPK, la quercetina provoca un incremento de los niveles fosforilados de esta proteína en la línea celular de cáncer de próstata DU-145²¹⁷. Sin embargo, la apoptosis que provoca el flavonoide en estas células no parece deberse a la modulación de p38, sino al incremento de los niveles fosforilados de las ERKs²¹⁷.

La apoptosis inducida por la quercetina también parece implicar la regulación de distintas isoformas de la PKC^{96, 98, 99}. En este sentido, Zhang y colaboradores⁹⁸ han demostrado

que el efecto apoptótico de la quercetina en las células de melanoma B16-BL6 supone la disminución de la expresión de PKC α y el incremento de la translocación de PKC δ hacia el núcleo.

4. Efecto de la quercetina sobre la regulación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1.

La quercetina se considera un inhibidor natural de la vía de señalización del NF- κ B. En este sentido, se ha demostrado que este flavonol es capaz de inhibir la activación del NF- κ B inducida por agentes inflamatorios como el éster forbol PMA y el ionóforo de calcio A23187 (PMACI)²²³. Esta inhibición de la vía del NF- κ B puede estar vinculada al efecto apoptótico de la quercetina. Así, Lee y colaboradores²²⁴ han descrito que este flavonoide induce apoptosis en las células epidérmicas JB6 (JB6P+) mediante la disminución de la activación de AP-1 y NF- κ B inducida por TPA, lo que inhibe su transformación neoplásica.

Todas estas evidencias ponen de manifiesto que la quercetina es capaz de inducir apoptosis en diversas líneas celulares. Por tanto, resulta de especial interés investigar la potencial actividad anticancerígena y el mecanismo de acción molecular de este flavonoide en la línea celular HepG2 mediante la evaluación de las principales señales relacionadas con este tipo de muerte y la potencial modulación a lo largo del tiempo de las vías de proliferación/supervivencia y factores de transcripción relacionados con estos procesos.

- Artículo 1.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17056790> **65**
- Granado-Serrano A.B.**, Martín M.A., Bravo L., Goya L. and Ramos S. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation Bcl-2 and inhibition of PI-3-kinase/AKT and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *Journal of Nutrition* 2006, 136(11):2715-2721.
- Artículo 2.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18324708> **73**
- Granado-Serrano A.B.**, Martín M.A., Bravo L., Goya L. and Ramos S. Time course regulation of quercetin on cell survival/proliferation pathways in human hepatoma cells. *Molecular Nutrition and Food Research* 2008, 52(4):457-64.
- Artículo 3.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20358477> **81**
- Granado-Serrano A.B.**, Martín M.A., Bravo L., Goya L. and Ramos S. Quercetin modulates NF- κ B and AP-1/JNK pathways to induce cell death in human hepatoma cells. *Nutrition and Cancer: An International Journal* 2010 62(3):390-401.

Discusión.

La quercetina podría considerarse un potencial agente natural preventivo y/o terapéutico, ya que su ingesta diaria a través de suplementos de la dieta puede dar lugar a concentraciones plasmáticas constantes (10-50 $\mu\text{mol/L}$) que son capaces de inducir la apoptosis en las células en cultivo²¹⁶. Además, se ha demostrado que la quercetina posee actividad antiproliferativa en diversas líneas celulares cancerígenas como las células de glioma²¹², cáncer de pulmón¹⁵⁹, páncreas¹⁷⁰, melanoma⁹⁸ y hepatoma^{196, 216}. De acuerdo con estas observaciones, en nuestro estudio, la quercetina disminuyó la viabilidad de la línea celular de hepatoma humano HepG2 de manera dosis- y tiempo-dependiente, provocando un incremento de la liberación de LDH y alterando el estado redox de la célula. El incremento de la liberación de LDH, que corroboró resultados previos observados en las células HepG2 tratadas con quercetina¹⁴³ y se ha relacionado con muerte por necrosis, ha sido observado también en células expuestas a otros agentes reductores como el glutatión o el ascorbato²²⁵.

La alteración de los niveles intracelulares de ROS, que la quercetina provoca en las células HepG2, se podría relacionar con su actividad antiproliferativa. En este sentido, en los hepatocitos fetales de rata, se ha descrito que la inducción de apoptosis implica un incremento previo de los niveles intracelulares de ROS, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, liberación del citocromo *c* y activación de la caspasa-3¹⁷⁴. No obstante, se ha de destacar que el incremento de ROS no siempre es un requisito para la inducción de la cascada apoptótica, como se ha descrito anteriormente para el factor de crecimiento tumoral $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)²²⁶. De acuerdo con observaciones previas en nuestro laboratorio¹⁹⁶, tras un incremento inicial (4 horas), la quercetina provocó la disminución de los niveles intracelulares de ROS (18 horas), lo cual podría deberse a la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial causada por el flavonoide²²⁷, fenómeno que se relaciona tanto con la apoptosis como con la necrosis.

La caspasa-8 no se activó en respuesta al tratamiento con quercetina en las células HepG2, sino que la apoptosis se indujo a través de la vía mitocondrial; se estimuló el procesamiento de las caspasas-9 y -3, detectándose los mayores niveles de estas proteínas activas tras la incubación de las células con la concentración de 50 $\mu\text{mol/L}$ de quercetina. La activación proteolítica de las caspasas coincidió con la modulación de los miembros de la familia de genes *bcl-2* analizados, es decir, la disminución de la relación Bcl-x_L/Bcl-x_S y el incremento de la translocación de Bax desde el citosol a la mitocondria. Todos estos resultados

sugieren que, al menos en parte, la regulación que ejerce la quercetina en las células HepG2 sobre los miembros Bcl-2 es dependiente de la acción de caspasas. En relación a estos resultados, otros estudios han demostrado la activación de la vía mitocondrial por la quercetina en células de leucemia¹⁷¹, pulmón¹⁵⁹ y páncreas¹⁷⁰, así como el aumento de los niveles de Bax en hepatocitos fetales por la acción de otros flavonoides como luteolina⁸⁶.

En cuanto a las vías de proliferación/supervivencia, la quercetina es capaz de favorecer la apoptosis provocada por otros agentes mediante la regulación negativa de la AKT²¹⁹, dado que la inhibición de esta quinasa impide la fosforilación de las proteínas proapoptóticas Bcl-2 (Bad), que permanecen activas²²⁸. De acuerdo con estas observaciones, en este estudio, las concentraciones más bajas de quercetina que se ensayaron (10-25 $\mu\text{mol/L}$) incrementaron los niveles activos de AKT y este efecto no se tradujo en la activación de las proteínas proapoptóticas (Bcl-xs, Bax, caspasa-9, caspasa-3). Por el contrario, las altas concentraciones del flavonoide (75-100 $\mu\text{mol/L}$) incrementaron la mortalidad de las células HepG2, lo que se relacionó con una acusada inhibición de los niveles fosforilados de AKT. De manera destacable, la mayor activación de las proteínas proapoptóticas se observó con una concentración intermedia de quercetina (50 $\mu\text{mol/L}$) tras 18 horas de incubación, aunque los niveles activos de AKT no se modificaron. Sin embargo, el estudio de la modulación de esta proteína a lo largo del tiempo mostró que la quercetina (50 $\mu\text{mol/L}$) inducía una disminución rápida y transitoria de los niveles fosforilados de AKT (Figura 1.2), que parecía ser suficiente para inducir apoptosis en las células HepG2. En este sentido, estudios anteriores relacionan una disminución eventual de la AKT con la inducción de apoptosis, y consideran la recuperación tardía de sus niveles activos como un mecanismo de autodefensa²²⁹. De acuerdo con el descenso de los niveles fosforilados de AKT, la quercetina provocó una inhibición rápida y sostenida de la actividad PI3K sin modificar los niveles proteicos de sus subunidades (p85 y p110) (Figura 1.2). Esta observación está apoyada por estudios *in vitro* en los que se ha descrito que la quercetina y otros flavonoides parecían inhibir la actividad de la proteína PI3K, considerándose potenciales inhibidores naturales de la actividad de esta quinasa²³⁰.

Diversos estudios han descrito que la supervivencia de las células de hepatoma requiere, además de la activación de la vía PI3K/AKT, la activación de las ERKs⁸⁸. Estas observaciones están de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio, dado que la concentración más baja de quercetina que se ensayó (10 $\mu\text{mol/L}$) incrementó los niveles fosforilados de las ERKs tras 18 horas de incubación, coincidiendo con el incremento de los

niveles activos de la AKT y la ausencia de efecto apoptótico en las células HepG2. Por el contrario, las concentraciones altas del flavonoide (25-100 $\mu\text{mol/L}$) provocaron una disminución de los niveles de p-ERKs y un descenso en la viabilidad de las células HepG2. Además, se ha de destacar que la modulación que la quercetina ejerció sobre la vía de las ERKs no coincidió en el tiempo con la regulación de la vía PI3K/AKT (Figura 1.2), lo que sugiere que ambas vías son independientes y requeridas para la supervivencia de estas células²³¹, aunque otras señales relacionadas con el ciclo celular y la supervivencia pueden estar también implicadas¹⁰⁶.

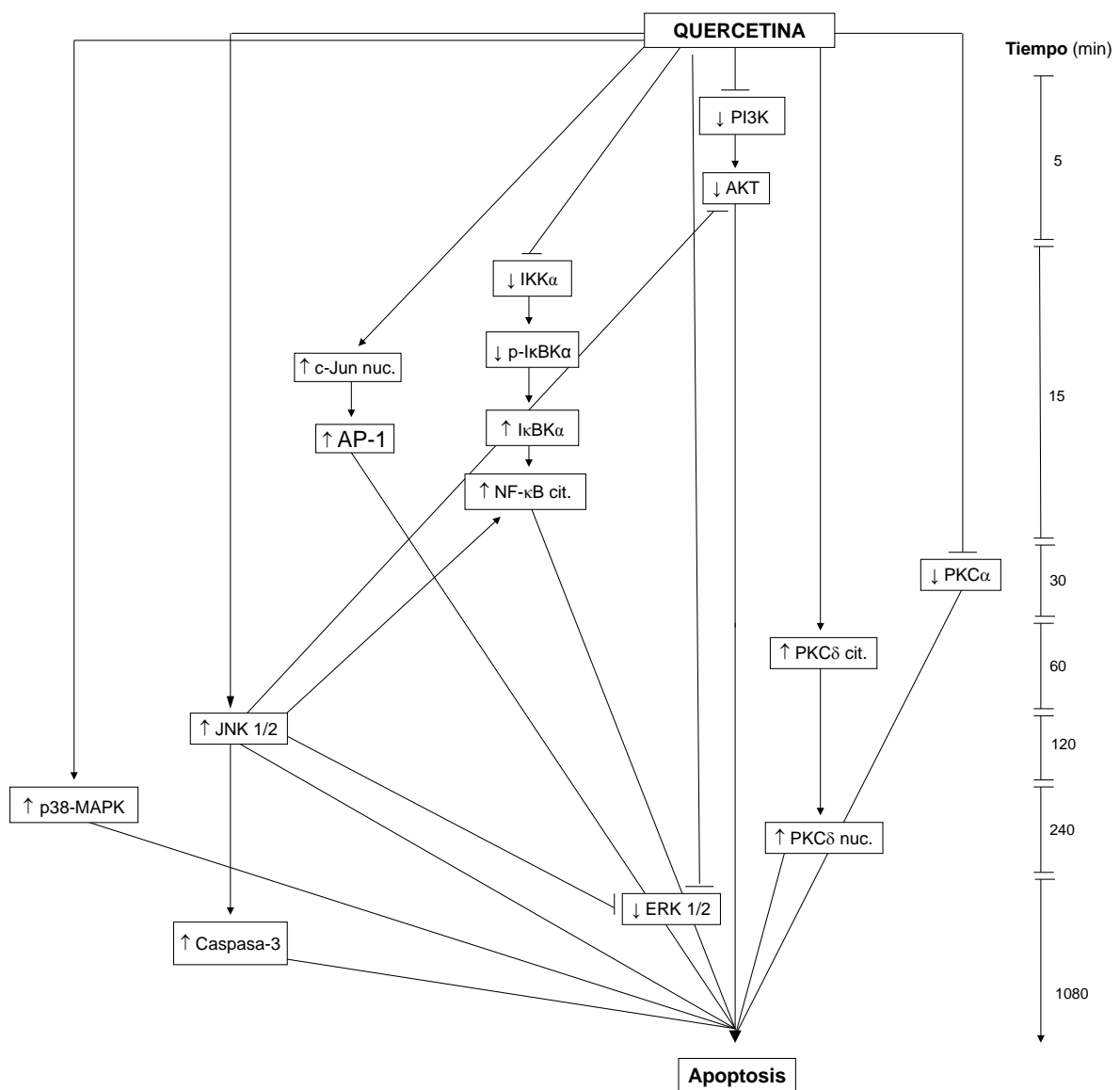


Figura 1.2. Esquema de la modulación a lo largo del tiempo de las dianas moleculares implicadas en la apoptosis inducida por quercetina 50 $\mu\text{mol/L}$ en las células HepG2 (\uparrow activación; \downarrow inhibición).

Recientemente se ha demostrado que las JNKs pueden suprimir la apoptosis por la fosforilación y, por tanto, por la inhibición de miembros pro-apoptóticos de la familia de genes *bcl-2* (Bim, Bax, Bak, Bad)⁸⁹. Además, se ha descrito que las ERKs y las JNKs ejercen funciones opuestas en la modulación de la supervivencia de los hepatocitos, de modo que la modulación entre ellas es esencial para prevenir una activación sostenida y letal de las JNKs⁸⁸. En concordancia con estos resultados, en nuestro estudio, la quercetina (50 $\mu\text{mol/L}$) indujo apoptosis y provocó la inhibición de las ERKs y la activación sostenida de las JNKs en las células HepG2 (Figura 1.2).

La inactivación de PKC α fue paralela al proceso apoptótico inducido por la quercetina en las células HepG2, y dado que AKT puede ser modulada por esta quinasa, los niveles disminuidos de PKC α (Figura 1.2), que se observaron durante el tratamiento con quercetina, pudieron contribuir a la inhibición de AKT⁹⁸. Además, la quercetina provocó la acumulación temprana de los niveles proteicos de PKC δ en el citosol, para a más largo plazo promover su translocación al núcleo (Figura 1.2), donde sufrió una proteólisis para liberar su dominio catalítico. En estudios anteriores, el aumento de la translocación de PKC δ hacia orgánulos celulares particulados, como el núcleo o la mitocondria, se ha relacionado con la inducción de apoptosis^{96, 98}. De manera similar, otros autores han descrito que la quercetina promueve la translocación de PKC δ desde el citosol al núcleo de manera dosis dependiente sin necesidad de incrementar sus niveles de expresión⁹⁸.

La falta de paralelismo entre la inhibición y la activación de las distintas quinasas implicadas en las rutas de proliferación/supervivencia a lo largo del tiempo (AKT y ERKs) sugiere que la quercetina (50 $\mu\text{mol/L}$) podría modular además otras señales claves relacionadas con el ciclo celular y/o la supervivencia, como los factores de transcripción NF- κ B y AP-1. La activación sostenida del NF- κ B en el hígado es característica del hepatocarcinoma celular¹²⁸, mientras que su inactivación *per se* puede actuar como una señal proapoptótica^{106, 107}, como ha podido observarse en células expuestas a quercetina y otros polifenoles durante largo tiempo¹⁷⁰. En las células HepG2, la quercetina (50 $\mu\text{mol/L}$) inhibió de manera rápida y sostenida la vía de señalización de este factor de transcripción (Figura 1.2). Se produjo un descenso rápido de los niveles proteicos de IKK α , lo que se tradujo en una disminución de los niveles fosforilados del inhibidor de NF- κ B (I κ B α) y la inhibición de su degradación, por lo que la translocación de NF- κ B al núcleo y su unión al DNA se vieron disminuidos. Estos resultados apoyan los de otros estudios en los que se muestra que la quercetina y otros

flavonoides, como el kaempferol, inhiben la vía de señalización del NF- κ B previamente estimulada con citoquinas²³², inhiben a la IKK y bloquean la degradación de I κ B^{185, 186}.

El sistema ubiquitin-proteosoma desempeña un papel crucial en la degradación específica de las proteínas, y entre sus funciones está la de favorecer la proliferación celular y proteger a las células tumorales de la muerte celular programada²³³. Entre las actividades asociadas a la función de este sistema se encuentran la actividad tripsina y la actividad quimiotripsina, que se relaciona con la supervivencia de las células tumorales¹⁸³. En este sentido, el incremento de los niveles totales de I κ B provocado por la quercetina (50 μ mol/L) en las células HepG2, podría deberse a la inhibición del sistema ubiquitin-proteosoma, dado que I κ B es una diana para el proteosoma. Sin embargo, sólo tras 18 horas de incubación se observó un incremento de la actividad tripsina y la inhibición de la actividad quimiotripsina, lo que se ha relacionado con la ocupación de los sitios de la actividad caspasa del proteosoma²³⁴. De manera análoga, en otras líneas celulares tratadas con quercetina^{183, 233}, polifenoles del té^{183, 233}, y taninos²³⁵, la inducción de apoptosis provocada por estos compuestos apunta hacia una posible contribución de la inhibición de la actividad quimiotripsina del proteosoma^{183, 233}.

La activación sostenida de AP-1 está relacionada con la inducción de la muerte de las células hepáticas por diferentes estímulos⁸⁸. Así, se ha descrito que algunos polifenoles llevan asociado la disminución de la viabilidad celular y el incremento de la actividad de este factor de transcripción²³⁶. Esta observación apoya nuestros resultados, ya que el incremento temprano y sostenido de la unión de AP-1 al DNA inducido por la quercetina (50 μ mol/L) en las células HepG2, fue paralelo a la disminución de la viabilidad celular debido a la inducción de la apoptosis (Figura 1.2). Por el contrario, otros autores han demostrado que algunos polifenoles son capaces de inhibir la activación de AP-1 provocada por diversos agentes^{236, 237}. Además, en nuestro estudio, se comprobó que el incremento de la unión de AP-1 al DNA inducido por la quercetina (50 μ mol/L) estuvo acompañado de un aumento de los niveles nucleares de c-Jun, que coincide con el incremento de los niveles fosforilados de las JNKs (Figura 1.2).

En estas condiciones experimentales (50 μ mol/L de quercetina), la inhibición de las JNKs con el inhibidor específico SP600125 provocó la disminución de la unión de AP-1 al DNA, lo cual indica una relación entre la modulación que la quercetina lleva a cabo sobre la vía de las JNKs y el AP-1. No obstante, tras 18 horas de tratamiento con la quercetina, la

inhibición de las JNKs no afectó a la actividad de unión de AP-1 al DNA. Este efecto ha sido descrito previamente para otros flavonoides, donde se observa que tras bloquear las JNKs o las ERKs, la unión de AP-1 al DNA se ve inhibida o bien no se modifica, lo que sugiere la implicación de otra vía de señalización en la modulación que ejercen estos flavonoides sobre AP-1¹⁰³. En este sentido, existen evidencias de que las ERKs modulan positivamente la activación de uno de los componentes más frecuentes de AP-1, c-Fos, cuya sobreexpresión en los hepatocitos incrementa su proliferación celular¹¹⁰. Así, la inhibición de las JNKs en las células HepG2 tratadas con la quercetina durante 18 horas, impidió la disminución de los niveles activos de las ERKs, coincidiendo con un incremento de la unión de AP-1 al DNA y de la viabilidad celular.

Las JNKs desempeñan una importante función en la inducción de la apoptosis que la quercetina (50 $\mu\text{mol/L}$) provoca en las células HepG2, no sólo por contribuir al incremento de los niveles nucleares de c-Jun y la inhibición de las ERKs, sino por su implicación en la activación de proteínas relacionadas con la muerte celular como la caspasa-3. De esta manera, la inhibición de las JNKs se tradujo en la disminución de los niveles activos de la caspasa-3 en las células HepG2 (18 horas). Además, existen evidencias de que la apoptosis puede ser suprimida por la inhibición de las JNKs debido a la disminución de los niveles de expresión de proteínas proapoptóticas de la familia de genes *bcl-2*⁹¹.

Por otro lado, se observó que la activación de p38-MAPK inducida por la quercetina en las células HepG2 es independiente de la regulación de las JNKs, ya que su inhibición no provocó la modificación de los niveles activos de p38-MAPK (4 y 18 horas). Este resultado apoya estudios previos en los que se ha demostrado la regulación independiente de estas dos MAPKs (JNKs y p38) en las células hepáticas²³⁸.

La apoptosis inducida por la quercetina (50 $\mu\text{mol/L}$) en las células HepG2 disminuyó los niveles activos de AKT; sin embargo, la inhibición de las JNKs anuló el efecto de la quercetina sobre esta quinasa a las 4 horas de tratamiento. Estos resultados sugieren una comunicación entre las JNKs y la AKT en las células HepG2, apoyando observaciones previas que indican la existencia de una conexión entre ambas vías de señalización para determinar el estado final de supervivencia o muerte en las células²³⁹. A su vez, se ha demostrado que un incremento de la actividad de la AKT también está relacionado con un aumento de la actividad del NF- κ B en diferentes tipos de cánceres¹⁰⁷.

La inhibición del NF- κ B se relaciona con la muerte celular y constituye un estímulo suficiente para inducir la apoptosis^{106, 107} que, en nuestro estudio, transcurre junto con la activación sostenida de las JNKs. Así pues, la inhibición de las JNKs previene el descenso de la actividad de unión de NF- κ B al DNA inducido por la quercetina (50 μ mol/L) en las células HepG2.

En resumen, se puede decir que la quercetina (50 μ mol/L) induce apoptosis en la línea celular HepG2, y que este efecto implica la activación de moléculas clave de la ruta apoptótica mitocondrial, así como la modulación a lo largo del tiempo de diferentes señales relacionadas con las vías de proliferación/supervivencia y con factores de transcripción sensibles al estado redox de la célula. Por tanto, aunque hay que prestar especial atención a la concentración, y a pesar de que se requieren numerosas investigaciones, la quercetina podría considerarse un potencial agente preventivo y/o terapéutico.

RESULTADOS

- II. Efecto protector de la epicatequina y el ácido clorogénico frente al estrés oxidativo en las células HepG2.***

Antecedentes.

1. Ácido Clorogénico.

1.1. Generalidades.

El ácido clorogénico (5-O-cafeoilquínico) es un ácido hidroxicinámico constituido por la combinación del ácido quínico y el ácido cafeico⁴ (Figura 2.1).

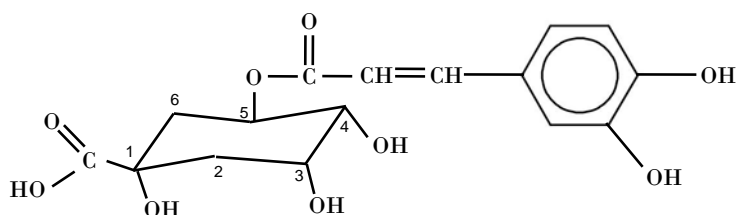


Figura 2.1. Estructura química del ácido clorogénico.

Este compuesto fenólico está presente en muchas frutas como la manzana, la pera o las bayas, en verduras como la alcachofa y la berenjena, y es particularmente abundante en los granos de café¹⁵.

La ingesta estimada de ácido clorogénico CGA es inferior a 100 mg/día, aunque en consumidores habituales de café se pueden alcanzar hasta 500-1000 mg/día¹⁵. Sin embargo, diversos estudios realizados en humanos^{31, 33}, animales de experimentación²⁹ y líneas celulares^{4, 15} han puesto de manifiesto la reducida absorción de este compuesto. Este hecho parece deberse a la ausencia de esterasas en muchos tejidos (mucosa intestinal, hígado) y fluidos biológicos (plasma, jugo gástrico y fluido duodenal), siendo la microflora colónica la que mayoritariamente lleva a cabo la hidrólisis de este compuesto^{4, 15}. No obstante, otros estudios han demostrado la presencia de ácido cafeico y bajas concentraciones de ácido clorogénico en plasma tras la ingesta de café^{4, 15, 31}. Además, Lafay y colaboradores²⁹ han demostrado que el ácido clorogénico puede ser absorbido tanto en el estómago como en el intestino delgado de la rata, y algunos estudios han cifrado la absorción de este ácido fenólico en un 30-33% de la ingesta total en individuos sanos{{402 Manach,C. 2004; 1591 Clifford, M.N. 2000}}.

En cuanto al metabolismo del ácido clorogénico, una vez que este compuesto es hidrolizado, sus componentes están sujetos a procesos de metilación, sulfatación y glucuronidación^{4, 15, 31, 33}, de manera similar a los flavonoides.

El ácido clorogénico es un compuesto fenólico de gran relevancia por sus numerosas propiedades biológicas como agente antioxidante^{152, 240}, antiinflamatorio²⁴¹, hipotensor²⁴¹, anticancerígeno¹⁷⁵ y antidiabético²⁴². En cuanto a su actividad antioxidante, diversos estudios *in vitro* han puesto de manifiesto que el ácido clorogénico, en concentraciones fisiológicas, es capaz de inhibir la peroxidación lipídica de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en mayor medida que otros compuestos fenólicos como el ácido gálico²⁴¹. Su actividad antioxidante también se ha relacionado con la protección frente al daño oxidativo del DNA y la supresión del daño a membranas inducido por metales de transición o agentes pro-oxidantes^{17, 240, 243}. Además, en otros estudios realizados en cultivos celulares, la actividad antioxidante del ácido clorogénico se ha relacionado con un efecto quimioprotector, dado que estabiliza las membranas²⁴⁰, protege a las células neuronales de la inducción de apoptosis²⁴⁴ y promueve la proliferación celular en neuronas del hipocampo²⁴⁵. No obstante, también se ha descrito que el ácido clorogénico puede inhibir el sistema de detoxificación celular, ya que puede actuar como un potente inhibidor de la GST²⁴⁶.

Los efectos anticarcinogénicos del ácido clorogénico se han relacionado con su papel como pro-oxidante, ya que es capaz de inhibir la proliferación de las células de cáncer de pulmón (A549) y la transformación neoplásica de las células epidermales JB6¹⁵². Además, este efecto anticancerígeno también se ha asociado con la inducción de la muerte celular y la inhibición de la invasión tumoral de las células de hepatoma²⁴⁷, la inducción de daño oxidativo al DNA²⁴³ y parada del ciclo celular¹⁷⁵. En animales de experimentación, el ácido clorogénico puede disminuir la incidencia de carcinogénesis química en varios modelos animales de cáncer¹³⁹⁻¹⁴¹. Estos trabajos están apoyados por numerosos estudios epidemiológicos en los que se ha demostrado que existe una relación inversa entre el consumo de alimentos ricos en ácido clorogénico (café) y el riesgo de padecer diversos tipos de cáncer, como el cáncer de hígado²⁴⁸, colon²⁴⁹, endometrio²⁵⁰, esofágico y de la cavidad oral²⁵¹.

A pesar de las evidencias sobre las propiedades antioxidante y anticarcinogénica del ácido clorogénico, existe un gran desconocimiento acerca de su mecanismo de acción molecular.

1.2. Efecto del ácido clorogénico sobre la modulación de la apoptosis.

Diversos estudios han descrito que el ácido clorogénico puede ejercer un efecto protector frente a la inducción de apoptosis y disminuir la liberación de LDH y la generación de ROS^{244, 252}. Además, el ácido clorogénico inhibe la inducción de la apoptosis en las células neuronales (Neuro 2A) mediante la inhibición de la caspasa-3, la disminución de los niveles de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Bax), el incremento de miembros anti-apoptóticos (Bcl-2) y la restauración del potencial de la membrana mitocondrial alterado por agentes químicos como el metilglioxal²⁴⁴. Por su parte, en células neuronales, el ácido clorogénico, además de impedir la activación de la caspasa-3 e incrementar los niveles proteicos de Bcl-x_L, inhibe la acción de PARP²⁵². De manera adicional, este ácido fenólico en altas concentraciones disminuye la progresión tumoral de las células de hepatoma, induce la muerte celular a través de la activación de la caspasa-3²⁴⁷ e inhibe de manera dosis-dependiente proteínas relacionadas con la invasión celular (MMP-9)²⁵³.

1.3. Efecto del ácido clorogénico sobre la modulación de las vías de proliferación/supervivencia.

El ácido clorogénico, a altas concentraciones (10-40 $\mu\text{mol/L}$), previene la transformación neoplásica inducida por la radiación UV o TPA en las células epidermales JB6 mediante la activación de PI3K y la disminución de los niveles fosforilados de JNKs, p38-MAPK, MAPKK 4, y ERKs¹⁵². Asimismo, este compuesto bloquea la muerte celular programada inducida por H₂O₂ en las células neuronales PC12 mediante la inhibición de JNKs y p38-MAPKs²⁵², además de las ERKs en la línea celular Neuro-2A ²⁴⁴. El CGA inhibe el efecto del TPA en las células de epidermis de ratón mediante el bloqueo de la disminución de los niveles citosólicos de PKC α ²⁵⁴.

1.4. Efecto del ácido clorogénico sobre la regulación de factores de transcripción (NF- κ B, AP-1 y Nrf2).

El efecto anticarcinogénico del ácido clorogénico sobre la transformación neoplásica de células epidermales JB6 tratadas con UV o TPA implica una inhibición dosis-dependiente de la activación de NF- κ B y AP-1¹⁵². Además, el CGA activa de manera dosis-dependiente al Nrf2 y enzimas detoxificantes de fase II (GST y NQO1)¹⁵².

2. Epicatequina.

2.1. Generalidades.

La epicatequina (Figura 2.2) es uno de los flavonoides más comunes en los alimentos de la dieta y se encuentra en muchas frutas como la manzana, la pera, y la uva negra, aunque es particularmente abundante en el té verde y en la semilla del cacao⁴. De hecho, en esta última, la epicatequina puede constituir aproximadamente el 35% del total de los polifenoles²⁵⁵.

La ingesta de este flavonoide se ha estimado que oscila entre menos de 3 y más de 9 mg/día¹³⁵.

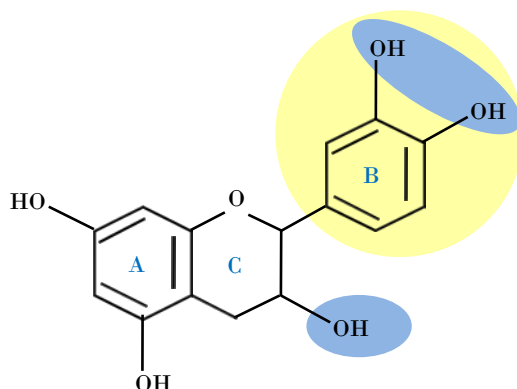


Figura 2.2. Estructura química de la epicatequina.

La epicatequina, a diferencia de otros flavonoides, no se encuentra en forma de glucósidos en los alimentos, por lo que es más biodisponible que la mayoría de los

flavonoides de la dieta^{4, 197}. Tras su absorción, la epicatequina es metabolizada, primero en el intestino delgado y después en el hígado, con lo que se generan derivados glucuronidados, metilados y sulfatados^{4, 36, 39, 197}. Las moléculas de epicatequina que no son absorbidas en el intestino delgado alcanzan el colon, donde las enzimas de la microflora las transforman en ácidos fenólicos y valerolactanos, que a su vez pueden ser absorbidos y alcanzar el hígado^{4, 197}.

La epicatequina, al igual que muchos compuestos fenólicos, es un flavonoide cuyo interés biológico se relaciona con su actividad antioxidante, antiinflamatoria y anticarcinogénica²⁵⁶⁻²⁵⁹. Aunque la literatura sobre los efectos biológicos de la epicatequina pura es bastante limitada, diversos estudios llevados a cabo con extractos de alimentos ricos en catequinas, como el té verde o el cacao, le atribuyen varias propiedades biológicas.

La actividad antioxidante de la epicatequina se ha asociado con un efecto protector en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y²⁵⁵. De manera similar, en las células hepáticas, se ha observado que este flavanol disminuye la citotoxicidad inducida por el glioxal mediante la inhibición de la carbonilación de proteínas²⁵⁶. Además, el efecto anticarcinogénico de la epicatequina se ha relacionado también con su actividad antioxidante en las células HepG2²⁶⁰. En los animales de experimentación, los extractos totales de catequinas, que contienen epicatequina, parecen tener un efecto protector frente al desarrollo del cáncer hepático, de pulmón o de mama, así como frente al desarrollo de enfermedades cardiovasculares al ralentizar el desarrollo de las placas de ateroma²⁵⁷.

En los estudios de intervención en humanos, se ha demostrado que la epicatequina ejerce un efecto antiinflamatorio relacionado con su actividad antioxidante, ya que disminuye la peroxidación de los lípidos de la membrana²⁶¹. Sin embargo, en la actualidad, la actividad anticancerígena de la epicatequina en este tipo de ensayos sólo puede sugerirse, ya que la mayoría de los trabajos se han llevado a cabo con extractos de alimentos ricos en este flavonoide (extractos de cacao, té verde) y proponen la implicación de sus componentes en los efectos beneficiosos para la salud, como en la prevención del cáncer²⁵⁷.

Dada la escasez de estudios sobre los efectos biológicos de la epicatequina pura, en la actualidad, las investigaciones sobre su mecanismo de acción molecular también son bastante limitadas y, por tanto, de gran interés.

2.2. Efecto de la epicatequina sobre la modulación de la apoptosis.

Aunque algunos autores han calificado a la epicatequina como un compuesto inactivo en términos de inducción de apoptosis²⁶², este flavonoide tiene una gran relevancia por su papel protector frente al estrés oxidativo y la muerte celular programada.

La epicatequina ejerce un efecto protector en las células de neuroblastoma asociado a la disminución de la generación de ROS²⁵⁵. De manera análoga, se ha observado que este flavonoide también inhibe la apoptosis inducida por el estrés oxidativo en los fibroblastos humanos FEK4 a través de la inhibición de la caspasa-3²⁶³.

En cuanto a la modulación de los miembros de la familia de genes *bcl-2*, hasta la fecha no se ha estudiado el efecto de la epicatequina sobre la modulación de estas proteínas. Sin embargo, se ha descrito que la procianidina B4, que es un oligómero de este flavonoide, inhibe la apoptosis inducida por doxorubicina en los cardiomiocitos mediante la regulación de la expresión de proteínas pro-apoptóticas (*Bax α*) y anti-apoptóticas (*Bcl-2*)²⁵⁸. Además, la epicatequina no induce la fragmentación del DNA en las células humanas de carcinoma de colon (LoVo)²⁶⁴ y Delgado y colaboradores²⁶⁰ han demostrado que este flavonoide inhibe la fragmentación y el daño oxidativo al DNA inducido por benzopireno o nitrosaminas en la línea celular de hepatoma humano HepG2.

En relación con el ciclo celular, se ha descrito que las altas concentraciones (2-5 mmol/L) de epicatequina paran el ciclo celular de las células de cáncer de colon (LoVo) en fase S, aunque no inducen apoptosis²⁶⁴.

2.3. Efecto de la epicatequina sobre la regulación de las vías de proliferación/supervivencia.

Diversos estudios han descrito que la epicatequina (50-500 $\mu\text{mol/L}$) promueve la proliferación celular²⁶⁴ e inhibe el daño citotóxico inducido por peroxinitrito sin alterar la activación que este agente induce sobre AKT y MAPKs en las células endoteliales primarias de ratón (MAEC)²⁶⁵. Por el contrario, en las neuronas corticales primarias de ratón, este flavonoide promueve la viabilidad celular a través del incremento de los niveles fosforilados de AKT y ERKs²⁶⁶, mientras que en las células de neuroblastoma desempeña un papel protector frente al estrés oxidativo, al disminuir los niveles fosforilados de las ERKs y las JNKs²⁵⁵. Además, Won y colaboradores²⁶⁷ han demostrado que la epicatequina, al igual que el resto de las catequinas del té verde inhiben la proliferación de las células vasculares de músculo liso (VSMC) a través de la modulación de la vía de las MAPKs.

La modulación de las distintas isoformas de la PKC por la epicatequina aún no ha sido estudiada. Por su parte, EGCG ejerce un efecto neuroprotector frente al estrés oxidativo en las células PC12 que se asocia a la translocación de PKC α a la membrana plasmática¹⁸⁰.

2.4. Efecto de la epicatequina sobre la regulación de factores de transcripción (NF- κ B, AP-1 y Nrf2).

Epicatequina inhibe la activación del NF- κ B inducida por PMA en las células Jurkat-T mediante la disminución de la fosforilación de IKK β y la posterior degradación de I κ B α ¹⁸⁸. Sin embargo, en las células de linfoma de Hodgkin (L-428 y KM-H2), el efecto de la epicatequina sobre la unión de este factor de transcripción al DNA no se asocia con su actividad antioxidante, cambios en la fosforilación de NF- κ B(p65) o con su translocación al núcleo, lo que sugiere la implicación de otras vías de señalización²⁶⁸.

En cuanto al factor de transcripción AP-1, los estudios acerca del potencial papel de la epicatequina sobre su modulación son limitados e indican que este flavonoide no modifica la actividad de AP-1 ni siquiera en presencia de estimuladores de la vía^{236, 269}. En este sentido, parece que sólo las altas concentraciones de epicatequina (100 $\mu\text{mol/L}$)

inhiben la actividad de AP-1, a la vez que provocan una leve disminución de la viabilidad en las células transformadas 30.7b Ras 12²⁶⁹. Sin embargo, otros estudios llevados a cabo con otras catequinas han mostrado que la actividad anticancerígena de estos flavanoles está relacionada con la inhibición de AP-1. Así, en la línea celular epidérmica JB6, se ha descrito que EGCG inhibe la transformación celular inducida por TPA o el factor de crecimiento epidérmico (EGF) mediante la inhibición de la actividad de AP-1²⁷⁰. Además, en diversas líneas celulares de cáncer de colon (Caco2, HCT116, HT29, SW480 y SW837), EGCG impide el crecimiento de estas células mediante la inhibición de la actividad de AP-1, que resultan en un efecto sinérgico tras la adición de epicatequina²⁷¹.

El factor de transcripción Nrf2 se ha asociado recientemente con el efecto protector de la epicatequina en los astrocitos corticales, ya que este flavonoide induce su translocación al núcleo²⁷².

El conjunto de estas evidencias pone de manifiesto que el ácido clorogénico y la epicatequina pueden desempeñar un importante papel como agentes naturales protectores frente al estrés oxidativo. Sin embargo, los estudios acerca del efecto directo de cada uno de estos compuestos, así como sobre su mecanismo de acción molecular son bastante limitados, por lo que resulta de especial interés analizar ambos aspectos. En este estudio, por tanto, se plantea la evaluación del efecto de estos compuestos fenólicos sobre el estado redox de la línea celular HepG2, así como sobre la potencial modulación de las señales clave en el proceso apoptótico y vías de supervivencia/proliferación, y la regulación de factores de transcripción relacionados con el estrés oxidativo.

- Artículo 1.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17286412> **111**
Granado-Serrano A.B., Martín M.A., Izquierdo-Pulido M., Goya L., Bravo L. and Ramos S. Molecular mechanisms of (-)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55(5):2020-2027.
- Artículo 2.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18495458> **119**
Granado-Serrano A.B., Martín M.A., Goya L., Bravo L. and Ramos S. Time-course regulation of survival pathways by epicatechin on HepG2. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2009, 20(2):115-24.
- Artículo 3.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20030899> **129**
Granado-Serrano A.B., Martín M.A., Haegeman G., Goya L. Bravo L. and Ramos S. Epicatechin induces NF- κ B, AP-1 and Nrf2 via PI3K/AKT and ERK signalling in HepG2 cells. *British Journal of Nutritio* 2010, 103(2):168-79.

Discusión.

El ácido clorogénico y la epicatequina son dos compuestos fenólicos que presentan actividad antioxidante *in vitro* como captadores de radicales libres, modulan el estado redox de la célula^{240, 259} y poseen un papel quimiopreventivo frente a distintos tipos de cáncer^{262, 264}. Sin embargo, la mayoría de los trabajos realizados con ambos compuestos fenólicos se han enfocado hacia el estudio de su potencial efecto protector frente a la acción de diversos agentes pro-oxidantes^{240, 259, 261}, y son muy pocas las investigaciones que analizan el efecto directo de cada uno de estos compuestos puros y su mecanismo de acción molecular.

En el presente estudio, se analiza el efecto del ácido clorogénico y la epicatequina sobre las células HepG2. Los resultados obtenidos muestran que ninguno de estos compuestos resulta citotóxico, pero difieren en sus efectos sobre la viabilidad, la proliferación y el estado redox de las células, así como en la modulación de las moléculas clave en los procesos de muerte y/o supervivencia.

1. Ácido Clorogénico

El ácido clorogénico puro (1-100 $\mu\text{mol/L}$) disminuye la proliferación de las células HepG2, aunque sólo las dosis más elevadas (50-100 $\mu\text{mol/L}$) reducen ligeramente la viabilidad. De acuerdo con estos resultados, estudios recientes han demostrado que el ácido clorogénico (20 $\mu\text{mol/L}$) ejerce un efecto protector frente a la toxicidad inducida por el metilglioxal en las células neuronales²⁴⁴. Por el contrario, en células de cáncer hepático y en las células de cáncer de pulmón (A549), el ácido clorogénico induce daño celular e inhibe la proliferación celular^{152, 247}.

En nuestro estudio, el ácido clorogénico modula el estado redox de las células HepG2 mediante el incremento de los niveles de GSH y causa la disminución de manera dosis-dependiente de los niveles intracelulares de ROS tras 18 horas de incubación. En concordancia con estos resultados, otros estudios han descrito que el ácido clorogénico protege a las células neuronales PC12 del daño oxidativo inducido por H_2O_2 mediante la disminución de los niveles de ROS²⁵². De manera similar, este ácido fenólico protege a las células epidermales de ratón JB6 de la transformación neoplásica inducida por el TPA

mediante la disminución de los niveles de ROS y un aumento de las enzimas detoxificantes de fase II (GST, NQO1)¹⁵². Además, el ácido clorogénico previene el agotamiento de las reservas de GSH y la generación de ROS inducidos por diversos pro-oxidantes^{240, 243}.

La modulación del estado redox (incremento de GSH) y la ausencia de citotoxicidad por parte del ácido clorogénico sobre las células HepG2 apoyan la idea de la incapacidad de este compuesto para inducir apoptosis, dado que tras 18 horas de incubación ninguna de las concentraciones de ácido clorogénico ensayadas incrementaron la actividad de la caspasa-3 o alteraron el balance de los miembros pro-(Bax) y anti-apoptóticos (Bcl-x_L) de la familia de genes *bcl-2*. En este sentido, varios estudios atribuyen al ácido clorogénico un efecto protector frente a la muerte celular programada, que se ha asociado a la disminución de los niveles de caspasa-3 activa y a la modulación de las proteínas de la familia Bcl-2 en las células neuronales²⁴⁴. No obstante, se ha descrito que las altas concentraciones de ácido clorogénico (mmol/L) pueden tener un efecto pro-oxidante y promover la apoptosis en las células HepG2 mediante la inducción de estrés oxidativo y el incremento de la actividad caspasa-3²⁴⁷, además de inducir la parada del ciclo celular en los preadipocitos de ratón¹⁷⁵.

En el presente estudio y tras 18 horas de tratamiento, ninguna de las concentraciones ensayadas (1-100 µmol/L) de ácido clorogénico promueve el incremento de los niveles activos de la AKT ni modifica los niveles de las subunidades reguladora (p85) y catalítica (p110) de PI3K en las células HepG2. En este sentido, algunos estudios realizados *in vitro* han sugerido que el ácido clorogénico actúa exclusivamente sobre la multiquinasa inositol-polifosfato (PIMK), pero no sobre la PI3K²⁷³. Por el contrario, Feng y colaboradores¹⁵² han demostrado que la prevención de la invasividad tumoral que ejerce este ácido fenólico en las células epidermales JB6 requiere la actividad sostenida de la PI3K.

Las células HepG2 requieren la activación sostenida de las ERKs para su supervivencia²³¹. Sin embargo, al igual que ocurrió con la vía PI3K/AKT, el ácido clorogénico no modificó los niveles activos de las ERKs con ninguna de las concentraciones ensayadas después de 18 horas de incubación. De acuerdo con estos resultados, el efecto protector que el ácido clorogénico ejerce en las células JB6 no

implica la modulación de los niveles activos de las ERKs, y sólo las concentraciones elevadas de este ácido fenólico (160 $\mu\text{mol/L}$) disminuyen los niveles activos de estas MAPKs y producen un daño celular¹⁵². Además, Huang y colaboradores²⁴⁴ han demostrado que el ácido clorogénico protege a las células neuronales de la inducción de la apoptosis mediante la disminución de los niveles activos de las ERKs.

2. Epicatequina

La epicatequina, al igual que el ácido clorogénico, no mostró ningún efecto citotóxico sobre la línea celular HepG2 después de 18 horas de incubación; de hecho, las concentraciones más altas de este flavonoide ensayadas (50-100 $\mu\text{mol/L}$) promovieron la proliferación celular. En relación con estos resultados, los escasos estudios existentes sobre la epicatequina discrepan respecto al efecto que este flavanol tiene sobre las células. Así, recientemente se ha descrito que la epicatequina promueve la viabilidad celular en las neuronas corticales primarias de ratón²⁶⁶, mientras que inhibe la proliferación de las células vasculares de músculo liso²⁶⁷.

El estudio de la potencial modulación del estado redox de las células HepG2 por la EC demostró que las concentraciones más altas de este flavonoide (25-100 $\mu\text{mol/L}$) disminuyeron la generación de ROS. De acuerdo con estas observaciones, la epicatequina previene la formación de radicales hidroxilo en presencia de metales^{259, 261}, y disminuye la formación de ROS en las células de neuroblastoma²⁵⁵. Estos efectos beneficiosos de la epicatequina reflejan su habilidad para modular las defensas celulares antioxidantes^{262, 272}, aunque puede no implicar un aumento de los niveles de GSH o la inducción de la GST²⁷⁴.

De acuerdo con la disminución dosis-dependiente de la generación de ROS inducida por la epicatequina en las células HepG2 (18 horas), ninguna de las concentraciones ensayadas del flavonoide (1-100 $\mu\text{mol/L}$) modificó el estado o los niveles de las moléculas clave en la señalización de apoptosis [actividad de la caspasa-3 y niveles de proteínas pro- (Bax) y anti-apotóticas (Bcl-x_L)]. Estos resultados apoyan estudios previos que consideran a la epicatequina como un compuesto inactivo para inducir la muerte celular programada respecto al resto de las catequinas²⁶². Dichas observaciones también corroboran el papel protector de este flavanol frente a la inducción de apoptosis

en los fibroblastos humanos, donde es capaz de disminuir los niveles de caspasa-3 activa²⁶³. De manera análoga, se ha descrito que los extractos de té verde y otros flavanoles, como EGCG, no modifican los niveles proteicos de los miembros de la familia de genes *bcl-2* (*Bcl-2*, *Bcl-xL* y *Bad*) en las células de cáncer de próstata DU145, aunque a diferencia de la EC, a través de mecanismos que aún no están claros, inducen apoptosis en estas células²⁶².

El estudio de la ruta de señalización PI3K/AKT mostró, que después de 18 horas de incubación, todas las concentraciones de epicatequina (1-100 $\mu\text{mol/L}$) modularon positivamente la PI3K en las células HepG2, ya que incrementaron los niveles proteicos de p110, la subunidad catalítica, si bien no modificaron los niveles proteicos de su subunidad reguladora (p85). El aumento en los niveles de la subunidad p110 podría conducir a la activación de la PI3K y la AKT, al incremento de la proliferación/supervivencia celular y a la protección frente a la apoptosis. En este sentido, otros autores han demostrado que la epicatequina y otras catequinas aumentan la actividad de PI3K²⁷⁵, aunque dicho incremento en los niveles de p110 no siempre está relacionado con un aumento de la actividad PI3K.

El efecto de supervivencia que la epicatequina manifestó en las células HepG2 tras 18 horas de incubación supuso además, la activación de las ERKs, excepto con la concentración más alta ensayada (100 $\mu\text{mol/L}$), observándose la mayor activación de estas quinasas con la concentración de 10 $\mu\text{mol/L}$ de este flavanol.

Todos estos resultados sugieren que la epicatequina no tiene un efecto citotóxico sobre las células HepG2, sino que promueve su supervivencia y proliferación mediante la regulación del estado redox y la modulación de las vías de proliferación/supervivencia (PI3K/AKT y ERKs). Este efecto depende de la concentración del flavonoide, siendo la concentración 10 $\mu\text{mol/L}$ la que muestra una mayor activación de estas rutas. De hecho, el pretratamiento durante 4 ó 18 horas con epicatequina (10 $\mu\text{mol/L}$) probó que este flavonoide protege a las células HepG2 del daño oxidativo provocado por el agente prooxidante *t*-BOOH (200 $\mu\text{mol/L}$). De acuerdo con estos hallazgos, estudios previos han demostrado que este flavonoide tiene un efecto similar sobre las células de cáncer de hígado²⁶⁰, próstata²⁶², colon^{236, 264} y cavidad oral¹⁶³.

La modulación de una ruta de señalización puede implicar posibles variaciones a lo largo del tiempo. Así, en ciertas ocasiones, la regulación temprana y transitoria (activación o inhibición) de diferentes proteínas puede ser suficiente para provocar un efecto determinado en la célula, de manera que los tratamientos a largo plazo no siempre resultan adecuados para evaluar la potencial regulación de estas rutas por los polifenoles²²⁹. Por tanto, en el presente estudio, se eligió la concentración de epicatequina 10 $\mu\text{mol/L}$, puesto que fue la concentración más baja que mostró una clara estimulación de AKT y ERKs en las células HepG2, y se analizó la modulación del estado redox de la célula y de las vías de proliferación/supervivencia a lo largo del tiempo.

El estudio de la modulación del estado redox celular a lo largo del tiempo mostró que la epicatequina disminuye de manera temprana y transitoria la generación de ROS. De manera similar, la epicatequina parece tener una actividad citoprotectora frente al daño inducido por el H_2O_2 en neuronas²⁵⁵. Además, se ha observado que previene la muerte celular y la formación de radicales libres en presencia de metales^{255, 259, 261}.

El estudio de la modulación a lo largo del tiempo de la vía de señalización PI3K/AKT mostró que la epicatequina (10 $\mu\text{mol/L}$) induce un incremento rápido y sostenido de los niveles activos de la AKT (Figura 2.3). En contraste con este marcado efecto, la epicatequina (10 $\mu\text{mol/L}$) no altera los niveles de la subunidad reguladora (p85) de la PI3K a lo largo del tiempo, y respecto a la subunidad catalítica (p110) incrementa sus niveles sólo tras 18 horas de incubación. En este sentido, se ha de mencionar que otros flavonoides, como la quercetina, pueden modificar la actividad PI3K sin que se alteren los niveles proteicos de sus subunidades²³⁰. De hecho, el bloqueo selectivo de la actividad PI3K mediante el uso de inhibidores farmacológicos (LY294002 y Wortmanina) previene el incremento de los niveles fosforilados de AKT inducido por la epicatequina (10 $\mu\text{mol/L}$) y disminuye la viabilidad de las células HepG2 tras 18 horas de incubación. Todos estos resultados sugieren que la supervivencia de estas células requiere la activación sostenida de la vía de señalización PI3K/AKT.

De manera similar a la regulación que lleva a cabo sobre la vía PI3K/AKT, la epicatequina (10 $\mu\text{mol/L}$) incrementa de manera rápida y sostenida los niveles activos de las ERKs (Figura 2.3). Estos resultados apoyan las evidencias mostradas por Schroeter

RESULTADOS II: Discusión

y colaboradores²⁶⁶ en relación con la promoción de la viabilidad celular que induce este flavonoide en las neuronas corticales primarias, y que se produce a través del incremento de los niveles activos de la AKT y las ERKs. Sin embargo, en el presente estudio se muestra que el bloqueo selectivo de las ERKs (PD98059) no afecta a la viabilidad de las células HepG2 tratadas con la epicatequina (10 $\mu\text{mol/L}$) durante 18 horas. Todo ello sugiere que la activación de la vía PI3K/AKT puede ser un estímulo suficiente para mantener la supervivencia de estas células, y que la activación de la vía PI3K/AKT y de las ERKs podría ser independiente, aunque ambas son requeridas para la proliferación/supervivencia inducida por la epicatequina en las células HepG2. Además, no se puede descartar la implicación de otras señales relacionadas con la supervivencia y el ciclo celular, como NF- κB ¹⁰⁶.

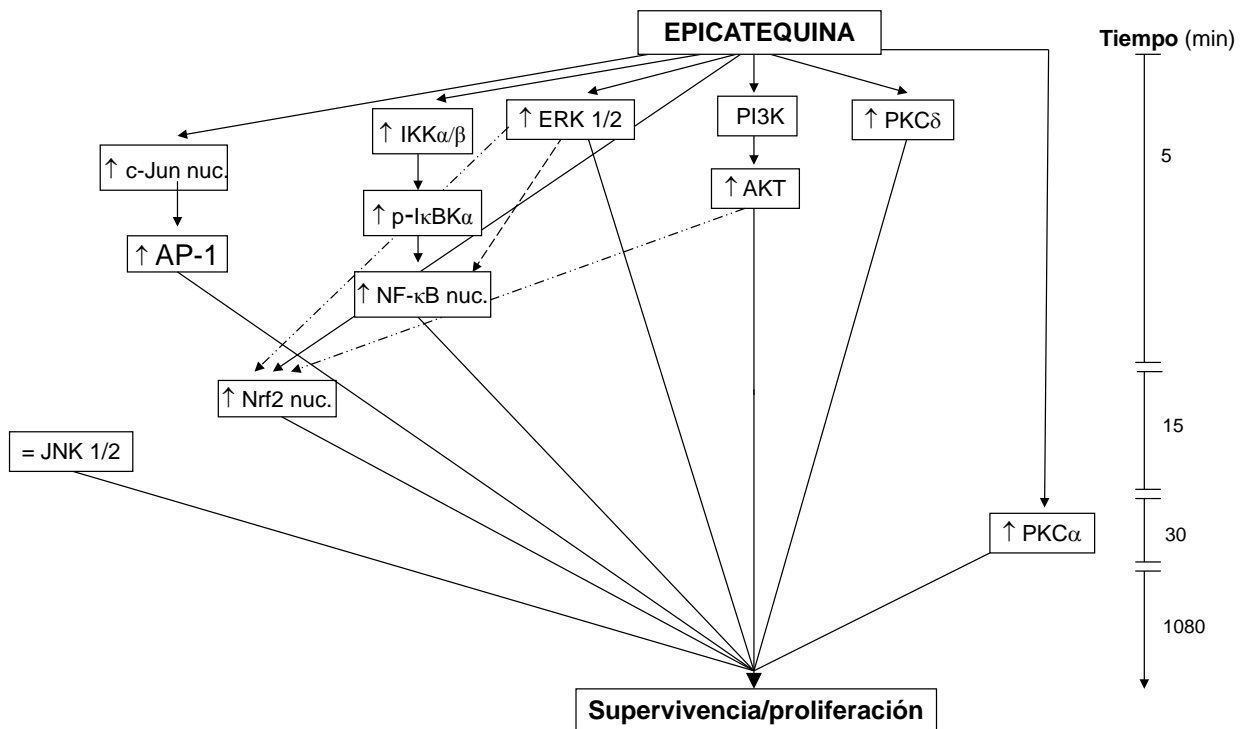


Figura 2.3. Esquema de la modulación en el tiempo de las dianas moleculares implicadas en la supervivencia inducida por epicatequina 10 $\mu\text{mol/L}$ en las células HepG2 (\uparrow incremento; \downarrow disminución; = sin cambios).

Como se ha comentado anteriormente, en las células hepáticas las JNKs y las ERKs se regulan de manera opuesta, y es necesaria la activación de las ERKs para prevenir una activación sostenida y letal de las JNKs⁸⁸. En este sentido, la estimulación

de la supervivencia que la epicatequina (10 $\mu\text{mol/L}$) promueve en las células HepG2 mediante la regulación de la vía PI3K/AKT y las ERKs en el tiempo, no va acompañada de un cambio en los niveles activos de las JNKs (Figura 2.3).

En concordancia con esos resultados, Jeong y colaboradores²³⁶ han descrito que tras un corto tiempo de incubación (60 min) con altas concentraciones de epicatequina (100 $\mu\text{mol/L}$), al igual que con otros polifenoles como algunas procianidinas (B1 y B2), los niveles fosforilados de las JNKs y la viabilidad celular no se ven modificados en las células de cáncer de colon HT-29. Sin embargo, en las células de neuroblastoma, la epicatequina mejora el estado redox frente a un posible daño oxidativo a través de la disminución de los niveles activos de las ERKs y de las JNKs²⁵⁵, mientras que la inhibición de la proliferación celular provocada por otras catequinas como EGCG, lleva asociada la disminución de la fosforilación de las MAPKs²⁶⁷.

La generación de ROS es un suceso crítico para la activación de las JNKs⁸⁸, mientras que la regulación de las ERKs parece ser independiente de los niveles intracelulares de los ROS⁸³. De acuerdo con estas consideraciones, la disminución rápida y transitoria de los niveles de ROS que provoca la epicatequina (10 $\mu\text{mol/L}$) en las células HepG2, se podría asociar con la ausencia de modificación de los niveles fosforilados de JNKs. Además, las JNKs también están reguladas por la acción de miembros proapoptóticos de la familia de genes *bcl-2*, como Bim, Bax, Bak and Bad^{86, 88}. De acuerdo con ésto, la ausencia de efecto de la epicatequina sobre los niveles proteicos de Bax en las células HepG2 tras 18 horas de incubación, apoya el hecho de que los niveles fosforilados de JNKs no se vean modificados por este flavonoide (10 $\mu\text{mol/L}$).

En el presente estudio la epicatequina (10 $\mu\text{mol/L}$) induce un incremento rápido y sostenido de los niveles totales de PKC α en las células HepG2 (Figura 2.3), lo que se relaciona con el efecto beneficioso sobre la supervivencia de la epicatequina en estas células. Además, se ha descrito que la PKC α previene la apoptosis mediante la fosforilación de Bcl-2 y las quinasas implicadas en las vías de supervivencia, como la AKT⁹⁸. Así pues, se podría sugerir que el incremento de los niveles fosforilados de AKT, que induce la epicatequina (10 $\mu\text{mol/L}$) en las células HepG2, se debe en parte a la acción de PKC α . No obstante, la diferencia temporal entre la activación de ambas quinasas

sugiere que la epicatequina (10 $\mu\text{mol/L}$) regula la activación de AKT y PKC α mediante vías de señalización aparentemente independientes.

La epicatequina (10 $\mu\text{mol/L}$) provoca el incremento de los niveles citosólicos de la PKC δ en las células HepG2 de una manera rápida y sostenida en el tiempo (Figura 2.3). Este aspecto, unido al hecho de que la epicatequina no induce la apoptosis en estas células, está de acuerdo con los estudios que han descrito que la inhibición de la muerte celular programada implica la rápida retranslocación de PKC δ desde el núcleo^{98, 99}. Además, otros trabajos han descrito que la PKC δ puede interferir en la supervivencia celular mediante su interacción con las proteínas de la familia Bcl-2 y la regulación de MAPKs^{98, 99}, de manera que un incremento endógeno de PKC δ puede promover apoptosis mediante la activación de las JNKs y una estimulación transitoria de las ERKs⁹⁹.

La activación del factor de transcripción AP-1 modula la proliferación y el ciclo celular, aunque su activación sostenida en las células con un daño en el DNA puede provocar apoptosis¹⁰⁹. En el presente estudio, el efecto sobre la supervivencia de la epicatequina (10 $\mu\text{mol/L}$) en las células HepG2 se relaciona con la activación rápida y sostenida de AP-1 (Figura 2.3). Sin embargo, y a diferencia de los resultados obtenidos, otros estudios han mostrado que este flavonoide no activa a este factor de transcripción, incluso en presencia de estimuladores de AP-1^{236, 269}. No obstante, las concentraciones altas de epicatequina (100 $\mu\text{mol/L}$) pueden inhibir la actividad de AP-1, pero este efecto se ha asociado con un descenso de la viabilidad celular²⁶⁹. Además, el incremento de la actividad de AP-1 inducido por la epicatequina (10 $\mu\text{mol/L}$) en las células HepG2 se acompaña de un aumento rápido y sostenido de los niveles nucleares de c-Jun (Figura 2.3). En este sentido, Jeong y colaboradores²³⁶ han demostrado que el tratamiento de las células de cáncer de colon con este flavanol no modifica los niveles de c-Jun y, por lo tanto, tampoco la actividad de AP-1.

En cuanto a la modulación del factor de transcripción NF- κ B, la epicatequina induce un incremento rápido y transitorio de la activación de esta vía de señalización: activación temprana de IKK que promueve la fosforilación de I κ B α y su posterior degradación, lo que facilita la movilización al núcleo de NF- κ B (p65) e incrementa su unión al DNA. En este sentido, la subunidad catalítica IKK β juega un papel clave en la

activación de NF- κ B, siendo la principal quinasa de activación de I κ B en el citoplasma²⁷⁶. Sin embargo, esta quinasa también puede fosforilar a NF- κ B(p65) en múltiples sitios, lo que sugiere que IKK β no sólo está implicada en promover la degradación de I κ B, sino también en la fosforilación y transactivación de NF- κ B²⁷⁷. Por otro lado, aunque los estudios sobre el papel de la localización nuclear de IKK β son limitados, se ha descrito que desempeña un papel clave en la inhibición de la represión génica mediada por I κ B de genes dependientes o independientes de NF- κ B, lo que sugiere la comunicación de este factor de transcripción con otras vías de señalización²⁷⁸. Así pues, la epicatequina (10 μ mol/L) provoca una movilización rápida y transitoria hacia el núcleo de IKK β en las células HepG2, lo que puede contribuir a la fosforilación de I κ B.

La subunidad catalítica IKK α se relaciona con la proliferación y la diferenciación celular, y se ha descrito que su localización citoplasmática es crucial en la activación de la ruta alternativa del NF- κ B²⁷⁶. En este sentido, la epicatequina (10 μ mol/L) promueve un rápido incremento de los niveles citosólicos de IKK α , que se relaciona con la rápida activación de la vía NF- κ B en las células HepG2. Además, diversos estudios han mostrado que la localización nuclear de esta quinasa desempeña un papel importante en la inducción de la expresión de genes dependientes de NF- κ B (*ikb*) y de genes independientes de la modulación de este factor de transcripción relacionados con la proliferación celular, como *c-fos* y *c-myc*²⁷⁶. No obstante, la acumulación de IKK α en el núcleo se relaciona con la apoptosis así como con la inhibición de la represión génica mediada por I κ B, al igual que IKK β ²⁷⁸; así, la epicatequina (10 μ mol/L) induce un incremento rápido y transitorio de los niveles nucleares de IKK α en las células HepG2, efecto que se ha descrito también para otros flavonoides en células hepáticas²³². Sin embargo, en otros tipos celulares se ha mostrado que la epicatequina inhibe la vía de señalización del NF- κ B previamente activada por la acción de diversos agentes farmacológicos^{188, 268}.

La actividad antioxidante que manifiestan diversos polifenoles se ha relacionado con su capacidad para regular la vía de señalización del Nrf2 y con la modulación de la actividad de otros factores de transcripción (NF- κ B y AP-1)¹⁰³. En el presente estudio, la epicatequina (10 μ mol) promueve la activación temprana y transitoria de Nrf2, junto

con la activación del NF- κ B y el AP-1 (Figura 2.3). Este resultado está de acuerdo con diversos estudios que han puesto de manifiesto que tanto la epicatequina como otros polifenoles son capaces de activar por sí solos la vía de señalización del Nrf2²⁷².

Al igual que el NF- κ B, la activación del Nrf2 parece estar modulada por el estado redox de la célula. De hecho, se ha descrito que un pequeño incremento en la generación de ROS promueve la activación de este factor de transcripción, mientras que un aumento ligeramente superior estimula a NF- κ B²⁷⁹. En este sentido, se ha puesto de manifiesto que la atenuación de los niveles intracelulares de ROS inducida por diversos polifenoles puede ir acompañada de la activación del Nrf2²⁸⁰. Así pues, la activación de Nrf2 y NF- κ B inducida por la epicatequina (10 μ mol/L) en las células HepG2 está asociada a una disminución transitoria de los niveles intracelulares de ROS. De esta manera, el tratamiento de las células HepG2 con un bloqueante específico de la generación de ROS (difenilén iodonio, DPI) demostró que el incremento de la translocación del Nrf2 y el NF- κ B hacia el núcleo inducido por la epicatequina (10 μ mol/L) en estas células depende de la disminución de los niveles intracelulares de ROS.

Nrf2 y NF- κ B también pueden estar modulados por moléculas clave de las vías de proliferación/supervivencia, como PI3K o ERKs^{103, 272}. El uso de inhibidores específicos de PI3K y ERKs (Wortmanina y PD98059, respectivamente) disminuye la translocación hacia el núcleo de Nrf2 en las células sin tratar, así como el efecto de la epicatequina (10 μ mol/L) sobre la activación de este factor de transcripción. Estos resultados sugieren que la activación de la vía de señalización de la PI3K y de las ERKs inducida por la epicatequina (10 μ mol/L) está directamente relacionada con la activación del Nrf2 en las células HepG2. De manera similar, en los astrocitos, neuronas dopaminérgicas y las células hepáticas, el incremento de la actividad PI3K/AKT está ligado a la activación del Nrf2^{272, 280, 281}. Sin embargo, parece que la PI3K no promueve la activación del NF- κ B en las células HepG2, puesto que sólo la inhibición de las ERKs fue capaz de bloquear el efecto de la epicatequina (10 μ mol/L) sobre este factor de transcripción. Por el contrario, en otros tipos celulares se ha descrito que el incremento de la actividad PI3K se asocia con un aumento de la actividad transcripcional del NF- κ B¹⁰³. Todas estas evidencias apoyan la idea de que la regulación que las vías PI3K/AKT y ERKs llevan a cabo sobre Nrf2 y NF- κ B parece depender de la naturaleza del estímulo y del tipo celular²⁷².

En resumen, el ácido clorogénico y la epicatequina ejercen un efector protector en las células HepG2 frente a un posible daño oxidativo, ya que mejoran su estado redox. Además, la EC estimula la supervivencia y la proliferación de estas células mediante la regulación a lo largo del tiempo de moléculas clave de la vía de la PI3K/AKT, las MAPKs (ERKs y JNKs) y la PKC, que a su vez parecen estar involucradas en la modulación que ejerce este flavonoide sobre importantes factores de transcripción sensibles al estado redox de la célula (NF- κ B, AP-1 y Nrf2).

RESULTADOS

III. Efecto protector de una dieta rica en cacao frente al daño oxidativo hepático inducido por dietil-N-nitrosamina en la rata.

Antecedentes.

El hígado es el principal órgano diana de todas las sustancias químicas que se ingieren a través de la comida y que son absorbidas posteriormente por el tracto intestinal²⁸². La mayoría de estas sustancias son metabolizadas y procesadas por los hepatocitos para ser utilizadas directamente por el organismo, o bien para ser transformadas en componentes celulares y/o tisulares. Sin embargo, hay otras sustancias denominadas comúnmente xenobióticos, que no pueden ser utilizadas por los hepatocitos o incorporarse a las estructuras celulares, cuya metabolización implica la formación de conjugados solubles que posteriormente se pueden transportar y excretar²⁸². Además, la exposición prolongada a estos agentes tóxicos puede desencadenar una respuesta inflamatoria crónica, que puede provocar un daño hepático grave, como la fibrosis, que a su vez puede derivar en una hepatitis crónica, cirrosis e, incluso, cáncer hepático^{47, 283}.

Los nitroso-compuestos, y en particular la dietil-*N*-nitrosamina (DEN) son potentes agentes carcinógenos y mutagénicos, dado que son capaces de incorporarse a la estructura de las bases nitrogenadas^{284, 285}. Estos compuestos nitrosados y sus precursores pueden encontrarse en el aire, el ambiente de determinados tipos de trabajo, en los alimentos (productos cárnicos y lácteos), tabaco, cosméticos y otros productos farmacéuticos¹³², aunque también pueden formarse endógenamente en el organismo a partir de distintos componentes de la dieta^{130, 132}. Algunos estudios han sugerido que las *N*-nitrosaminas pueden causar una gran variedad de tipos de cáncer, por lo que son ampliamente utilizadas en modelos animales de cáncer²⁸⁴. En el hombre, provocan necrosis hepática y están estrechamente relacionados con el cáncer de hígado¹³². En concreto, DEN es la hepatotoxina más utilizada en el estudio experimental de la hepatocarcinogénesis²⁸⁴⁻²⁸⁶.

La activación metabólica de DEN tiene lugar principalmente en los microsomas hepáticos a través de la acción enzimática de monoxidasas dependientes del citocromo P₄₅₀ como CYP1, y da lugar a productos pro-mutagénicos, como O₆-etil deoxi-guanosina y O₄- y O₆-etil deoxi-timidina, que son los responsables de sus efectos carcinogénicos²⁸⁷. Esta activación de DEN estimula a las células de Kupfer, lo que

conduce a la generación de altos niveles de ROS capaces de inducir el daño hepático que, a su vez, puede derivar en el desarrollo de la hepatocarcinogénesis²⁸⁷.

El estrés oxidativo desempeña un papel desencadenante en la iniciación, promoción y progresión de la mayoría de las enfermedades hepáticas^{50, 51, 56}. El hígado es la principal diana de los agentes tóxicos que inducen la apoptosis mediada por radicales libres y posee un eficaz sistema de defensa antioxidante para contrarrestar las ROS que se generan habitualmente durante el metabolismo celular²⁸⁸. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo intenso, el sistema antioxidante de la célula puede verse comprometido para hacer frente al exceso de ROS, y se puede producir un daño en las moléculas celulares críticas (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos)^{56, 68}.

Los antioxidantes de la dieta, como los flavonoides, tienen un papel protector frente al estrés oxidativo y han sido propuestos como potenciales agentes preventivos y terapéuticos frente al daño hepático⁵¹. En este sentido, el cacao y sus productos derivados, muy consumidos en la Unión Europea y en EEUU, son alimentos que constituyen una fuente rica en flavonoides, especialmente en flavanoles como (-)-epicatequina y (-)-catequina y en procianidinas²⁸⁹.

Los flavonoides del cacao se consideran potentes antioxidantes; de hecho, su capacidad de captar radicales libres es mucho mayor que la del té negro, el té verde o el vino²⁹⁰. Además, estos compuestos pueden influir en numerosas funciones biológicas a través de la regulación de rutas de transducción de señales para estimular apoptosis y/o inhibir procesos de inflamación y proliferación en diferentes líneas celulares humanas cancerígenas^{51, 68, 289, 291, 292}. Por todo esto, los compuestos fenólicos del cacao se han propuesto no sólo como potenciales agentes naturales protectores del daño hepático, sino también como agentes terapéuticos^{51, 289, 293}. Sin embargo, hasta la fecha, los estudios acerca del beneficio de una dieta rica en cacao frente al estrés oxidativo relacionado con el daño hepático son bastante limitados.

La modulación de las enzimas antioxidantes de fase I (GR y GPx) y detoxificantes de fase II (GST), así como los niveles de GSH, desempeñan un papel clave en el balance del estado redox de la célula, ya que reducen la generación excesiva de ROS y peróxidos y contribuye a la detoxificación de los xenobióticos^{51, 255}. En este

sentido, se ha descrito que el cacao es capaz de aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes de fase I en las células hepáticas^{51, 292} y estimular la supervivencia y proliferación celulares a través de la modulación de diferentes rutas de señalización (PI3K/AKT y MAPKs)^{255, 289, 292}. Así, en las células HepG2, la estimulación de las actividades enzimáticas GPx y GR por la acción del cacao tiene lugar a través de la activación de las ERKs²⁹². Además, se ha demostrado que la inducción de la expresión de la enzima detoxificante GST está implicada en la regulación de la proliferación celular y la protección frente a la apoptosis mediada por la señalización de JNKs²⁹⁴.

Todas las actividades biológicas atribuidas al cacao resaltan el interés de su potencial efecto protector frente al daño hepático inducido por la hepatotoxina dietil-N-nitrosamina en ratas. Así, en el presente trabajo se estudia la modulación de los sistemas de defensa antioxidante y detoxificante celulares y de proteínas relacionadas con la supervivencia/proliferación y muerte.

Artículo. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19602430> **159**

Granado-Serrano A.B., Martín M.A., Bravo L., Goya L. and Ramos S. A diet rich in cocoa attenuates N-nitrosdiethylamine-induced liver injury in rats. Food Chemistry and Toxicology 2009, 47(10):2499-506

Discusión.

La dietil-*N*-nitrosamina provoca una generación excesiva de radicales libres en el hígado, lo que conduce a un estado de estrés oxidativo y al inicio de la carcinogénesis²⁸⁷. La utilización de esta toxina constituye el modelo de estudio más aceptado para analizar la relación entre la necrosis hepática y la iniciación del HCC^{283-286, 295}. Además, DEN induce la proliferación postnecrótica de los hepatocitos, por lo que contribuye a incrementar el número de células iniciadas durante la hepatocarcinogénesis²⁹⁵.

El daño hepático causado por DEN disminuye la funcionalidad de los hepatocitos, lo que puede ser observado por la alteración en la síntesis de albúmina. De hecho, los pacientes con HCC en un estado de desarrollo temprano presentan bajos niveles de albúmina en suero²⁸⁵. En concordancia con estas observaciones, en nuestro estudio, todos los animales tratados con DEN, alimentados con dieta estándar (grupo 3) o rica en cacao (grupos 4 y 5), mostraron una disminución de los niveles totales de proteína en plasma. Por otra parte, la reducción en la ingesta y en la ganancia de peso pueden ser indicadores indirectos de la pérdida de la funcionalidad hepática inducida por DEN^{285, 286, 296}. No obstante, el análisis de la posible alteración en el tamaño del hígado de estos animales no mostró, en concordancia con estudios previos, diferencias en la relación peso hígado/peso corporal entre los animales sanos y los tratados con DEN^{285, 297}.

El mal funcionamiento hepático causado por DEN puede reflejarse en los niveles circulantes de las enzimas hepáticas [aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (ALP)]²⁹⁵. En este sentido, las actividades elevadas de ALT y AST constituyen buenos indicadores para diagnosticar el daño hepático, mientras que el incremento de ALP en suero se asocia principalmente con alteraciones patológicas del flujo biliar²⁹⁵. Por su parte, los valores altos de LDH son indicativos de la pérdida de la integridad de la membrana de los hepatocitos^{285, 286}. En el presente estudio, todos los animales que recibieron el tóxico (grupos 3, 4 y 5) mostraron un incremento en las actividades séricas de ALT, ALP y LDH, pero curiosamente sólo los animales tratados con DEN que fueron alimentados con la dieta rica en cacao (grupos 4 y 5) mostraron un incremento en la actividad sérica de AST. Todos estos

resultados sugieren que el cacao no puede impedir el daño necrótico causado por la dietil-*N*-nitrosamina.

El cacao, rico en compuestos fenólicos antioxidantes, puede inhibir diferentes procesos tumorales relacionados con el cáncer de hígado²⁹⁶, pulmón ²⁹⁷, mama y páncreas²⁹⁸, ya que puede impedir la acción mutagénica de las aminas heterocíclicas.

El glutatión participa en el mantenimiento del estado redox de las células, ya que contribuye a contrarrestar las ROS generadas durante el estrés oxidativo^{64, 65}. En nuestro estudio, los animales tratados con DEN que fueron alimentados con una dieta rica en cacao mantuvieron unos niveles normales de GSH (grupo 5) o incluso aumentaron su contenido (grupo 4), a diferencia de la depleción de GSH observada en los animales tratados con DEN que recibieron una dieta estándar (grupo 3). Estos resultados apoyan la potencialidad del cacao para contrarrestar el daño oxidativo inducido por DEN y el refuerzo de las defensas antioxidantes en condiciones normales, como previamente se ha descrito para otros antioxidantes naturales^{285, 286}. De hecho, también se observó que en aquellos animales tratados con DEN y alimentados con una dieta rica en cacao durante todo el estudio (grupo 4) no se modificaba el contenido sérico de grupos carbonilo, indicativo de daño oxidativo a proteínas^{285, 286}, a diferencia del efecto que tuvo esta hepatotoxina en los animales que habían seguido una dieta estándar.

La actividad de las enzimas de fase I (GPx, GR) y de fase II (GST) está estrechamente relacionada con el metabolismo del GSH⁶⁴. Diversos estudios han descrito que la disminución de los niveles de GSH, así como de las actividades GPx, GR y catalasa, es un rasgo característico de los tumores hepáticos^{285, 286}. En nuestro estudio, las actividades GPx y GR se incrementaron en los animales sanos alimentados con una dieta rica en cacao (grupo 2), en concordancia con estudios previos que muestran la inducción de ambas actividades enzimáticas por la acción de extractos polifenólicos de cacao en células hepáticas²⁹² y productos derivados de fibra de cacao en animales de experimentación²⁹⁹, respectivamente. La gravedad del estrés oxidativo causado por DEN en el hígado de estos animales se puso de manifiesto por la disminución de los niveles de GSH y de las actividades de la GPx y catalasa, observada en los animales tratados con DEN y alimentados con la dieta estándar. Sin embargo, estos parámetros

no se vieron modificados en aquellos animales a los que se les sustituyó la dieta estándar por la dieta cacao tras la intoxicación con DEN (grupo 5). Además, en los animales que fueron alimentados con cacao durante todo el experimento (grupos 2 y 4), los niveles de GSH y la actividad GPx se incrementaron por encima de los controles (grupo 1). Todos estos resultados, corroboran la acción protectora del cacao frente al daño oxidativo provocado por DEN. Por su parte, y a diferencia de los resultados obtenidos con las enzimas GPx y catalasa, la actividad GR observada en todos los animales tratados con DEN (grupos 3-5) fue similar a la que presentaban los animales control (grupo 1).

El GSH actúa como sustrato para la GST, proporcionándole grupos sulfhidrilo para sus reacciones de conjugación que contribuyen a neutralizar y solubilizar los productos resultantes del metabolismo de los xenobióticos^{64, 65}. Diversos estudios han descrito tanto un incremento como una disminución de la actividad GST tras el daño hepático inducido por DEN^{286, 296, 300}, mientras que la exposición a diferentes compuestos naturales, y también polifenoles, se ha relacionado con la inducción de esta enzima como uno de sus principales mecanismos de protección frente a la carcinogénesis y el estrés oxidativo inducidos químicamente^{64, 286, 300}. En nuestro estudio, la actividad GST hepática no disminuyó tras el tratamiento con DEN; sin embargo, los animales tratados con esta hepatotoxina, que además recibieron una dieta rica en cacao (grupo 4), presentaron una actividad GST significativamente superior a la del resto de los grupos de animales, lo que sugiere un papel protector del cacao frente a un daño oxidativo hepático.

La inducción de la apoptosis es un mecanismo importante que se produce en una situación de daño hepático agudo^{84, 295}. De hecho, una tasa alta de apoptosis de los hepatocitos está relacionada con la fibrosis hepática progresiva y el cáncer de hígado^{287, 301}. La actividad de la caspasa-3, que es la enzima ejecutora más importante de la apoptosis, se considera un buen método de determinación de daño hepático³⁰¹. En nuestro estudio, además del daño necrótico, el tratamiento con DEN (grupo 3) aumentó la muerte por apoptosis en los hepatocitos, lo que se reflejó en una elevada actividad de la caspasa-3. Sin embargo, el cacao mostró un efecto protector frente al daño apoptótico inducido por DEN. Se observó una disminución de la actividad de la caspasa-3 en los animales que habían recibido una dieta rica en cacao tras la administración de DEN (grupo 5), que fue completamente restablecida en los animales tratados con DEN que

habían tomado durante todo el experimento una dieta rica en cacao (grupo 4). Además, en condiciones normales, la administración de una dieta rica en cacao disminuyó la actividad de la caspasa-3 de los hepatocitos (grupo 2).

Las activación de las JNKs también se ha relacionado con la apoptosis en el hígado⁸⁸. En este sentido, la administración de DEN (grupo 3), en consonancia con el aumento de la actividad caspasa-3, provocó un incremento de la relación p-JNKs/JNKs que no se observó en los animales que habían recibido una dieta rica en cacao (grupos 4 y 5); esto sugiere un papel protector del cacao frente a la muerte de los hepatocitos inducida por DEN.

Los niveles fosforilados de AKT se consideran como un marcador crítico de la agresividad del cáncer hepático¹²⁶. En nuestro estudio, DEN incrementó los niveles de p-AKT (grupo 3), aunque estos niveles no se modificaron en los animales tratados con esta hepatotoxina que habían recibido cacao como parte de su dieta (grupos 4 y 5). Estos resultados sugieren que el cacao atenúa la proliferación hepática postnecrótica inducida por DEN y reduce el número de células iniciadas²⁹⁵.

Las ERKs también juegan un papel crítico en el balance entre la proliferación/supervivencia y progresión del ciclo celular⁸⁴. Recientemente se ha descrito un incremento de los niveles fosforilados de ERKs en tumores en un estado avanzado³⁰². De acuerdo con estos resultados, en nuestro estudio, los animales tratados con DEN (grupo 3) experimentaron una disminución de los niveles de p-ERKs, que no se previno con la administración de la dieta rica en cacao (grupos 4 y 5). Sin embargo, en los animales control que habían recibido cacao en su dieta (grupo 2), se observó un incremento en los niveles fosforilados de las ERKs, coincidiendo con otros estudios que han descrito que el cacao ejerce un efecto protector frente a un posible daño oxidativo en las células hepáticas mediante el incremento de las enzimas antioxidantes (GPx y GR) a través de la activación de las ERKs²⁹².

Todos estos resultados sugieren que las elevadas actividades séricas de AST y ALT observadas en los animales tratados con DEN que recibieron una dieta rica en cacao (grupos 4 y 5) frente a los que recibieron una dieta estándar (grupo 3), podrían deberse a una mayor viabilidad de los hepatocitos en el hígado de estos animales, puesto

que presentaron una menor actividad caspasa-3 y LDH, y niveles inferiores de p-JNKs. No obstante, los animales tratados con DEN que recibieron la dieta estándar (grupo 3) mostraron niveles de p-AKT elevados, lo que podría sugerir un incremento de la proliferación/supervivencia celular.

En resumen, se puede decir que una dieta rica en cacao no protege completamente frente al daño necrótico inducido por DEN en el hígado de rata, como se refleja en los altos niveles séricos de la actividad de los marcadores de daño hepático (AST, ALT y ALP), la elevada actividad LDH y la disminución de los niveles de p-ERKs. Sin embargo, el cacao atenúa parcialmente el daño oxidativo hepático inducido por DEN mediante la estimulación del sistema de defensa antioxidante (GSH, GPx, catalasa) y detoxificante (GST) de los hepatocitos, lo que se aprecia en la disminución del daño oxidativo a proteínas. Además, la dieta rica en cacao previene la muerte celular programada inducida por el tóxico, puesto que disminuye marcadores de apoptosis (p-JNKs, actividad de la caspasa-3) y reduce la proliferación postnecrótica de las células dañadas (p-AKT).

DISCUSIÓN GENERAL

Discusión General.

Las actividades antioxidante y anticarcinogénica de los polifenoles de la dieta han sido ampliamente estudiadas en diferentes líneas celulares^{213, 263, 291} y en animales de experimentación^{51, 139}. Además, diversos estudios epidemiológicos han mostrado una asociación entre el consumo de alimentos y bebidas ricos en polifenoles y la disminución del riesgo de padecer enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo, como el cáncer^{18, 22, 23, 134}.

En la actualidad, existe una gran controversia respecto a los antioxidantes y su uso frente al cáncer. Muchos de los fármacos que se administran durante la quimioterapia inducen estrés oxidativo en las células cancerígenas, lo que conduce a su destrucción por necrosis y/o apoptosis, por lo que la administración de antioxidantes, como los compuestos fenólicos de la dieta, podría disminuir esa alteración del estado redox celular e impedir la muerte de las células cancerígenas³⁰³. Esta observación se ha puesto de manifiesto recientemente al demostrarse que el compuesto del té verde EGCG interfiere con los efectos anticancerígenos de Bortezomib, un fármaco usado para el tratamiento del mieloma y linfoma, dado que bloquea su función inhibidora del proteosoma³⁰⁴. Sin embargo, otros estudios han demostrado que los compuestos fenólicos también pueden contribuir a la inducción de la muerte de las células cancerígenas a través de un efecto pro-oxidante^{148, 305}. En este sentido, se ha descrito que la genisteína actúa de manera sinérgica con el 5-fluorouracilo potenciando la muerte de las células de cáncer de colon inducida mediante el incremento de la generación de las ROS intracelulares³⁰⁶. De hecho, el empleo de los compuestos fenólicos parece incrementar la eficacia de los fármacos anticancerígenos, lo que permite reducir su dosis. De esta manera, un estudio reciente ha mostrado que la quercetina disminuye el contenido de GSH intracelular y potencia la acción apoptótica del trióxido de arsénico (As_2O_3), fármaco que se utiliza frente a la leucemia³⁰⁷. No obstante, resulta de gran interés el estudio de la valoración de la potencial actividad preventiva de los compuestos fenólicos de la dieta frente al cáncer mediante el estudio de su mecanismo de acción molecular, lo que constituye el principal objetivo de este trabajo^{51, 136, 137}.

El efecto quimiopreventivo y/o quimioterapéutico de los compuestos fenólicos de la dieta frente al cáncer implica diversos mecanismos de acción que pueden diferir entre

los distintos compuestos^{3, 49, 51, 68, 136, 137}, así como para un mismo polifenol en función de la concentración que se use^{160, 216, 308} o el tipo celular en el que actúe^{309, 310}. En este sentido, algunos estudios han descrito que diversos compuestos fenólicos a bajas concentraciones tienen un efecto antioxidante y antiapoptótico y promueven la proliferación celular²¹⁶. Por el contrario, parece que los compuestos fenólicos a altas concentraciones actúan como agentes pro-oxidantes^{160, 216, 308} y parecen inducir apoptosis de manera selectiva en las células cancerígenas^{163, 310}. Sin embargo, el mecanismo molecular de acción de cada uno de estos compuestos fenólicos ligado a un efecto determinado aún no está bien caracterizado.

1. Potencial efecto preventivo de tres clases de compuestos fenólicos sobre la línea celular HepG2.

1.1. Quercetina.

La quercetina parece tener actividad anticancerígena, y ello se ha relacionado con su actividad antioxidante, su capacidad para inhibir enzimas que activan carcinógenos, y con su actividad para modular diferentes rutas de transducción de señales^{159, 196, 215, 218, 224}. De manera más concreta, Ferraresi y colaboradores³⁰⁵ han demostrado que un tratamiento a corto plazo con quercetina tiene un efecto antioxidante y antiapoptótico, mientras que un tratamiento a largo plazo resulta en una acción pro-oxidante y pro-apoptótica. Además, se ha descrito que los efectos de la quercetina sobre la apoptosis dependen en gran medida de las condiciones experimentales, como por ejemplo, su concentración en el medio y el tipo celular sobre el que actúa²¹⁶.

Este trabajo ha puesto de manifiesto que la quercetina disminuye la viabilidad de las células HepG2 de manera dosis- y tiempo-dependiente. En este sentido, otros estudios han demostrado que las concentraciones bajas de quercetina evocan mecanismos de protección, supervivencia y/o proliferación, mientras que las concentraciones altas de este flavonoide tienen un efecto apoptótico y necrótico²¹⁶. Así, la quercetina estimula el crecimiento de la línea de carcinoma escamoso SCC-25 si se administra en concentraciones de 1 a 10 $\mu\text{mol/L}$, mientras que dosis más altas (100 $\mu\text{mol/L}$) lo inhiben³⁰⁸. De manera similar, en la línea celular de hepatoma de rata

H4IIIE, una concentración de 10 $\mu\text{mol/L}$ de quercetina protege a estas células de un daño oxidativo inducido por H_2O_2 , mientras que una concentración 50 $\mu\text{mol/L}$ es capaz de promover por sí misma la activación de la cascada de caspasas e inducir apoptosis en la misma línea celular²¹⁶.

El análisis de los marcadores de citotoxicidad y estado redox (LDH y ROS), así como de las proteínas implicadas en la muerte celular programada (caspasas y miembros de la familia de genes *bcl-2*) muestra que, además de un daño necrótico, la quercetina induce apoptosis en las células HepG2 a través de la activación de la ruta intrínseca de apoptosis (caspasas-9 y -3) y el desequilibrio en los niveles de los miembros pro- (Bcl-x_S, Bax) y anti-apoptóticos (Bcl-x_L) de la familia Bcl-2. En este sentido, se ha observado que la quercetina también induce la muerte celular programada en diversas líneas celulares cancerígenas mediante la activación de la vía mitocondrial (caspasa-9) y el descenso de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-x_L)^{159, 170}. No obstante, en las células de cáncer de próstata LNCaP, la quercetina induce la muerte celular programada a través de la activación de ambas rutas de inducción de apoptosis (extrínseca e intrínseca), la disminución de la relación Bcl-x_L/Bax y el aumento de la translocación de Bax hacia la mitocondria²¹⁵.

La activación de la apoptosis provocada por la quercetina en las células HepG2 parece estar promovida por el incremento transitorio de los niveles intracelulares de ROS. De manera análoga, Nakazato y colaboradores¹⁴⁹ han demostrado que EGCG induce apoptosis en las células B malignas a través del aumento de la generación de ROS, ya que la incubación de estas células con EGCG en presencia de catalasa o superóxido dismutasa, reduce significativamente la producción de ROS y el porcentaje de células apoptóticas.

La modulación de las señales implicadas en las vías de proliferación y supervivencia, como la PI3K/AKT y las ERKs, puede estar indirectamente implicada en la modulación de la muerte celular programada^{76, 83}, lo cual está de acuerdo con el efecto que ejerce la quercetina sobre ambas quinasas en las células HepG2. Las concentraciones más bajas de quercetina, que son las que tienen un menor efecto sobre la viabilidad de las células HepG2, incrementan los niveles fosforilados de AKT y ERKs, mientras que las concentraciones más altas del flavonoide disminuyen de manera dosis-dependiente

los niveles fosforilados de ambas quinasas. De manera similar, diversos estudios han descrito que el efecto apoptótico que induce la quercetina en las células de cáncer de pulmón A549¹⁵⁹ y de cáncer de próstata LNCaP²¹⁵ está asociado a una disminución dosis-dependiente de los niveles fosforilados de AKT. Por su parte, el descenso de los niveles activos de las ERKs inducido por las concentraciones altas de quercetina se ha relacionado con la inhibición de la proliferación celular y la parada del ciclo celular⁸³. No obstante, en el caso de las ERKs, también se ha descrito que las concentraciones altas de este flavonoide provocan un aumento de sus niveles fosforilados, lo que se ha asociado con la inducción de apoptosis¹⁵⁹. Esto sugiere que, a pesar de que la activación de las ERKs se suele asociar con la proliferación y supervivencia celulares, su modulación durante el proceso apoptótico puede depender del contexto celular.

1.2. Epicatequina.

La epicatequina posee una importante actividad antioxidante, por lo que podría considerarse como un buen agente preventivo frente al daño oxidativo celular^{255, 259, 260, 263, 287}.

En este estudio, la epicatequina disminuye de manera dosis dependiente la generación de ROS en las células HepG2, lo que se puede interpretar como una mejora del estado redox celular. Además, en concordancia con estudios realizados anteriormente en células prostáticas²⁶², la epicatequina no induce la apoptosis en las células HepG2, por lo que no se observa un incremento de la actividad caspasa-3 ni se modifican los niveles de las proteínas Bcl-2 pro- (Bax) y anti-apoptóticas estudiadas (Bcl-xL); de hecho, la epicatequina estimula la supervivencia y la proliferación celular de manera dosis dependiente. Estos resultados discrepan con los efectos observados por otros autores que han descrito que este flavonoide inhibe la proliferación celular²⁶⁷, aunque esta diferencia quizás pueda ser debida al tipo de célula utilizado en el estudio, como se ha descrito de manera previa para otros compuestos fenólicos^{309, 310}.

La regulación de la vía PI3K/AKT y las ERKs en las células HepG2 por la epicatequina muestra que este flavanol activa ambas vías de señalización, siendo imprescindible la activación de la vía PI3K/AKT para la supervivencia de estas células. El hecho de que la activación de estas señales no se produzca de manera dosis-

dependiente podría apuntar hacia una respuesta diferente en función de la concentración empleada, como se ha descrito para otros polifenoles^{160, 216, 308}. Por otro lado, se ha de destacar que otras catequinas, como EGCG y EGC, han mostrado efectos contrarios a los del presente estudio en el tratamiento de células cancerígenas; dichos trabajos muestran un incremento de los niveles de ROS que media, posteriormente, en la inducción de apoptosis (activación de caspasas e inhibición de IAPs)^{149, 163}.

1.3. Acido Clorogénico.

Entre las propiedades biológicas de este ácido fenólico cabe mencionar su papel como antioxidante^{244, 252}.

En este estudio, las concentraciones más altas del ácido clorogénico afectan levemente a la viabilidad y proliferación de las células HepG2, como se había mostrado en trabajos anteriores²⁴⁰. Sin embargo, el ácido clorogénico no induce apoptosis en estas células, lo que está de acuerdo con el incremento de los niveles de glutathion y sugiere una mejora de la tolerancia celular intrínseca frente al estrés oxidativo. De hecho, la presencia o ausencia de este antioxidante endógeno (GSH) es uno de los factores determinantes del efecto pro- o anti-oxidante de los compuestos fenólicos³⁰⁵. En este sentido, se ha demostrado que el ácido clorogénico protege a las células prostáticas del daño oxidativo inducido por *t*-BOOH, H₂O₂ o FeSO₄²⁴⁰.

De manera análoga a un estudio previo llevado a cabo con el ácido clorogénico¹⁵², en este trabajo se observa que el potencial efecto protector de este ácido fenólico como antioxidante no implica la modulación de los niveles de fosforilación de AKT y ERKs en las células HepG2.

2. Efecto de quercetina y epicatequina sobre la potencial modulación a lo largo del tiempo de vías de señalización clave en los procesos de supervivencia y/o proliferación celular en las células HepG2.

2.1. Quercetina.

El efecto apoptótico de la quercetina en las células HepG2 se asocia con una

inhibición rápida y sostenida de las principales vías de señalización implicadas en la supervivencia/proliferación celular. La quercetina causa la inhibición temprana de las vías de señalización PI3K/AKT y PKC α para, posteriormente, promover la translocación y activación nuclear de PKC δ , la activación sostenida de las JNKs y la inhibición tardía de las ERKs. Estos resultados están de acuerdo con estudios anteriores en los que se ha descrito que la muerte celular programada inducida por la quercetina en las células de cáncer de pulmón A549 o en las células neuronales está asociada con la inhibición de AKT y ERKs^{159, 160} y con la activación de JNKs¹⁵⁹. Además, en las células de melanoma de ratón B16-BL6, la quercetina inhibe la expresión de PKC α e induce la translocación desde el citosol al núcleo de PKC δ durante la inducción de la apoptosis⁹⁸.

De manera similar, la inducción de la muerte celular programada por otros polifenoles se ha relacionado con la regulación de las rutas de señalización estudiadas en este trabajo. Así, el efecto apoptótico de la curcumina se ha atribuido a la inhibición de la fosforilación de AKT¹⁷³, mientras que la genisteína inactiva las ERKs¹⁸¹ y la luteolina activa las JNKs⁸⁶.

2.2. Epicatequina.

El tratamiento de las células HepG2 con epicatequina disminuye de manera transitoria la generación de ROS y también impide la disminución de la viabilidad celular provocada por el agente oxidante *t*-BOOH tras un pretratamiento de las células con epicatequina durante 4 ó 18 horas. Todo ello sugiere que este flavonoide mejora las defensas antioxidantes celulares. Además, y de acuerdo con el efecto de supervivencia que se ha demostrado, la epicatequina activa de manera temprana y sostenida algunas proteínas clave de las vías de proliferación/supervivencia (PI3K/AKT, ERKs y PKC α), a la vez que promueve la acumulación sostenida de PKC δ en el citosol, pero no modifica los niveles activos de las JNKs. En este sentido, algunos estudios han demostrado que las bajas concentraciones de otras catequinas como EGCG, al igual que la epicatequina, promueven mecanismos de protección y supervivencia celular¹⁵⁸. Así, en queratinocitos epidérmicos, se ha demostrado que EGCG inhibe la apoptosis inducida por la luz UV a través del incremento de los niveles fosforilados de AKT y ERKs, lo que se traduce en la fosforilación e inhibición de miembros pro-apoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2,

como Bad³¹¹. Por su parte, en células de neuroblastoma, el mecanismo de protección de EGCG se asocia además con un incremento de los niveles fosforilados de PKC α ³¹².

3. Potencial modulación por quercetina y epicatequina a lo largo del tiempo de dianas moleculares clave en las vías de señalización de los factores de transcripción NF- κ B, AP-1 y Nrf2 en las células HepG2.

3.1. Quercetina.

La quercetina provoca la inhibición temprana de la vía de señalización del NF- κ B en las células HepG2, lo que parece estar relacionado con la activación sostenida de las JNKs. En concordancia con estos resultados, otros estudios realizados en diversas líneas celulares han demostrado que la quercetina inhibe la vía de señalización del NF- κ B cuando ésta se ha estimulado previamente con diversos agentes, y ello ocurre junto a la inhibición de las MAPKs (ERKs y JNKs)^{232, 237}. De manera similar, la muerte celular programada inducida por la curcumina implica la supresión de la activación constitutiva de AKT a través de la inhibición de NF- κ B, la disminución de los niveles fosforilados de I κ B y la inactivación de IKK en las células de linfoma MCL¹⁷³. Por su parte, la genisteína induce apoptosis en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 a través de la inhibición de AKT, ERKs y NF- κ B¹⁸⁵, mientras que EGCG induce la muerte celular programada en diversas líneas celulares cancerígenas mediante la reducción de los niveles de NF- κ B¹⁶², la activación de I κ B¹⁸³ o la inhibición de IKK¹⁸⁴.

La quercetina induce el incremento sostenido de la actividad AP-1, de los niveles nucleares de c-Jun y de los niveles activos de JNKs en las células HepG2. En este sentido, se demuestra que la activación sostenida de las JNKs es responsable de la inhibición de las señales de proliferación/supervivencia (AKT, ERKs y NF- κ B) y de la activación de la caspasa-3. Por su parte, la modulación de la p38-MAPK no se relaciona con la regulación de las JNKs en las células HepG2, lo que sugiere que ambas proteínas contribuyen de manera independiente a la inducción de la apoptosis⁹⁴. De manera similar, una concentración de 20 μ mol/L de quercetina promueve la activación de AP-1 en las células de cáncer de próstata (PC3), aunque a diferencia de nuestros resultados, las concentraciones de quercetina superiores a 20 μ mol/L provocan el efecto contrario³¹³. Además, la activación de AP-1 inducida por la genisteína en las células PC3 está

asociada con la activación de las JNKs, mientras que en el caso del kaempferol parecen ser las ERKs las que juegan un papel más relevante para la activación de este factor de transcripción³¹³. Sin embargo, otros trabajos han mostrado resultados opuestos a los que se describen en este estudio; así, en las células de cáncer de mama, la apoptosis inducida por la genisteína se relaciona con la inhibición de AP-1¹⁸⁵.

3.2. Epicatequina.

La epicatequina activa de manera transitoria la vía de señalización del NF- κ B en las células HepG2. Sin embargo, en las células Jurkat, se ha mostrado que si se estimula la ruta del NF- κ B de manera previa, las concentraciones altas de epicatequina (100-1000 μ mol/L) son capaces de inhibir esta vía de señalización a través de la disminución de la fosforilación de IKK y la inhibición de la unión de NF- κ B al DNA¹⁸⁸. Este mismo efecto se ha observado en células de linfoma de Hodgkin (L-428 y KM-H2), pero en este caso la inhibición de la unión de NF- κ B al DNA no estaba ligada a una acción antioxidante de la epicatequina, ni al descenso de los niveles fosforilados de NF- κ B(p65) o su translocación al núcleo, puesto que provoca una disminución de la viabilidad de estas células²⁶⁸.

La epicatequina induce el incremento sostenido de los niveles nucleares de c-Jun y de la actividad de AP-1 en las células HepG2. Sin embargo, otros estudios muestran resultados diferentes a los observados en el presente trabajo, dado que en diferentes líneas celulares la epicatequina no modifica la actividad de este factor de transcripción, incluso en presencia de agentes estimuladores de AP-1^{236, 269}, y sólo las concentraciones altas de epicatequina (100 μ mol/L) inhiben la actividad de AP-1 a la vez que se produce una leve disminución de la viabilidad celular²⁶⁹. Esto sugiere que el aumento de la actividad AP-1 que la epicatequina provoca en las células HepG2 puede deberse al tipo celular empleado, ya que como se ha descrito para la regulación de otros factores de transcripción, esta modulación puede depender de la línea celular utilizada.

En este estudio, la epicatequina también provoca un incremento rápido y transitorio de la translocación de Nrf2 al núcleo que parece dependiente de la activación de la PI3K y las ERKs, lo que está de acuerdo con los efectos observados con otros compuestos fenólicos^{103, 272}. EGCG induce el incremento de la translocación nuclear de

Nrf2 acompañado de la activación de la vía PI3K/AKT, que a su vez se relaciona con un efecto de pro-supervivencia en los linfocitos B³¹⁴. De manera similar, en las células endoteliales y las células epiteliales mamarias (MCF-10A), el incremento de los niveles nucleares de Nrf2 inducido por EGCG se asocia con la activación de PI3K/AKT y ERKs³¹⁵. Por su parte, el resveratrol protege a las células de cáncer de pulmón A549 frente a la inducción de estrés oxidativo mediante la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes, y ello ocurre a través del incremento de la translocación de Nrf2 al núcleo y de la fosforilación del mismo en células de leucemia K562³¹⁶

4. Estudio del potencial efecto protector de una dieta rica en cacao sobre el daño hepático inducido por dietil-*N*-nitrosamina en ratas.

La administración de dietil-*N*-nitrosamina (DEN) en animales se considera como el modelo más aceptado para el estudio de la iniciación del cáncer hepático^{284, 286}.

Como se ha descrito en otros estudios, el tratamiento con DEN causa un incremento de las actividades séricas de ALT y ALP, así como de la actividad hepática caspasa-3 y LDH, lo que resulta indicativo de un daño hepático causado por la inducción de necrosis y apoptosis^{217, 285, 295, 301}. Este daño se acompaña de un descenso en los niveles hepáticos de GSH y de las actividades GPx y catalasa, así como de un incremento del contenido de grupos carbonilo, ambos motivados por el aumento de estrés oxidativo en el hígado de estas ratas²⁸⁷. Además, esta hepatotoxina provoca un incremento de los niveles activos de las JNKs, que en estudios previos se ha relacionado con la inducción de la muerte celular programada en hígado¹²⁵. Por otra parte, el tratamiento con DEN aumenta los niveles activos de AKT en las ratas tratadas, lo que se ha asociado con un peor pronóstico en los pacientes con cáncer hepático¹²⁶, ya que el incremento de los niveles fosforilados de esta proteína supone una mejora de la supervivencia y la proliferación de las células, incluidas las cancerígenas^{48, 295}.

La dieta rica en cacao, en concordancia con los efectos descritos sobre células hepáticas en cultivo²⁹², incrementa la actividad de las enzimas del sistema de defensa antioxidante (GPx y GR) y los niveles de glutatión en el tejido hepático. Además, el cacao incrementa los niveles activos de las ERKs y disminuye la actividad enzimática de

señales relacionadas con los procesos de muerte como la actividad de la caspasa-3 y la LDH^{289, 292}.

El estudio de la posible protección del cacao frente al daño hepático provocado por DEN muestra que no puede impedir completamente el daño hepático causado por el tóxico, como se refleja en la disminución de los niveles totales de proteína en suero y el aumento de la actividad de las enzimas AST, ALT, ALP y LDH. Dichas alteraciones se observan tanto en los animales tratados con DEN y alimentados con una dieta rica en cacao durante todo el ensayo, como en los animales a los que se les sustituye la dieta estándar por otra rica en cacao después de inducirles el daño hepático. Por tanto, parece que el cacao no previene ni atenúa algunas de las alteraciones hepáticas causadas por DEN. En este sentido, otros estudios llevados a cabo con productos derivados del cacao en ratas han descrito unos resultados similares²⁹⁶. No obstante, en otros trabajos realizados con flavonoides puros, como morina, se ha demostrado que el pretratamiento de los animales con estos compuestos impide el incremento de los niveles hepáticos de AST, ALT y ALP inducido por la administración de DEN²⁸⁶.

En cuanto a la modulación del sistema de defensa antioxidante, de manera análoga a lo que se ha descrito para morina²⁸⁶, la dieta rica en cacao previene el agotamiento de las reservas de GSH y la disminución de la actividad GPx inducidos por DEN en el tejido hepático. Estas observaciones contribuyen a corroborar la potencialidad del cacao para contrarrestar el daño oxidativo inducido por DEN y reforzar las defensas antioxidantes^{285, 286}.

La actividad de la enzima detoxificante GST aumenta en las ratas alimentadas con cacao e inyectadas con DEN, lo que sugiere que el cacao incrementa la actividad GST como mecanismo de defensa para proteger al hígado de estos animales del estrés oxidativo⁶⁴.

La dieta rica en cacao impide el incremento de la actividad caspasa-3 inducido por DEN, así como de los niveles fosforilados de las JNKs, es decir, parece que el cacao disminuye la muerte apoptótica inducida por el tóxico en el hígado de estos animales. Además, aunque no previene la muerte por necrosis de los hepatocitos, como refleja la actividad LDH, la dieta rica en cacao impide el incremento de los niveles activos de

AKT en los animales tratados con DEN, y apunta hacia la inhibición de la proliferación post-necrótica promovida por el tóxico en los hepatocitos dañados²⁹⁵. Si bien estos resultados son paradójicos y no se dispone de una explicación, se ha de mencionar que en pacientes con cáncer de hígado se han encontrado datos similares²⁸⁷.

En resumen, la quercetina podría considerarse como un potencial agente preventivo y/o terapéutico frente al cáncer, dado que es capaz de inducir apoptosis en las células HepG2 a través de la regulación en el tiempo de señales clave de las rutas de proliferación/supervivencia celular; sin embargo, el ácido clorogénico y la epicatequina podrían sugerirse como posibles agentes protectores frente al daño oxidativo, ya que aumentan el potencial antioxidante de la célula y promueven la supervivencia celular, respectivamente. Además, la administración de una dieta rica en cacao, que posee un alto contenido en flavanoles como la epicatequina, puede atenuar el daño hepático inducido por un agente oxidante como la dietil-N-nitrosamina a través de la modulación del sistema de defensa antioxidante y detoxificante de la célula, y la regulación de señales clave para los procesos de supervivencia/proliferación y/o muerte celular programada. No obstante, se ha de destacar que son necesarios otros estudios para determinar de manera inequívoca la relación entre los procesos de apoptosis y proliferación/supervivencia modulados por los compuestos fenólicos y evaluar su potencial uso en la prevención y/o terapia de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo antes de sugerir el consumo habitual de un alimento con un alto contenido en polifenoles.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Una concentración baja de *quercetina* (10 $\mu\text{mol/L}$) no induce apoptosis en las células HepG2, sino que activa a las proteínas relacionadas con la proliferación/supervivencia.

La *quercetina* a altas dosis (50-100 $\mu\text{mol/L}$) induce la apoptosis en las células HepG2 a través de la activación de la ruta intrínseca (caspasas-9 y -3) y el desequilibrio en los niveles de las proteínas de la familia Bcl-2 pro- (Bcl-x_s, Bax) y anti-apoptóticas (Bcl-x_L). Este proceso de muerte celular se acompaña de la inhibición de las señales clave de las vías de proliferación/supervivencia (PI3K/AKT y ERKs).

La apoptosis inducida por la *quercetina* (50 $\mu\text{mol/L}$) en la línea celular HepG2 implica la inhibición temprana de varias señales estrechamente relacionadas con la proliferación y supervivencia celular (PI3K/AKT, PKC α y NF- κ B), y aumenta la translocación hacia el núcleo y posterior proteólisis de PKC δ . Posteriormente, activa de manera sostenida a JNKs y p38 e inhibe las ERKs, siendo clave la activación de la ruta de señalización AP-1/JNK para el efecto de este flavonoide en la inducción de la muerte celular y la modulación de las vías PI3K/AKT, ERKs y NF- κ B.

2. La *epicatequina* no induce apoptosis en las células HepG2, sino que mejora su tolerancia celular intrínseca frente al estrés oxidativo al disminuir la generación de ROS y activar a las proteínas clave de las vías de señalización relacionadas con los procesos de proliferación/supervivencia (PI3K/AKT y ERKs).

El efecto de supervivencia de la *epicatequina* (10 $\mu\text{mol/L}$) en las células HepG2 implica la activación temprana y sostenida de las señales clave para la supervivencia celular (PI3K/AKT, ERKs y PKC α) y la acumulación de PKC δ en el citosol, además de la activación sostenida de AP-1 y transitoria de NF- κ B y Nrf2. La modulación de estos dos últimos factores de transcripción se relaciona con la generación de ROS y señales clave de las vías de proliferación/supervivencia. De manera que la regulación de Nrf2 depende de la vía PI3K/AKT y de las ERKs, mientras que la activación de NF- κ B sólo se relaciona con las ERKs.

CONCLUSIONES GENERALES

El *ácido clorogénico* mejora la tolerancia celular intrínseca frente al estrés oxidativo de las células HepG2 a través de la disminución de la generación de ROS y del aumento del potencial antioxidante de la célula (GSH).

3. La ingesta de una dieta rica en cacao atenúa parcialmente el daño hepático causado por el agente hepatocarcinogénico dietil-*N*-nitrosamina. El cacao no previene el daño necrótico inducido por el tóxico, pero parece inhibir la proliferación postnecrótica de los hepatocitos (p-AKT), estimular los sistemas de defensa antioxidante (GSH, GPx, catalasa) y detoxificante (GST), y disminuir la muerte por apoptosis mediante la activación de las ERKs y la inhibición de caspasa-3 y JNKs.

Los polifenoles, en dosis fisiológicas, parecen capaces de mejorar la tolerancia celular intrínseca frente al estrés oxidativo mediante el aumento del potencial antioxidante y la modulación de señales relacionadas con la proliferación/supervivencia en cultivos celulares y en animales de experimentación. Sin embargo, a dosis suprafisiológicas, los compuestos fenólicos parecen capaces de inducir la muerte celular programada a través de la activación de señales implicadas en el proceso de apoptosis y la inhibición de proteínas asociadas con la proliferación/supervivencia. Todo ello indica que las condiciones experimentales (concentraciones, condiciones de cultivo, duración del tratamiento, etc.) se han de considerar seriamente, ya que pueden determinar la actividad biológica de estos compuestos naturales, lo que muestra la dificultad para predecir su efecto y la necesidad de entender sus mecanismos de acción molecular en cada contexto.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Bravo, L.** Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333 (1998).
2. **Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C. & Jimenez, L.** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 287-306 (2005).
3. **Nijveldt, R. J. et al.** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* **74**, 418-425 (2001).
4. **Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. & Jimenez, L.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727-747 (2004).
5. **Hertog, M. G.,L., Hollman, P. C.,H. & Katan, M.,B.** Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2379-2383 (1992).
6. **Arts, I. C., van de Putte, B. & Hollman, P. C.** Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1746-1751 (2000).
7. **Reinli, K. & Block, G.** Phytoestrogen content of foods--a compendium of literature values. *Nutr. Cancer* **26**, 123-148 (1996).
8. **Radtke, J., Linseisen, J. & Wolfram, G.** Phenolic acid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food consumption survey. *Z. Ernährungswiss.* **37**, 190-197 (1998).
9. **Department of Agriculture, U. S.** USDA database for the flavonoid content of selected foods. **2009** (2003).
10. **Leuzzi, U., Caristi, C., Panzera, V. & Licandro, G.** Flavonoids in pigmented orange juice and second-pressure extracts. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5501-5506 (2000).
11. **Mazza, G., Cacace, J. E. & Kay, C. D.** Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids. *J. AOAC Int.* **87**, 129-145 (2004).
12. **Rasmussen, S. E., Frederiksen, H., Struntze Krogholm, K. & Poulsen, L.** Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 159-174 (2005).
13. **de Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C. & Rivas-Gonzalo, J. C.** Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5331-5337 (2000).
14. **Cabrini, L. et al.** Antioxidants and total peroxy radical-trapping ability of olive and seed oils. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 6026-6032 (2001).
15. **Clifford, M. N.** Chlorogenic acids and other cinnamates. Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food. Agric.* **80**, 1033-1043 (2000).
16. **Covas, M. I. et al.** Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans. *Drugs Exp. Clin. Res.* **29**, 203-206 (2003).
17. **Clifford, M. N.** Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Med.* **70**, 1103-1114 (2004).
18. **Kimira, M., Arai, Y., Shimoi, K. & Watanabe, S.** Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods. *J. Epidemiol.* **8**, 168-175 (1998).

BIBLIOGRAFÍA

19. **Kuhnau, J.** The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* **24**, 117-191 (1976).
20. **Sampson, L., Rimm, E., Hollman, P. C., de Vries, J. H. & Katan, M. B.** Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J. Am. Diet. Assoc.* **102**, 1414-1420 (2002).
21. **Justesen, U., Knuthsen, P. & Leth, T.** Determination of plant polyphenols in Danish foodstuffs by HPLC-UV and LC-MS detection. *Cancer Lett.* **114**, 165-167 (1997).
22. **Hertog, M. G., Hollman, P. C., Katan, M. B. & Kromhout, D.** Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr. Cancer* **20**, 21-29 (1993).
23. **Knekt, P. et al.** Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 560-568 (2002).
24. **Saura-Calixto, F., Serrano, J. & Goñi, I.** Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem.* **101**, 492-501 (2007).
25. **Srinivasan, V. S.** Bioavailability of nutrients: a practical approach to in vitro demonstration of the availability of nutrients in multivitamin-mineral combination products. *J. Nutr.* **131**, 1349S-50S (2001).
26. **Crespy, V. et al.** Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 618-621 (2002).
27. **Piskula, M. K., Yamakoshi, J. & Iwai, Y.** Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett.* **447**, 287-291 (1999).
28. **Talavera, S. et al.** Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *J. Nutr.* **133**, 4178-4182 (2003).
29. **Lafay, S. et al.** Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. *J. Nutr.* **136**, 1192-1197 (2006).
30. **Lee, M. J. et al.** Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **4**, 393-399 (1995).
31. **Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F. & Scaccini, C.** Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5735-5741 (2002).
32. **Olthof, M. R., Hollman, P. C., Vree, T. B. & Katan, M. B.** Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *J. Nutr.* **130**, 1200-1203 (2000).
33. **Olthof, M. R., Hollman, P. C., Buijsman, M. N., van Amelsvoort, J. M. & Katan, M. B.** Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J. Nutr.* **133**, 1806-1814 (2003).
34. **Manach, C. et al.** Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J. Nutr.* **125**, 1911-1922 (1995).
35. **Day, A. J. & Williamson, G.** Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *Br. J. Nutr.* **86 Suppl 1**, S105-10 (2001).
36. **Natsume, M. et al.** Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 840-849 (2003).

37. **Bieger, J. et al.** Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *J. Nutr.* **138**, 1417-1420 (2008).
38. **Graf, B. A. et al.** Rat gastrointestinal tissues metabolize quercetin. *J. Nutr.* **136**, 39-44 (2006).
39. **Kim, S. et al.** Plasma and tissue levels of tea catechins in rats and mice during chronic consumption of green tea polyphenols. *Nutr. Cancer* **37**, 41-48 (2000).
40. **Hong, S. J., Kim, S. I., Kwon, S. M., Lee, J. R. & Chung, B. C.** Comparative study of concentration of isoflavones and lignans in plasma and prostatic tissues of normal control and benign prostatic hyperplasia. *Yonsei Med. J.* **43**, 236-241 (2002).
41. **van het Hof, K. H., Wiseman, S. A., Yang, C. S. & Tijburg, L. B.** Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **220**, 203-209 (1999).
42. **Aziz, A. A., Edwards, C. A., Lean, M. E. & Crozier, A.** Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O-beta-glucoside and isorhamnetin-4'-O-beta-glucoside by human volunteers after the consumption of onions. *Free Radic. Res.* **29**, 257-269 (1998).
43. **Henning, S. M. et al.** Tea polyphenols and theaflavins are present in prostate tissue of humans and mice after green and black tea consumption. *J. Nutr.* **136**, 1839-1843 (2006).
44. **Garcea, G. et al.** Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **14**, 120-125 (2005).
45. **Maubach, J. et al.** Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Analyt Technol. Biomed. Life. Sci.* **784**, 137-144 (2003).
46. **Boyle, P. & Lavin, B.** World cancer report. (2008).
47. **Wong, C. M. & Ng, I. O.** Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* **28**, 160-174 (2008).
48. **Hanahan, D. & Weinberg, R. A.** The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
49. **Surh, Y. J.** Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer.* **3**, 768-780 (2003).
50. **Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**, 1-40 (2006).
51. **Ramos, S.** Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**, 507-526 (2008).
52. **Brigelius-Flohe, R. & Kipp, A.** Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* (2009).
53. **Hansen, R. et al.** GPX Pro198Leu and OGG1 Ser326Cys polymorphisms and risk of development of colorectal adenomas and colorectal cancer. *Cancer Lett.* **229**, 85-91 (2005).
54. **Ravn-Haren, G. et al.** Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis* **27**, 820-825 (2006).
55. **Arsova-Sarafinovska, Z. et al.** Glutathione peroxidase 1 (GPX1) genetic polymorphism, erythrocyte GPX activity, and prostate cancer risk. *Int. Urol. Nephrol.* **41**, 63-70 (2009).

BIBLIOGRAFÍA

56. Cascales Angosto, M. in *Estrés oxidativo. Envejecimiento y enfermedad.* (Ed Instituto de España) 47-90 (REALIGRAF, S.A., 1999).
57. Rawal, R. M. *et al.* Assessment of glutathione-S-transferase and glutathione reductase in patients with squamous-cell carcinoma of buccal mucosa. *Int. J. Cancer* **83**, 727-731 (1999).
58. McIlwain, C. C., Townsend, D. M. & Tew, K. D. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene* **25**, 1639-1648 (2006).
59. Patel, B. P., Rawal, U. M., Rawal, R. M., Shukla, S. N. & Patel, P. S. Tobacco, antioxidant enzymes, oxidative stress, and genetic susceptibility in oral cancer. *Am. J. Clin. Oncol.* **31**, 454-459 (2008).
60. Smith, C. M. *et al.* Inherited glutathione-S-transferase deficiency is a risk factor for pulmonary asbestosis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **3**, 471-477 (1994).
61. Knoll, N. *et al.* Genotoxicity of 4-hydroxy-2-nonenal in human colon tumor cells is associated with cellular levels of glutathione and the modulation of glutathione S-transferase A4 expression by butyrate. *Toxicol. Sci.* **86**, 27-35 (2005).
62. Abd El Hameed, A. H. *et al.* Genetic polymorphism of glutathione S-transferases M1 and T1 in Egyptian patients with bilharzial bladder cancer. *Urol. Oncol.* (2008).
63. Kiran, M., Chawla, Y. K. & Kaur, J. Glutathione-S-transferase and microsomal epoxide hydrolase polymorphism and viral-related hepatocellular carcinoma risk in India. *DNA Cell Biol.* **27**, 687-694 (2008).
64. Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C. & Giovannini, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* **16**, 577-586 (2005).
65. Pastore, A., Federici, G., Bertini, E. & Piemonte, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta* **333**, 19-39 (2003).
66. Scibior, D., Skrzycki, M., Podsiad, M. & Czczot, H. Glutathione level and glutathione-dependent enzyme activities in blood serum of patients with gastrointestinal tract tumors. *Clin. Biochem.* **41**, 852-858 (2008).
67. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257 (1972).
68. Ramos, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J. Nutr. Biochem.* **18**, 427-442 (2007).
69. MacFarlane, M. & Williams, A. C. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep.* **5**, 674-678 (2004).
70. Fischer, U., Janicke, R. U. & Schulze-Osthoff, K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* **10**, 76-100 (2003).
71. Shi, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell* **9**, 459-470 (2002).
72. Green, D. R. & Kroemer, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**, 626-629 (2004).
73. Cory, S., Huang, D. C. & Adams, J. M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* **22**, 8590-8607 (2003).

74. Scaffidi, C. *et al.* Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**, 1675-1687 (1998).
75. Smith, D. L., Nolden, L. K., Mills, G. B. & Lu, Y. in *Apoptosis, senescence and cancer*. 313-334 (Eds Gewirtz, D. A., Holt, S. E. & Grant, S., Humana Press, New Jersey, 2007).
76. Nicholson, K. M. & Anderson, N. G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell. Signal.* **14**, 381-395 (2002).
77. Cantley, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655-1657 (2002).
78. Stambolic, V. *et al.* Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **95**, 29-39 (1998).
79. Dijkers, P. F., Medema, R. H., Lammers, J. W., Koenderman, L. & Coffey, P. J. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr. Biol.* **10**, 1201-1204 (2000).
80. Romashkova, J. A. & Makarov, S. S. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* **401**, 86-90 (1999).
81. Reddy, K. B., Nabha, S. M. & Atanaskova, N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* **22**, 395-403 (2003).
82. Wada, T. & Penninger, J. M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* **23**, 2838-2849 (2004).
83. Ballif, B. A. & Blenis, J. Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ.* **12**, 397-408 (2001).
84. Fabregat, I., Roncero, C. & Fernandez, M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int.* **27**, 155-162 (2007).
85. Overall, C. M. & Lopez-Otin, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat. Rev. Cancer.* **2**, 657-672 (2002).
86. Lee, H. J. *et al.* Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **203**, 124-131 (2005).
87. Karin, M. & Gallagher, E. From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life* **57**, 283-295 (2005).
88. Czaja, M. J. The future of GI and liver research: editorial perspectives. III. JNK/AP-1 regulation of hepatocyte death. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **284**, G875-9 (2003).
89. Liu, J. & Lin, A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res.* **15**, 36-42 (2005).
90. Karin, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **270**, 16483-16486 (1995).
91. Yu, C. *et al.* JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol. Cell* **13**, 329-340 (2004).
92. Kyriakis, J. M. & Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* **81**, 807-869 (2001).

BIBLIOGRAFÍA

93. **Porras, A. et al.** p38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol. Biol. Cell* **15**, 922-933 (2004).
94. **Nebreda, A. R. & Porras, A.** p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 257-260 (2000).
95. **Bragado, P., Armesilla, A., Silva, A. & Porras, A.** Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis* **12**, 1733-1742 (2007).
96. **Ali, A. S., Ali, S., El-Rayes, B. F., Philip, P. A. & Sarkar, F. H.** Exploitation of protein kinase C: a useful target for cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.* **35**, 1-8 (2009).
97. **Jiffar, T. et al.** PKC alpha mediates chemoresistance in acute lymphoblastic leukemia through effects on Bcl2 phosphorylation. *Leukemia* **18**, 505-512 (2004).
98. **Zhang, X. M., Chen, J., Xia, Y. G. & Xu, Q.** Apoptosis of murine melanoma B16-BL6 cells induced by quercetin targeting mitochondria, inhibiting expression of PKC-alpha and translocating PKC-delta. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **55**, 251-262 (2005).
99. **Reyland, M. E.** Protein kinase C delta and apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1001-1004 (2007).
100. **Cerda, S. R. et al.** Protein kinase C delta inhibits Caco-2 cell proliferation by selective changes in cell cycle and cell death regulators. *Oncogene* **25**, 3123-3138 (2006).
101. **Wert, M. M. & Palfrey, H. C.** Divergence in the anti-apoptotic signalling pathways used by nerve growth factor and basic fibroblast growth factor (bFGF) in PC12 cells: rescue by bFGF involves protein kinase C delta. *Biochem. J.* **352 Pt 1**, 175-182 (2000).
102. **Shaulian, E. & Karin, M.** AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* **4**, E131-6 (2002).
103. **Gopalakrishnan, A. & Tony Kong, A. N.** Anticarcinogenesis by dietary phytochemicals: cytoprotection by Nrf2 in normal cells and cytotoxicity by modulation of transcription factors NF-kappa B and AP-1 in abnormal cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 1257-1270 (2008).
104. **Osburn, W. O. & Kensler, T. W.** Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat. Res.* **659**, 31-39 (2008).
105. **Lau, A., Villeneuve, N. F., Sun, Z., Wong, P. K. & Zhang, D. D.** Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol. Res.* **58**, 262-270 (2008).
106. **Karin, M. & Lin, A.** NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* **3**, 221-227 (2002).
107. **Naugler, W. E. & Karin, M.** NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**, 19-26 (2008).
108. **Chen, L. F. & Greene, W. C.** Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 392-401 (2004).
109. **Hess, J., Angel, P. & Schorpp-Kistner, M.** AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J. Cell. Sci.* **117**, 5965-5973 (2004).
110. **Guller, M. et al.** c-Fos overexpression increases the proliferation of human hepatocytes by stabilizing nuclear Cyclin D1. *World J. Gastroenterol.* **14**, 6339-6346 (2008).
111. **Behrens, A. et al.** Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. *EMBO J.* **21**, 1782-1790 (2002).

112. **Bos, T. J.**, Bohmann, D., Tsuchie, H., Tjian, R. & Vogt, P. K. v-jun encodes a nuclear protein with enhancer binding properties of AP-1. *Cell* **52**, 705-712 (1988).
113. **Lee, J. S.** & Surh, Y. J. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett.* **224**, 171-184 (2005).
114. **Dinkova-Kostova, A. T.** & Talalay, P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol. Nutr. Food Res.* **52 Suppl 1**, S128-38 (2008).
115. **Egglar, A. L.**, Gay, K. A. & Mesecar, A. D. Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: induction of cytoprotective enzymes by Nrf2. *Mol. Nutr. Food Res.* **52 Suppl 1**, S84-94 (2008).
116. **Zhang, D. D.** Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab. Rev.* **38**, 769-789 (2006).
117. **Ikeda, H.**, Nishi, S. & Sakai, M. Transcription factor Nrf2/MafK regulates rat placental glutathione S-transferase gene during hepatocarcinogenesis. *Biochem. J.* **380**, 515-521 (2004).
118. **Padmanabhan, B.** *et al.* Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol. Cell* **21**, 689-700 (2006).
119. **Nioi, P.** & Nguyen, T. A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 816-821 (2007).
120. **Wang, X. J.** *et al.* Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* **29**, 1235-1243 (2008).
121. **Fabregat, I.** Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World J. Gastroenterol.* **15**, 513-520 (2009).
122. **Peng, S. Y.** *et al.* High alpha-fetoprotein level correlates with high stage, early recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma: significance of hepatitis virus infection, age, p53 and beta-catenin mutations. *Int. J. Cancer* **112**, 44-50 (2004).
123. **Taniguchi, K.** *et al.* Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene* **21**, 4863-4871 (2002).
124. **Hsia, C. C.**, Di Bisceglie, A. M., Kleiner, D. E., Jr, Farshid, M. & Tabor, E. RB tumor suppressor gene expression in hepatocellular carcinomas from patients infected with the hepatitis B virus. *J. Med. Virol.* **44**, 67-73 (1994).
125. **Horie, Y.** *et al.* Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J. Clin. Invest.* **113**, 1774-1783 (2004).
126. **Nakanishi, K.**, Sakamoto, M., Yamasaki, S., Todo, S. & Hirohashi, S. Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer* **103**, 307-312 (2005).
127. **Yoshida, T.** *et al.* Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors. *Oncogene* **25**, 6056-6066 (2006).
128. **Sun, B.** & Karin, M. NF-kappaB signaling, liver disease and hepatoprotective agents. *Oncogene* **27**, 6228-6244 (2008).
129. **Eferl, R.** *et al.* Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell* **112**, 181-192 (2003).

BIBLIOGRAFÍA

130. Tasevska, N. *et al.* A prospective study of meat, cooking methods, meat mutagens, heme iron, and lung cancer risks. *Am. J. Clin. Nutr.* **89**(6), 1884-94 (2009).
131. Mucci, L. A. & Wilson, K. M. Acrylamide intake through diet and human cancer risk. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 6013-6019 (2008).
132. Brown, J. L. N-Nitrosamines. *Occup. Med.* **14**, 839-848 (1999).
133. Kim, M. K., Kim, J. H., Nam, S. J., Ryu, S. & Kong, G. Dietary intake of soy protein and tofu in association with breast cancer risk based on a case-control study. *Nutr. Cancer* **60**, 568-576 (2008).
134. Yang, G. *et al.* Prospective cohort study of soy food intake and colorectal cancer risk in women. *Am. J. Clin. Nutr.* **89**, 577-583 (2009).
135. Cui, Y. *et al.* Dietary flavonoid intake and lung cancer-a population-based case-control study. *Cancer* **112**, 2241-2248 (2008).
136. Yang, C. S., Lambert, J. D., Ju, J., Lu, G. & Sang, S. Tea and cancer prevention: molecular mechanisms and human relevance. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **224**, 265-273 (2007).
137. Lambert, J. D., Hong, J., Yang, G. Y., Liao, J. & Yang, C. S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 284S-291S (2005).
138. Hsieh, C. Y., Santell, R. C., Haslam, S. Z. & Helferich, W. G. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **58**, 3833-3838 (1998).
139. Nagasawa, H., Yasuda, M., Sakamoto, S. & Inatomi, H. Suppression by coffee cherry of the growth of spontaneous mammary tumours in SHN mice. *Anticancer Res.* **16**, 151-153 (1996).
140. Miura, Y., Ono, K., Okauchi, R. & Yagasaki, K. Inhibitory effect of coffee on hepatoma proliferation and invasion in culture and on tumor growth, metastasis and abnormal lipoprotein profiles in hepatoma-bearing rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **50**, 38-44 (2004).
141. Tanaka, T. *et al.* Inhibitory effects of chlorogenic acid, reserpine, polyphenolic acid (E-5166), or coffee on hepatocarcinogenesis in rats and hamsters. *Basic Life Sci.* **52**, 429-440 (1990).
142. Vasquez-Garzon, V. R., Arellanes-Robledo, J., Garcia-Roman, R., Aparicio-Rautista, D. I. & Villa-Trevino, S. Inhibition of reactive oxygen species and pre-neoplastic lesions by quercetin through an antioxidant defense mechanism. *Free Radic. Res.* **43**, 128-137 (2009).
143. Alia, M. *et al.* Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur. J. Nutr.* **45**, 19-28 (2006).
144. Alia, M. *et al.* Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **212**, 110-118 (2006).
145. Murakami, C., Hirakawa, Y., Inui, H., Nakano, Y. & Yoshida, H. Effects of epigallocatechin 3-O-gallate on cellular antioxidative system in HepG2 cells. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **48**, 89-94 (2002).
146. Choi, Y. J. *et al.* Polyphenolic flavonoids differ in their antiapoptotic efficacy in hydrogen peroxide-treated human vascular endothelial cells. *J. Nutr.* **133**, 985-991 (2003).
147. Koshy, L., Dwarakanath, B. S., Raj, H. G., Chandra, R. & Mathew, T. L. Suicidal oxidative stress induced by certain antioxidants. *Indian. J. Exp. Biol.* **41**, 1273-1278 (2003).

148. **Yang, G. Y. et al.** Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H(2)O(2) production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. *Carcinogenesis* **21**, 2035-2039 (2000).
149. **Nakazato, T., Ito, K., Ikeda, Y. & Kizaki, M.** Green tea component, catechin, induces apoptosis of human malignant B cells via production of reactive oxygen species. *Clin. Cancer Res.* **11**, 6040-6049 (2005).
150. **Schwarz, D. & Roots, I.** In vitro assessment of inhibition by natural polyphenols of metabolic activation of procarcinogens by human CYP1A1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**, 902-907 (2003).
151. **Veeriah, S. et al.** Apple polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicological defence and stress response in human colon adenoma cells. *Int. J. Cancer* **122**, 2647-2655 (2008).
152. **Feng, R. et al.** Inhibition of activator protein-1, NF-kappaB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *J. Biol. Chem.* **280**, 27888-27895 (2005).
153. **Jang, M. et al.** Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**, 218-220 (1997).
154. **Patel, R. & Maru, G.** Polymeric black tea polyphenols induce phase II enzymes via Nrf2 in mouse liver and lungs. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 1897-1911 (2008).
155. **Tanigawa, S., Fujii, M. & Hou, D. X.** Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 1690-1703 (2007).
156. **Cavin, C. et al.** Induction of Nrf2-mediated cellular defenses and alteration of phase I activities as mechanisms of chemoprotective effects of coffee in the liver. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 1239-1248 (2008).
157. **Balasubramanian, S., Efimova, T. & Eckert, R. L.** Green tea polyphenol stimulates a Ras, MEKK1, MEK3, and p38 cascade to increase activator protein 1 factor-dependent involucrin gene expression in normal human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **277**, 1828-1836 (2002).
158. **Yu, R. et al.** Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling pathways in the regulation of antioxidant-responsive element-mediated phase II enzyme gene expression. *Carcinogenesis* **18**, 451-456 (1997).
159. **Nguyen, T. T. et al.** The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis* **25**, 647-659 (2004).
160. **Spencer, J. P., Rice-Evans, C. & Williams, R. J.** Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability. *J. Biol. Chem.* **278**, 34783-34793 (2003).
161. **Hayakawa, S. et al.** Apoptosis induction by epigallocatechin gallate involves its binding to Fas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 1102-1106 (2001).
162. **Nishikawa, T. et al.** A green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma, possibly through inhibition of Bcl-2 family proteins. *J. Hepatol.* **44**, 1074-1082 (2006).
163. **Babich, H., Krupka, M. E., Nissim, H. A. & Zuckerbraun, H. L.** Differential in vitro cytotoxicity of (-)-epicatechin gallate (ECG) to cancer and normal cells from the human oral cavity. *Toxicol. In Vitro.* **19**, 231-242 (2005).

164. **Manna, S.**, Banerjee, S., Mukherjee, S., Das, S. & Panda, C. K. Epigallocatechin gallate induced apoptosis in Sarcoma180 cells in vivo: mediated by p53 pathway and inhibition in U1B, U4-U6 UsnRNAs expression. *Apoptosis* **11**, 2267-2276 (2006).
165. **Hastak, K.**, Agarwal, M. K., Mukhtar, H. & Agarwal, M. L. Ablation of either p21 or Bax prevents p53-dependent apoptosis induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *FASEB J.* **19**, 789-791 (2005).
166. **Kalra, N. et al.** Theaflavins induced apoptosis of LNCaP cells is mediated through induction of p53, down-regulation of NF-kappa B and mitogen-activated protein kinases pathways. *Life Sci.* **80**, 2137-2146 (2007).
167. **Wu, Q. K.**, Koponen, J. M., Mykkanen, H. M. & Torronen, A. R. Berry phenolic extracts modulate the expression of p21(WAF1) and Bax but not Bcl-2 in HT-29 colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 1156-1163 (2007).
168. **Larrosa, M.**, Tomas-Barberan, F. A. & Espin, J. C. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J. Nutr. Biochem.* **17**, 611-625 (2006).
169. **Sasaki, M. et al.** Quercetin-induced PC12 cell death accompanied by caspase-mediated DNA fragmentation. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 682-686 (2007).
170. **Mouria, M. et al.** Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. *Int. J. Cancer* **98**, 761-769 (2002).
171. **Mertens-Talcott, S. U. & Percival, S. S.** Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Lett.* **218**, 141-151 (2005).
172. **Rashmi, R.**, Santhosh Kumar, T. R. & Karunakaran, D. Human colon cancer cells differ in their sensitivity to curcumin-induced apoptosis and heat shock protects them by inhibiting the release of apoptosis-inducing factor and caspases. *FEBS Lett.* **538**, 19-24 (2003).
173. **Shishodia, S.**, Amin, H. M., Lai, R. & Aggarwal, B. B. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochem. Pharmacol.* **70**, 700-713 (2005).
174. **Selvendiran, K. et al.** Luteolin promotes degradation in signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatoma cells: an implication for the antitumor potential of flavonoids. *Cancer Res.* **66**, 4826-4834 (2006).
175. **Hsu, C. L.**, Huang, S. L. & Yen, G. C. Inhibitory effect of phenolic acids on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes in relation to their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4191-4197 (2006).
176. **Ahn, H. Y. et al.** Epigallocatechin-3 gallate selectively inhibits the PDGF-BB-induced intracellular signaling transduction pathway in vascular smooth muscle cells and inhibits transformation of sis-transfected NIH 3T3 fibroblasts and human glioblastoma cells (A172). *Mol. Biol. Cell* **10**, 1093-1104 (1999).
177. **Pianetti, S.**, Guo, S., Kavanagh, K. T. & Sonenshein, G. E. Green tea polyphenol epigallocatechin-3 gallate inhibits Her-2/neu signaling, proliferation, and transformed phenotype of breast cancer cells. *Cancer Res.* **62**, 652-655 (2002).
178. **Siddiqui, I. A.**, Adhami, V. M., Afaq, F., Ahmad, N. & Mukhtar, H. Modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B- and mitogen-activated protein kinase-pathways by tea polyphenols in human prostate cancer cells. *J. Cell. Biochem.* **91**, 232-242 (2004).

179. **Gosse, F. et al.** Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **26**, 1291-1295 (2005).
180. **Mandel, S. A. et al.** Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway. *Neurosignals* **14**, 46-60 (2005).
181. **Frey, R. S. & Singletary, K. W.** Genistein activates p38 mitogen-activated protein kinase, inactivates ERK1/ERK2 and decreases Cdc25C expression in immortalized human mammary epithelial cells. *J. Nutr.* **133**, 226-231 (2003).
182. **Feng, R. et al.** Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **282**, 13468-13476 (2007).
183. **Nam, S., Smith, D. M. & Dou, Q. P.** Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **276**, 13322-13330 (2001).
184. **Yang, F. et al.** The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor-kappa B activation by inhibiting I kappa B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Mol. Pharmacol.* **60**, 528-533 (2001).
185. **Gong, L., Li, Y., Nedeljkovic-Kurepa, A. & Sarkar, F. H.** Inactivation of NF-kappaB by genistein is mediated via Akt signaling pathway in breast cancer cells. *Oncogene* **22**, 4702-4709 (2003).
186. **Sen, P., Chakraborty, P. K. & Raha, S.** Tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate impedes the anti-apoptotic effects of low-grade repetitive stress through inhibition of Akt and NFkappaB survival pathways. *FEBS Lett.* **580**, 278-284 (2006).
187. **Xia, J., Song, X., Bi, Z., Chu, W. & Wan, Y.** UV-induced NF-kappaB activation and expression of IL-6 is attenuated by (-)-epigallocatechin-3-gallate in cultured human keratinocytes in vitro. *Int. J. Mol. Med.* **16**, 943-950 (2005).
188. **Mackenzie, G. G. et al.** Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappaB activation at multiple steps in Jurkat T cells. *FASEB J.* **18**, 167-169 (2004).
189. **Pantuck, A. J. et al.** Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**, 4018-4026 (2006).
190. **Pisters, K. M. et al.** Phase I trial of oral green tea extract in adult patients with solid tumors. *J. Clin. Oncol.* **19**, 1830-1838 (2001).
191. **Laurie, S. A., Miller, V. A., Grant, S. C., Kris, M. G. & Ng, K. K.** Phase I study of green tea extract in patients with advanced lung cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **55**, 33-38 (2005).
192. **Jatoi, A. et al.** A phase II trial of green tea in the treatment of patients with androgen independent metastatic prostate carcinoma. *Cancer* **97**, 1442-1446 (2003).
193. **Luo, H. et al.** Phase IIa chemoprevention trial of green tea polyphenols in high-risk individuals of liver cancer: modulation of urinary excretion of green tea polyphenols and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Carcinogenesis* **27**, 262-268 (2006).
194. **Sharma, R. A. et al.** Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **7**, 1894-1900 (2001).
195. **Alia, M.** Efecto protector de polifenoles de la dieta frente a estrés oxidativo en cultivos celulares y animales de experimentación. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain (2004).

BIBLIOGRAFÍA

196. **Ramos, S., Alia, M., Bravo, L. & Goya, L.** Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1271-1280 (2005).
197. **Williamson, G. & Manach, C.** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 243S-255S (2005).
198. **Justino, G. C. et al.** Plasma quercetin metabolites: structure-antioxidant activity relationships. *Arch. Biochem. Biophys.* **432**, 109-121 (2004).
199. **Tapiero, H., Tew, K. D., Ba, G. N. & Mathe, G.** Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed. Pharmacother.* **56**, 200-207 (2002).
200. **Bischoff, S. C.** Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **11**, 733-740 (2008).
201. **IARC.** International Agency for Research on Cancer. Summaries and evaluations. Quercetin (group 3). **73**, 497 (1999).
202. **Harwood, M. et al.** A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 2179-2205 (2007).
203. **Michels, K. B. et al.** Fruit and vegetable consumption and colorectal adenomas in the Nurses' Health Study. *Cancer Res.* **66**, 3942-3953 (2006).
204. **Feskanich, D. et al.** Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1812-1823 (2000).
205. **Devipriya, S., Ganapathy, V. & Shyamaladevi, C. S.** Suppression of tumor growth and invasion in 9,10 dimethyl benz(a) anthracene induced mammary carcinoma by the plant bioflavonoid quercetin. *Chem. Biol. Interact.* **162**, 106-113 (2006).
206. **Sanchez-Perez, Y. et al.** Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.* **217**, 25-32 (2005).
207. **Gee, J. M., Hara, H. & Johnson, I. T.** Suppression of intestinal crypt cell proliferation and aberrant crypt foci by dietary quercetin in rats. *Nutr. Cancer* **43**, 193-201 (2002).
208. **Barth, S. W. et al.** Cloudy apple juice is more effective than apple polyphenols and an apple juice derived cloud fraction in a rat model of colon carcinogenesis. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 1181-1187 (2007).
209. **Dolara, P. et al.** Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutat. Res.* **591**, 237-246 (2005).
210. **Choi, E. J., Bae, S. M. & Ahn, W. S.** Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Arch. Pharm. Res.* **31**, 1281-1285 (2008).
211. **MHLW.** List of existing food additives. Ministry of Health Labour, and Welfare. (1996).
212. **Braganhof, E. et al.** Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anticancer Drugs* **17**, 663-671 (2006).
213. **Haghiac, M. & Walle, T.** Quercetin induces necrosis and apoptosis in SCC-9 oral cancer cells. *Nutr. Cancer* **53**, 220-231 (2005).

214. **Aalinkel, R. et al.** The dietary bioflavonoid, quercetin, selectively induces apoptosis of prostate cancer cells by down-regulating the expression of heat shock protein 90. *Prostate* **68**, 1773-1789 (2008).
215. **Lee, D. H., Szczepanski, M. & Lee, Y. J.** Role of Bax in quercetin-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 2345-2355 (2008).
216. **Watjen, W. et al.** Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *J. Nutr.* **135**, 525-531 (2005).
217. **Kim, Y. H., Lee, D. H., Jeong, J. H., Guo, Z. S. & Lee, Y. J.** Quercetin augments TRAIL-induced apoptotic death: involvement of the ERK signal transduction pathway. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 1946-1958 (2008).
218. **Gulati, N., Laudet, B., Zohrabian, V. M., Murali, R. & Jhanwar-Uniyal, M.** The antiproliferative effect of Quercetin in cancer cells is mediated via inhibition of the PI3K-Akt/PKB pathway. *Anticancer Res.* **26**, 1177-1181 (2006).
219. **Kim, Y. H. & Lee, Y. J.** TRAIL apoptosis is enhanced by quercetin through Akt dephosphorylation. *J. Cell. Biochem.* **100**, 998-1009 (2007).
220. **Kim, E. J., Choi, C. H., Park, J. Y., Kang, S. K. & Kim, Y. K.** Underlying mechanism of quercetin-induced cell death in human glioma cells. *Neurochem. Res.* **33**, 971-979 (2008).
221. **Son, Y. O. et al.** Quercetin accelerates TNF-alpha-induced apoptosis of MC3T3-E1 osteoblastic cells through caspase-dependent and JNK-mediated pathways. *Eur. J. Pharmacol.* **579**, 26-33 (2008).
222. **Ishikawa, Y. & Kitamura, M.** Anti-apoptotic effect of quercetin: intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways. *Kidney Int.* **58**, 1078-1087 (2000).
223. **Min, Y. D. et al.** Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. *Inflamm. Res.* **56**, 210-215 (2007).
224. **Lee, K. W. et al.** Raf and MEK protein kinases are direct molecular targets for the chemopreventive effect of quercetin, a major flavonol in red wine. *Cancer Res.* **68**, 946-955 (2008).
225. **Cardoso, S. M., Pereira, C. & Oliveira, R.** Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 3-13 (1999).
226. **Herrera, B. et al.** Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes. *FASEB J.* **15**, 741-751 (2001).
227. **Dorta, D. J. et al.** Antioxidant activity of flavonoids in isolated mitochondria. *Phytother. Res.* **22**, 1213-1218 (2008).
228. **Tsang, T. Y. et al.** Downregulation of hepatoma-derived growth factor activates the Bad-mediated apoptotic pathway in human cancer cells. *Apoptosis* **13**, 1135-1147 (2008).
229. **Zhao, Y. et al.** Distinctive regulation and function of PI 3K/Akt and MAPKs in doxorubicin-induced apoptosis of human lung adenocarcinoma cells. *J. Cell. Biochem.* **91**, 621-632 (2004).
230. **Gamet-Payraastre, L. et al.** Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen. Pharmacol.* **32**, 279-286 (1999).
231. **Mitsui, H. et al.** The MEK1-ERK map kinase pathway and the PI 3-kinase-Akt pathway independently mediate anti-apoptotic signals in HepG2 liver cancer cells. *Int. J. Cancer* **92**, 55-62 (2001).

232. **García-Mediavilla, V. et al.** The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur. J. Pharmacol.* **557**, 221-229 (2007).
233. **Kuhn, D. J., Burns, A. C., Kazi, A. & Dou, Q. P.** Direct inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway by ester bond-containing green tea polyphenols is associated with increased expression of sterol regulatory element-binding protein 2 and LDL receptor. *Biochim. Biophys. Acta* **1682**, 1-10 (2004).
234. **Kisselev, A. F. et al.** The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites. *J. Biol. Chem.* **278**, 35869-35877 (2003).
235. **Nam, S., Smith, D. M. & Dou, Q. P.** Tannic acid potently inhibits tumor cell proteasome activity, increases p27 and Bax expression, and induces G1 arrest and apoptosis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **10**, 1083-1088 (2001).
236. **Jeong, W. S., Kim, I. W., Hu, R. & Kong, A. N.** Modulation of AP-1 by natural chemopreventive compounds in human colon HT-29 cancer cell line. *Pharm. Res.* **21**, 649-660 (2004).
237. **Lee, J. C., Kim, J., Park, J. K., Chung, G. H. & Jang, Y. S.** The antioxidant, rather than prooxidant, activities of quercetin on normal cells: quercetin protects mouse thymocytes from glucose oxidase-mediated apoptosis. *Exp. Cell Res.* **291**, 386-397 (2003).
238. **Jones, B. E. & Czaja, M. J. III.** Intracellular signaling in response to toxic liver injury. *Am. J. Physiol.* **275**, G874-8 (1998).
239. **Levrresse, V., Butterfield, L., Zentrich, E. & Heasley, L. E.** Akt negatively regulates the cJun N-terminal kinase pathway in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* **62**, 799-808 (2000).
240. **Pavlica, S. & Gebhardt, R.** Protective effects of ellagic and chlorogenic acids against oxidative stress in PC12 cells. *Free Radic. Res.* **39**, 1377-1390 (2005).
241. **Bonita, J. S., Mandarano, M., Shuta, D. & Vinson, J.** Coffee and cardiovascular disease: in vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacol. Res.* **55**, 187-198 (2007).
242. **van Dam, R. M.** Coffee consumption and the decreased risk of diabetes mellitus type 2. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* **150**, 1821-1825 (2006).
243. **Zheng, L. F., Dai, F., Zhou, B., Yang, L. & Liu, Z. L.** Prooxidant activity of hydroxycinnamic acids on DNA damage in the presence of Cu(II) ions: mechanism and structure-activity relationship. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 149-156 (2008).
244. **Huang, S. M., Chuang, H. C., Wu, C. H. & Yen, G. C.** Cytoprotective effects of phenolic acids on methylglyoxal-induced apoptosis in Neuro-2A cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**, 940-949 (2008).
245. **Ito, H., Sun, X. L., Watanabe, M., Okamoto, M. & Hatano, T.** Chlorogenic acid and its metabolite m-coumaric acid evoke neurite outgrowth in hippocampal neuronal cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 885-888 (2008).
246. **Das, M., Bickers, D. R. & Mukhtar, H.** Plant phenols as in vitro inhibitors of glutathione S-transferase(s). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**, 427-433 (1984).
247. **Yip, E. C., Chan, A. S., Pang, H., Tam, Y. K. & Wong, Y. H.** Protocatechuic acid induces cell death in HepG2 hepatocellular carcinoma cells through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Cell Biol. Toxicol.* **22**, 293-302 (2006).

248. **Tanaka, K. et al.** Inverse association between coffee drinking and the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in Japan. *Cancer. Sci.* **98**, 214-218 (2007).
249. **Je, Y., Liu, W. & Giovannucci, E.** Coffee consumption and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Int. J. Cancer* **124**, 1662-1668 (2009).
250. **McCann, S. E., Yeh, M., Rodabaugh, K. & Moysich, K. B.** Higher regular coffee and tea consumption is associated with reduced endometrial cancer risk. *Int. J. Cancer* **124**, 1650-1653 (2009).
251. **Naganuma, T. et al.** Coffee consumption and the risk of oral, pharyngeal, and esophageal cancers in Japan: the Miyagi Cohort Study. *Am. J. Epidemiol.* **168**, 1425-1432 (2008).
252. **Cho, E. S. et al.** Attenuation of oxidative neuronal cell death by coffee phenolic phytochemicals. *Mutat. Res.* **661**, 18-24 (2009).
253. **Jin, U. H. et al.** A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sci.* **77**, 2760-2769 (2005).
254. **Szaefer, H., Kaczmarek, J., Rybczynska, M. & Baer-Dubowska, W.** The effect of plant phenols on the expression and activity of phorbol ester-induced PKC in mouse epidermis. *Toxicology* **230**, 1-10 (2007).
255. **Ramiro-Puig, E. et al.** Neuroprotective effect of cocoa flavonoids on in vitro oxidative stress. *Eur. J. Nutr.* **48**, 54-61 (2009).
256. **Banach, M. S., Dong, Q. & O'Brien, P. J.** Hepatocyte cytotoxicity induced by hydroperoxide (oxidative stress model) or glyoxal (carbonylation model): prevention by bioactive nut extracts or catechins. *Chem. Biol. Interact.* **178**, 324-331 (2009).
257. **Crespy, V. & Williamson, G.** A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. *J. Nutr.* **134**, 3431S-3440S (2004).
258. **Du, Y. & Lou, H.** Catechin and proanthocyanidin B4 from grape seeds prevent doxorubicin-induced toxicity in cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **591**, 96-101 (2008).
259. **Azam, S., Hadi, N., Khan, N. U. & Hadi, S. M.** Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicol. In. Vitro.* **18**, 555-561 (2004).
260. **Delgado, M. E., Haza, A. I., Arranz, N., Garcia, A. & Morales, P.** Dietary polyphenols protect against N-nitrosamines and benzo(a)pyrene-induced DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in HepG2 human hepatoma cells. *Eur. J. Nutr.* **47**, 479-490 (2008).
261. **Chen, L., Yang, X., Jiao, H. & Zhao, B.** Tea catechins protect against lead-induced cytotoxicity, lipid peroxidation, and membrane fluidity in HepG2 cells. *Toxicol. Sci.* **69**, 149-156 (2002).
262. **Chung, L. Y. et al.** Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells. *Life Sci.* **68**, 1207-1214 (2001).
263. **Spencer, J. P. et al.** Epicatechin and its in vivo metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation. *Biochem. J.* **354**, 493-500 (2001).
264. **Tan, X. et al.** Differences of four catechins in cell cycle arrest and induction of apoptosis in LoVo cells. *Cancer Lett.* **158**, 1-6 (2000).

265. **Schroeder, P. et al.** Epicatechin selectively prevents nitration but not oxidation reactions of peroxynitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 782-787 (2001).
266. **Schroeter, H. et al.** (-)Epicatechin stimulates ERK-dependent cyclic AMP response element activity and up-regulates GluR2 in cortical neurons. *J. Neurochem.* **101**, 1596-1606 (2007).
267. **Won, S. M., Park, Y. H., Kim, H. J., Park, K. M. & Lee, W. J.** Catechins inhibit angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation via mitogen-activated protein kinase pathway. *Exp. Mol. Med.* **38**, 525-534 (2006).
268. **Mackenzie, G. G. & Oteiza, P. I.** Modulation of transcription factor NF-kappaB in Hodgkin's lymphoma cell lines: effect of (-)-epicatechin. *Free Radic. Res.* **40**, 1086-1094 (2006).
269. **Chung, J. Y., Huang, C., Meng, X., Dong, Z. & Yang, C. S.** Inhibition of activator protein 1 activity and cell growth by purified green tea and black tea polyphenols in H-ras-transformed cells: structure-activity relationship and mechanisms involved. *Cancer Res.* **59**, 4610-4617 (1999).
270. **Dong, Z., Ma, W., Huang, C. & Yang, C. S.** Inhibition of tumor promoter-induced activator protein 1 activation and cell transformation by tea polyphenols, (-)-epigallocatechin gallate, and theaflavins. *Cancer Res.* **57**, 4414-4419 (1997).
271. **Shimizu, M. et al.** (-)-Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **11**, 2735-2746 (2005).
272. **Bahia, P. K., Rattray, M. & Williams, R. J.** Dietary flavonoid (-)-epicatechin stimulates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent anti-oxidant response element activity and up-regulates glutathione in cortical astrocytes. *J. Neurochem.* **106**, 2194-2204 (2008).
273. **Mayr, G. W., Windhorst, S. & Hillemeier, K.** Antiproliferative plant and synthetic polyphenolics are specific inhibitors of vertebrate inositol-1,4,5-trisphosphate 3-kinases and inositol polyphosphate multikinase. *J. Biol. Chem.* **280**, 13229-13240 (2005).
274. **Steele, V. E. et al.** Comparative chemopreventive mechanisms of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by in vitro bioassays. *Carcinogenesis* **21**, 63-67 (2000).
275. **Ho, H. Y., Wei, T. T., Cheng, M. L. & Chiu, D. T.** Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate protects cells against peroxynitrite-induced cytotoxicity: modulatory effect of cellular G6PD status. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 1638-1645 (2006).
276. **Gloire, G., Dejardin, E. & Piette, J.** Extending the nuclear roles of IkappaB kinase subunits. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1081-1089 (2006).
277. **Schwabe, R. F. & Sakurai, H.** IKKbeta phosphorylates p65 at S468 in transactivation domain 2. *FASEB J.* **19**, 1758-1760 (2005).
278. **Aguilera, C., Hoya-Arias, R., Haegeman, G., Espinosa, L. & Bigas, A.** Recruitment of IkappaBalpha to the hes1 promoter is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 16537-16542 (2004).
279. **Gloire, G., Legrand-Poels, S. & Piette, J.** NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1493-1505 (2006).
280. **Hwang, Y. P. & Jeong, H. G.** The coffee diterpene kahweol induces heme oxygenase-1 via the PI3K and p38/Nrf2 pathway to protect human dopaminergic neurons from 6-hydroxydopamine-derived oxidative stress. *FEBS Lett.* **582**, 2655-2662 (2008).

281. **Beyer, T. A. et al.** Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance. *EMBO J.* **27**, 212-223 (2008).
282. **Grant, D. M.** Detoxification pathways in the liver. *J. Inherit. Metab. Dis.* **14**, 421-430 (1991).
283. **Tessitore, L. & Bollito, E.** Early induction of TGF-beta1 through a fasting-re-feeding regimen promotes liver carcinogenesis by a sub-initiating dose of diethylnitrosamine. *Cell Prolif.* **39**, 105-116 (2006).
284. **Chuang, S. E., Cheng, A. L., Lin, J. K. & Kuo, M. L.** Inhibition by curcumin of diethylnitrosamine-induced hepatic hyperplasia, inflammation, cellular gene products and cell-cycle-related proteins in rats. *Food Chem. Toxicol.* **38**, 991-995 (2000).
285. **Sreepriya, M. & Bali, G.** Effects of administration of Embelin and Curcumin on lipid peroxidation, hepatic glutathione antioxidant defense and hematopoietic system during N-nitrosodiethylamine/Phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in Wistar rats. *Mol. Cell. Biochem.* **284**, 49-55 (2006).
286. **Sivaramakrishnan, V., Shilpa, P. N., Praveen Kumar, V. R. & Niranjali Devaraj, S.** Attenuation of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinogenesis by a novel flavonol-Morin. *Chem. Biol. Interact.* **171**, 79-88 (2008).
287. **Kang, J. S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Gonzalez, F. J. & Fukushima, S.** Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo. *Cancer Res.* **67**, 11141-11146 (2007).
288. **Jaeschke, H.** Redox considerations in hepatic injury and inflammation. *Antioxid. Redox Signal.* **4**, 699-700 (2002).
289. **Lamuela-Raventos, R. M., Romero-Pérez, A. I., Andrés-Lacueva, C. & Tornero, A.** Health effects of cocoa flavonoids. *Food Sci Technol Int.* **11**, 159-176 (2005).
290. **Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J. & Lee, C. Y.** Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7292-7295 (2003).
291. **Martin, M. A. et al.** Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 7765-7772 (2008).
292. **Martin, M. A. et al.** Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *J. Nutr. Biochem.* (2009).
293. **Ramos, S. et al.** Hypolipidemic effect in cholesterol-fed rats of a soluble fiber-rich product obtained from cocoa husks. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 6985-6993 (2008).
294. **Holley, S. L. et al.** Differential effects of glutathione S-transferase pi (GSTP1) haplotypes on cell proliferation and apoptosis. *Carcinogenesis* **28**, 2268-2273 (2007).
295. **Cascales, M.** in *Mecanismos de hepatotoxicidad.* (Ed. Instituto de España) Madrid, Spain, (2001).
296. **Amin, I., Koh, B. K. & Asmah, R.** Effect of cacao liquor extract on tumor marker enzymes during chemical hepatocarcinogenesis in rats. *J. Med. Food* **7**, 7-12 (2004).
297. **Yamagishi, M. et al.** Chemoprevention of lung carcinogenesis by cacao liquor proanthocyanidins in a male rat multi-organ carcinogenesis model. *Cancer Lett.* **191**, 49-57 (2003).
298. **Yamagishi, M. et al.** Effects of cacao liquor proanthocyanidins on PhIP-induced mutagenesis in vitro, and in vivo mammary and pancreatic tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett.* **185**, 123-130 (2002).

BIBLIOGRAFÍA

299. **Lecumberri, E. et al.** A diet rich in dietary fiber from cocoa improves lipid profile and reduces malondialdehyde in hypercholesterolemic rats. *Nutrition* **23**, 332-341 (2007).
300. **Sundaresan, S. & Subramanian, P.** Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis by S-allylcysteine. *Mol. Cell. Biochem.* **310**, 209-214 (2008).
301. **Bantel, H. et al.** Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury. *Hepatology* **40**, 1078-1087 (2004).
302. **Huynh, H. et al.** Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterol.* **3**, 19 (2003).
303. **Ozben, T.** Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J. Pharm. Sci.* **96**, 2181-2196 (2007).
304. **Golden, E. B. et al.** Green tea polyphenols block the anticancer effects of bortezomib and other boronic acid-based proteasome inhibitors. *Blood* (2009).
305. **Ferraresi, R. et al.** Essential requirement of reduced glutathione (GSH) for the anti-oxidant effect of the flavonoid quercetin. *Free Radic. Res.* **39**, 1249-1258 (2005).
306. **Hwang, J. T., Ha, J. & Park, O. J.** Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**, 433-440 (2005).
307. **Ramos, A. M. & Aller, P.** Quercetin decreases intracellular GSH content and potentiates the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide in human leukemia cell lines. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 1912-1923 (2008).
308. **Elattar, T. M. & Virji, A. S.** The inhibitory effect of curcumin, genistein, quercetin and cisplatin on the growth of oral cancer cells in vitro. *Anticancer Res.* **20**, 1733-1738 (2000).
309. **van der Woude, H. et al.** Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. *Cancer Lett.* **200**, 41-47 (2003).
310. **Nair, H. K. et al.** Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**, 63-69 (2004).
311. **Chung, J. H. et al.** Dual mechanisms of green tea extract (EGCG)-induced cell survival in human epidermal keratinocytes. *FASEB J.* **17**, 1913-1915 (2003).
312. **Kalfon, L., Youdim, M. B. & Mandel, S. A.** Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate promotes the rapid protein kinase C- and proteasome-mediated degradation of Bad: implications for neuroprotection. *J. Neurochem.* **100**, 992-1002 (2007).
313. **Gopalakrishnan, A. et al.** Modulation of activator protein-1 (AP-1) and MAPK pathway by flavonoids in human prostate cancer PC3 cells. *Arch. Pharm. Res.* **29**, 633-644 (2006).
314. **Andreadi, C. K., Howells, L. M., Atherfold, P. A. & Manson, M. M.** Involvement of Nrf2, p38, B-Raf, and nuclear factor-kappaB, but not phosphatidylinositol 3-kinase, in induction of hemeoxygenase-1 by dietary polyphenols. *Mol. Pharmacol.* **69**, 1033-1040 (2006).
315. **Na, H. K. et al.** (-)-Epigallocatechin gallate induces Nrf2-mediated antioxidant enzyme expression via activation of PI3K and ERK in human mammary epithelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **476**, 171-177 (2008).

316. **Hsieh, T. C., Lu, X., Wang, Z. & Wu, J. M.** Induction of quinone reductase NQO1 by resveratrol in human K562 cells involves the antioxidant response element ARE and is accompanied by nuclear translocation of transcription factor Nrf2. *Med. Chem.* **2**, 275-285 (2006).

