

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**POLIFENOLES DEL VINO TINTO INHIBEN LA  
PROLIFERACIÓN, E INDUCEN APOPTOSIS EN CÉLULAS  
DE CÁNCER DE PRÓSTATA LNCaP**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Ignacio Romero Cagigal**

**Madrid, 2002**

**ISBN: 84-669-2110-9**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**POLIFENOLES DEL VINO TINTO INHIBEN LA  
PROLIFERACIÓN, E INDUCEN APOPTOSIS EN  
CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA LNCaP**

TESIS DOCTORAL

**Ignacio Romero Cagigal**

Madrid, 2002

# ÍNDICE

---

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1-39
1. CÁNCER DE PRÓSTATA. PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA.....	3-4
2. ENVEJECIMIENTO POBLACIONAL Y CÁNCER DE PRÓSTATA....	5-6
3. HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.....	7-9
4. ETIOPATOGENIA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.....	10-18
4.1. Cáncer familiar.....	10-11
4.2. Hermanos gemelos.....	11
4.3. Cáncer hereditario.....	11
4.4. Alteraciones genéticas.....	12-14
4.4.1. Pérdida de heterocigidad.....	12
4.4.2. Gen HPC1.....	13
4.4.3. Repetición de CAG.....	13-14
4.5. Receptor de la vitamina D.....	14
4.6. Niveles de Ig F1 (Inmunoglobulina F1).....	15
4.7. Raza.....	15
4.8. Hormonas.....	16
4.9. Factores virales.....	16-17
4.10. Actividad sexual.....	17

4.11.	Radiaciones.....	17
4.12.	Sol.....	17-18
4.13.	Trabajo en granjas.....	18
4.14.	Dieta.....	18
5.	<b>CONTROL DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.....</b>	<b>19-20</b>
6.	<b>DIETA Y CÁNCER DE PRÓSTATA.....</b>	<b>21-33</b>
6.1	Diferencias geográficas dietéticas e incidencia CP.....	21
6.2.	Aspectos nutricionales y cáncer de próstata.....	21-33
6.2.1.	Grasa.....	22
6.2.2.	Licopeno.....	22-23
6.2.3.	Zanahoria y carotenóides.....	23-24
6.2.4.	Vitamina E.....	24-25
6.2.5.	Vitamina D .....	25-26
6.2.6.	Selenio.....	26
6.2.7.	Fitoestrógenos.....	27-31
6.2.7.1.	Arroz.....	29-30
6.2.7.2.	Soja.....	30-31
6.2.7.3.	Cereales.....	31
6.2.7.4.	Té verde.....	31

7.	DIETA MEDITERRÁNEA Y CÁNCER DE PRÓSTATA.....	32
8.	PROLIFERACIÓN CELULAR.....	33-35
9.	APOPTOSIS.....	36-39
<b>II.</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>40-42</b>
•	HIPÓTESIS.....	41
•	OBJETIVOS.....	42
	A.- OBJETIVOS PRINCIPALES.....	42
	B.- OBJETIVO SECUNDARIO.....	42
<b>III.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>43-81</b>
1.	ÁMBITO DEL ESTUDIO.....	44-48
1.1.	Elección de la línea celular más apropiada.....	44
1.2.	Proceso de descongelación.....	44-45
1.3.	Siembra celular.....	45-46
1.4.	Mantenimiento de las células en cultivo.....	46-47
1.5.	Consideraciones especiales.....	47-48

2. NUTRIENTES.....	49-52
3. ESTABLECIMIENTO DE “NUESTRAS CONDICIONES” DE INVESTIGACIÓN.....	53-65
3.1. Protocolo para establecer las condiciones de experimentación.....	54-55
3.2. Controles.....	56
3.3. Cálculo de las dosis.....	56-65
4. PROLIFERACIÓN CELULAR.....	66-67
5. APOPTOSIS.....	68-70
6. DISEÑO Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	71-81
6.1 El análisis de la varianza para un único factor.....	71-78
6.1.1 Comparaciones post hoc.....	71-72
6.1.2 Asunciones de anova.....	72-78
6.5.3.1 Efecto de las violaciones de las asunciones.....	77-78
6.2 Justificación para la elección de los test estadísticos.....	79-81

<b>IV. RESULTADOS</b> .....	82-108
A.- PROLIFERACIÓN.....	83-98
B.- APOPTOSIS.....	99-108
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	109-143
1. ASPECTOS GENERALES.....	110
2. QUIMIOPREVENCIÓN.....	111-122
2.1. El vino.....	116-122
3. CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS.....	123-132
3.1. Línea celular a estudio.....	123
3.2. Elección de nutrientes.....	123-132
3.3. Determinación de la proliferación.....	131
3.4. Determinación de la apoptosis.....	131-132
4. RESULTADOS DE PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS, EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PRÓSTATA.....	133-138
4.1. PROLIFERACIÓN.....	133-137
4.2. APOPTOSIS.....	137-138

5. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	139-143
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>144-146</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>147-176</b>

## ABREVIATURAS

- AC.....Anticuerpo
- ADN.....Ácido desoxirribonucléico
  
- BdrU.....Bromo-deoxi-uridina
  
- C.....Centígrado
- CAG.....Citosina, adenina, guanina
- cc.....centímetro cúbico
- cm<sup>2</sup>.....centímetro cuadrado
- cols.....Colaboradores
- CP.....Cáncer de próstata
  
- DHT.....Dihidrotestosterona
- DMSO.....Dimetilsulfóxido
  
- EF.....Factor de enriquecimiento
- EDTA.....Etilen-diamin-tetraacético
- EEUU.....Estados Unidos
  
- FCS.....Suero fetal bovino o suero fetal de ternero
- Fig.....Figura
  
- g.....Gramo

- h.....Horas
- HBP.....Hipertrofia benigna de próstata
  
- Ig F1.....Inmunoglobulina F1
- Ig F2.....Inmunoglobulina F2
  
- Kcal.....Kilocalorías
- KS.....Kolmogorov-Smirnov
  
- L.....Litro
- LDL.....Lipoproteínas de baja densidad
  
- M.....Mitosis
- mg.....Milígramo
- min.....Minuto
- mJ.....Milijulio
- ml.....Mililitro
- mM.....Milimolar
- MO.....Microscopía óptica
- µg.....Microgramo
- µM.....Micromolar
  
- nm.....Nanómetro
  
- p e.....Por ejemplo
- PIN.....Neoplasia intraepitelial prostática
- POD.....Peroxidasa
- PSA.....Antígeno Prostático Específico

- rpm.....Revoluciones por minuto
- RPMI.....Roswell Park Memorial Institute
  
- SC.....Suma de los cuadrados
- SD.....Desviación estándar
- sol.....Solución
  
- TA.....Temperatura ambiente
  
- U.....Unidades
- U.A.....Unidades de Absorbancia

## TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Esperanza de vida de los varones con relación a la edad .....	6
Tabla 2: Diferencias entre necrosis y apoptosis.....	37
Tabla 3: Ejemplo de cálculo de ANOVA.....	74
Tabla 4: Comparaciones post hoc o a posteriori.....	76
Tabla 5: Kolmogorov-Smirnov aplicado a los datos de proliferación.....	80
Tabla 6: Kolmogorov-Smirnov aplicado a los datos de apoptosis.....	81
Tabla 7: Resultados de proliferación a las 24 h.....	84
Tabla 8: Resultados de proliferación a las 48 h.....	85
Tabla 9: Resultados de proliferación a las 72 h.....	86
Tabla 10: Resultados de proliferación a las 96 h.....	87
Tabla 11: Resultados de apoptosis a 24 h.....	100
Tabla 12: Resultados de apoptosis a 48 h.....	101
Tabla 13: Resultados de apoptosis a 72 h.....	102
Tabla 14: Agentes quimiopreventivos y su mecanismo de acción .....	113
Tabla 15: Compuestos fenólicos en el vino tinto y blanco.....	121

Fig. 1: Representación del ciclo celular.....	34
Fig. 2: Vías de activación de la apoptosis.....	39
Fig. 3: Formulación química de la quercetina.....	50
Fig. 4: Formulación química de la rutina.....	50
Fig. 5: Formulación química de la morina.....	51
Fig. 6: Formulación química del ácido gálico.....	51
Fig. 7: Formulación química del ácido tánico.....	52
Fig. 8: Experimento prueba 2H BrdU 45' y 5 % FCS.....	61
Fig. 9: Experimento prueba 2H BrdU 90' y 5 % FCS.....	62
Fig. 10: Experimento prueba 2H BrdU 45' y 10 % FCS.....	63
Fig. 11: Experimento prueba 2H BrdU 90' y 10 % FCS.....	64
Fig. 12: Determinación de la proliferación celular.....	67
Fig. 13: Determinación de la apoptosis.....	70
Fig. 14: Inhibición de la proliferación celular con rutina y morina 25 $\mu$ M, quercetina y ácidos tánico y gálico 1 $\mu$ M.....	88
Fig. 15: Inhibición de la proliferación celular con rutina y morina 50 $\mu$ M, quercetina y ácidos tánico y gálico 5 $\mu$ M.....	89
Fig. 16: Inhibición de la proliferación celular con rutina y morina 75 $\mu$ M, quercetina y ácidos tánico y gálico 10 $\mu$ M.....	90
Fig. 17: Inhibición de la proliferación celular por quercetina.....	91
Fig. 18: Inhibición de la proliferación celular por morina.....	92
Fig. 19: Inhibición de la proliferación celular por ácido gálico.....	93

Fig. 20: Inhibición de la proliferación celular por ácido tánico.....	94
Fig. 21: Inhibición de la proliferación celular por rutina.....	95
Fig. 22: Inhibición proliferación por A. tánico a las 24h (MO 20x).....	96
Fig. 23: Inhibición proliferación por A. tánico a las 48h (MO 20x).....	97
Fig. 24: Inhibición proliferación por A. tánico a las 72h (MO 20x).....	98
Fig. 25: ANOVA de inducción apoptótica a 24 horas.....	103
Fig. 26: ANOVA de inducción apoptótica a 48 horas.....	104
Fig. 27: ANOVA de inducción apoptótica a 72 horas.....	105
Fig. 28: Apoptosis a las 24 h. con A. gálico 10 $\mu$ M (MO 20x).....	106
Fig. 29: Apoptosis a las 48 h. con A. gálico 10 $\mu$ M (MO 20x).....	107
Fig. 30: Apoptosis a las 72 h. con A. gálico 10 $\mu$ M (MO 20x).....	108

# INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las patologías más frecuentes hoy en día. En ella se produce daño en el ADN y, alteración del código genético. Las cuatro características que definen las células cancerosas son: pérdida de la regulación del crecimiento, inmortalización, inducción de angiogénesis y capacidad para metastatizar [1].

A pesar del descenso en la incidencia y mortalidad por cáncer desde el comienzo de los años 90, la American Cancer Society estima que en Estados Unidos se habrán diagnosticado durante el año 2001 un total de 1.268.000 nuevos cánceres, causando 553.400 muertes [2].

Tanto la hipertrofia benigna de próstata (HBP) como el cáncer de próstata (CP), son patologías que se desarrollan clínicamente, en la mayoría de los pacientes, a partir de los 50 años de edad. La prevalencia de ambas patologías en la población de edad y, dado que la expectativa de vida se está incrementando de forma significativa en las últimas décadas, sugiere que dichas patologías van a llegar a ser todavía un problema de salud mucho más importante en este milenio, haciendo necesarias por tanto, medidas preventivas [3].

## **1. EL CÁNCER DE PRÓSTATA. PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA**

El cáncer más frecuentemente diagnosticado entre varones en Estados Unidos es el de próstata, y es la segunda causa de muerte por cáncer en dicho país [4].

Se ha estimado que, más de un millón de varones americanos vivos en este momento y mayores de 50 años, fallecerán eventualmente de CP, a no ser que se desarrollen nuevos tratamientos para el control de esta enfermedad [5].

En algunos países occidentales ha llegado a ser, hoy en día, la primera causa de muerte por cáncer.

En el año 2000 en Estados Unidos se estima que han sido diagnosticados 170.000 nuevos casos de CP, y que se han producido 31.000 muertes por este cáncer [7].

Si definimos la prevalencia del CP como los pacientes con cáncer vivos 5 años después del diagnóstico, se estiman en 1.014.000 los pacientes con CP en el mundo que requieren tratamiento médico. De

estos, 896.000 casos se originarán en países desarrollados y 118.000 en países en vías de desarrollo [8].

Aunque la incidencia es considerablemente inferior en el mundo no desarrollado, su incremento también es sustancial [9].

En 1990, se estimó que, en los doce miembros de la Comunidad Europea, aparecerían 85.000 nuevos casos de CP, siendo esta la segunda causa de cáncer en hombres después del de pulmón [10].

En España, los datos existentes sobre la incidencia y prevalencia son limitados, y presentan cifras notablemente inferiores a las de los grupos americanos. Siendo la incidencia de 22,2 por 100.000 habitantes / año [11].

En Getafe (Área Sanitaria número 10 de Madrid) la incidencia es de 20 / 100.000 habitantes / año.

Con nuestros conocimientos actuales y sin mejores tratamientos, y con la perspectiva remota de poder modificar el estilo de vida, existirá probablemente en los próximos años un incremento en el número de muertes por CP en todo el mundo [12].

## **2. ENVEJECIMIENTO POBLACIONAL Y CÁNCER DE PRÓSTATA**

La expectativa de vida se ha incrementado sustancialmente a lo largo del último siglo XX. Al comienzo de siglo pasado sólo el 25% de los americanos vivían hasta los 65 años de edad; actualmente, el 70% alcanzan esa edad, y el 30 % la octava década de la vida.

Hoy en día, en muchos países occidentales la expectativa de un niño al nacer se acerca a los 80 años [12].

Para el año 2020 se espera un incremento mayor del 200% de la población con más de 65 años de edad [13].

La esperanza de vida para los varones españoles con relación a su edad apenas se ha modificado entre 1990 y 1996, y la representamos en la tabla 1.

**Tabla 1**

<b>EDAD</b> (años)	<b>ESPERANZA DE VIDA de los varones españoles</b> (años de vida restantes)	
	<b>1990</b>	<b>1996</b>
50	27,3	28,1
55	23,1	23,8
60	19,2	19,8
65	15,5	16,1
70	12,2	12,6
75	9,3	9,6
80	6,9	7
85	5	5
90	3,5	3,4
95	2	2

**Tabla 1:** Tabla de Mortalidad del Instituto Nacional de Estadística en la que se representa la esperanza de vida en relación con la edad en los varones españoles en los años 1990 y 1996 [14].

### 3. HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

El inicio y desarrollo del CP se ve afectado por una serie de factores tanto endógenos como exógenos. Aunque la incidencia y la mortalidad varían de forma importante entre distintas poblaciones, la frecuencia del cáncer latente se distribuye de forma homogénea entre todas ellas. Este dato sugiere que existen factores externos que ejercen un efecto importante en la transformación de cáncer latente en una forma más agresiva y clínicamente significativa [15].

La mayoría de los CP tienen un periodo de latencia entre 10 y 20 años, proporcionando, por lo tanto, una importante oportunidad para el uso de medidas preventivas que puedan evitar su desarrollo [16].

El hecho de que hasta en un 8% de las resecciones transuretrales de próstata, aparezca un CP incidental, apoya el hecho de que existe un largo periodo de latencia para esta enfermedad [17].

Especialmente en la próstata, el PIN se desarrolla a lo largo de aproximadamente 20 años. La progresión de PIN a PIN de alto grado y/o a cáncer insignificante se desarrolla en más de 10 años, y el carcinoma clínicamente significativo tarda entre tres y quince años en desarrollarse [18].

Si embargo, no está claro el significado biológico de los tumores de próstata. Varios estudios establecen que el tiempo de progresión depende del grado, diferenciación y volumen de la lesión primaria. El tiempo medio de progresión para un tumor estadio T1a sería de 13,5 años, y de 4,75 años para un estadio T1b [19].

Además de la enfermedad clínicamente evidente, se han encontrado focos microscópicos de adenocarcinoma en autopsias de hombres que han fallecido por otras causas. La frecuencia de estos tumores latentes se incrementa con la edad. En la sexta década de la vida su incidencia oscila entre un 5.3% y 14%, alcanzando una incidencia de entre un 40% y 80% en personas con más de 90 años de edad [20].

Johanson y colaboradores estudiaron 223 pacientes con CP localizado dejándolos evolucionar libremente sin tratamiento, y añadiéndoles bloqueo hormonal sólo cuando progresaban. La supervivencia a los 10 años fue del 91% para los tumores bien diferenciados, del 85% para los moderadamente diferenciados, y del 71 % para los pobremente diferenciados [21].

Albertsen y colaboradores establecen diferencias significativas en mortalidad, según el grado de diferenciación tumoral. El riesgo de morir

de CP durante los 15 años siguientes al diagnóstico era del 4% al 7% para los pacientes con "Gleason score" de 2 a 4, entre un 6% y 11% para "Gleason score" de 5, 18% a 30% para "Gleason score" de 6, 42% a 70% para "Gleason score" de 7, y 60% a 87% para "Gleason score" de 8 a 10. [22].

Grömberg y colaboradores estudiaron a 6.890 varones con CP en todos los estadios, y compararon su supervivencia a los 10 años con la de un grupo de controles sanos. Se objetivó una reducción de la supervivencia del 45% en los pacientes con CP [23].

Demostrada por estos y otros estudios la lenta evolución del CP, sería de vital importancia actuar sobre factores etiopatogénicos que pudiesen evitar el desarrollo de la enfermedad.

## 4. ETIOPATOGENIA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Para una enfermedad que presenta actualmente más de un 15% de riesgo de afectar a los varones americanos a lo largo de su vida, es importante indagar, en los factores de riesgo conocidos, o que podrían estar implicados en la patogenia de la enfermedad.

### 4.1. CÁNCER FAMILIAR

El primer estudio importante en el que se sugiere que el CP puede ser considerado de alguna manera un cáncer familiar, fue realizado en el año 1960 con Mormones en la ciudad de Salt Lake (EEUU) [24].

Un estudio publicado por Steinberg en 1990, establece un incremento de riesgo de padecer CP en familias del 2.1 [25]. Estudios recientes en Suecia y Canadá, sitúan para personas de la misma familia este riesgo relativo en 1.7 [26,27].

El riesgo también depende del grado de parentesco. Un pariente de primer grado (padre o hermano) tiene un riesgo de 2, un pariente de segundo grado, de 1,7. Si una persona tuviera un pariente de primer grado y otro de segundo, el riesgo se incrementaría a 8,8 [25]. El riesgo

también se modifica por el número de miembros familiares afectados. En casos con un solo pariente de primer grado, el riesgo es de 2, con dos parientes se incrementa a 5, y con tres, a 11 [26].

#### 4.2. HERMANOS GEMELOS

La tasa de concordancia entre gemelos heterocigotos fue de 0.043 (comparable con el cáncer familiar), mientras que la tasa de concordancia entre gemelos homocigotos fue del 0.192, casi 5 veces mayor [26].

#### 4.3. CÁNCER HEREDITARIO

Investigadores del Hospital John Hopkins en Baltimore han establecido una distinción, separando lo que es el CP familiar (que aparece en algunos miembros de la familia), y el verdadero CP hereditario. Este último fenómeno se produce sólo en el 9% de todos los CP. Tiene una herencia mendeliana dominante con una alta penetrancia. El criterio para establecer "cáncer de próstata hereditario" es la afectación de más de 3 miembros de una misma familia, o que ocurra esto en tres generaciones, o que dos miembros de una familia hayan desarrollado la enfermedad antes de los 55 años de edad [28,29].

#### 4.4. ALTERACIONES GENÉTICAS

Se han realizado numerosos esfuerzos para identificar el gen que hace que una persona sea candidato potencial a desarrollar CP. Varios estudios han demostrado una alta tasa de CP cuando se presentan deleciones en el loci de los cromosomas 8 p, 10 pq, 16 q y 18 q [30]. Estudios recientes han demostrado una importante relación entre la progresión local del tumor, y la pérdida de partes del cromosoma 8 p [31].

##### 4.4.1. Pérdida de heterocigocidad

Los pacientes sometidos a prostatectomía radical en los cuales su tumor haya mantenido su locus LPL en el cromosoma 8 p, tienen un riesgo de progresión tumoral a los 3 años de solamente un 20%, comparado con un 75% de riesgo de progresión si existió pérdida del LPL [32]. En cánceres metastáticos se ha objetivado una pérdida de partes del cromosoma 16 q en el 70% de los casos, comparado con un 35% en los casos de tumores localizados [32].

#### **4.4.2. Gen HPC1**

Estudiando familias con CP hereditario, el grupo del John Hopkins, finalmente identificó una susceptibilidad mayor para el CP en el locus del cromosoma 1,24. A este locus se le llamó "gen 1 del CP humano" (HPC1), y estaba involucrado en el 30% de los CP hereditarios estudiados [33].

Este mismo grupo ha encontrado un segundo locus relacionado con el CP en el cromosoma X, llamándole HPCX [34]. Los hijos de los padres con este defecto genético no heredarán el riesgo, mientras que las hijas tienen un 100% de riesgo de ser portadoras, y el 50% de sus hijos heredarán el factor de riesgo.

#### **4.4.3. Repeticiones de CAG (citosina, adenina, guanina)**

El gen del receptor androgénico se localiza en el cromosoma X, es polimórfico y tiene una gran variabilidad de microsatélites trinucleótidos de repeticiones de CAG (citosina, adenina y guanina) en el exón 1. El número de repeticiones de CAG varía mucho entre la población, con un rango entre 8 y 31 [35].

En un estudio realizado por Ingles incluyendo 57 casos de CP y 169 controles, los hombres portadores de un receptor androgénico, con un alelo CAG con menos de 20 repeticiones, frente a un alelo con 20 repeticiones o más, tenían un riesgo relativo de 2,1 de padecer CP [36]. Estudios del grupo de Harvard aportan importantes evidencias, de que las repeticiones cortas de CAG en el receptor androgénico, irían asociadas a un grado más alto y a un estadio más avanzado al diagnóstico del CP, así como mayor frecuencia de metástasis y mortalidad [30].

#### 4.5. RECEPTOR DE LA VITAMINA D

Se ha demostrado que la forma activa de la vitamina D,  $1,25(\text{OH})^2\text{D}$ , causa efecto antiproliferativo en líneas celulares de CP [37]. En la misma línea, un alto nivel de  $1,25(\text{OH})^2\text{D}$  circulante en la sangre, disminuye el riesgo de padecer CP [38]. El receptor de la vitamina D es polimórfico. Los alelos largos de este receptor (con poly-A mayor a 18) se asocian a un mayor riesgo de CP, siendo este de 4,6 veces [36].

También se ha observado que en los Zaireños que emigran a Bélgica, los niveles de vitamina D en el suero se relacionan directamente con el tiempo que lleven en el país, descendiendo continuamente, y esto se asociaría a un mayor riesgo de padecer CP [39].

#### 4.6. NIVELES DE IGF1 (Inmunoglobulina F1)

En estudios caso-control se ha visto una importante relación entre los niveles de inmunoglobulina F en el suero y el riesgo para desarrollar CP. La IgF1 así como la IgF2, pueden estimular la producción de andrógenos adrenales por la vía del receptor IgF1. Esto probablemente sería una importante fuente de estimulación androgénica en pacientes que fracasarían tras una castración médica o quirúrgica [30].

#### 4.7. RAZA

La incidencia y tasas de mortalidad por CP son mucho mayores en países occidentales, si las comparamos con los países mediterráneos o asiáticos. Las tasas de mortalidad más altas se producen entre la población negra americana, siendo esta el doble que en la población blanca. La tasa de incidencia en la población negra de Atlanta (USA) es de 91,2 por 100.000 habitantes / año, en la población blanca de Atlanta (USA) de 53,4 por 100.000 habitantes / año. En Italia esta tasa es de 18,8 por 100.000 habitantes / año, y en Shangai (China) de 1,8 por 100.000 habitantes / año [40,41].

#### 4.8. HORMONAS

Existen estudios con resultados contradictorios sobre los niveles de testosterona en el suero, y la posibilidad de padecer CP. Sin embargo Ross y colaboradores encontraron en suero un nivel medio de testosterona total un 15% superior en varones de raza negra, en comparación con los de raza blanca, así como un nivel medio de testosterona libre un 13% superior, tras un análisis de ANOVA para el momento de la extracción, edad, peso, consumo de alcohol, tabaco, y uso de fármacos [42].

Estudios de autopsias demuestran que los pacientes con cirrosis hepática, presentan menor tasa de incidencia de CP si lo comparamos con controles con edades similares, probablemente por los menores niveles de testosterona y por el hiperestrogenismo en los alcohólicos como factor protector [43].

#### 4.9. FACTORES VIRALES

Se han establecido algunas relaciones entre infecciones virales y CP. Herbert y colaboradores encontraron anticuerpos contra el virus herpes en el 71% de los pacientes con CP, y en el 66% de los pacientes con HBP [44]. Viola y colaboradores encontraron una alta correlación entre un

anticuerpo monoclonal, que se cree que es específico para el oncogén celular H-*ras* de la proteína p21, con CP de alto grado [45].

#### 4.10. ACTIVIDAD SEXUAL

Numerosos estudios indican que los hombres más activos sexualmente presentan mayor probabilidad de desarrollar CP [30]. A favor de esta teoría estaría, el haber detectado valores mayores de testosterona en pacientes con CP, si lo comparamos con los controles [46].

#### 4.11. RADIACIONES

En trabajadores de centrales nucleares, se ha constatado un riesgo 2,36 veces mayor del esperado de desarrollar CP en comparación con controles [47]. Los principales agentes implicados fueron el cromo tritiado, hierro, cobalto y el zinc.

#### 4.12. SOL

Los habitantes de los países meridionales, se ven expuestos a más radiaciones solares y padecen, en general, menos CP. La explicación sería

por la activación solar de la vía de la vitamina D. La vitamina D<sub>3</sub> inhibe el crecimiento de líneas celulares de CP tanto in vitro como in vivo [48]. También se ha demostrado que la vitamina D<sub>3</sub> produce una diferenciación a un fenotipo menos maligno de líneas celulares de CP murino y, que la expresión del oncogen c-myc se inhibe por la misma [49,50].

#### 4.13. TRABAJO EN GRANJAS

Contra la teoría solar estaría el hecho de que los granjeros, presentan mayor incidencia de CP, a pesar de que este es menos frecuente en áreas rurales en relación con las urbanas [51]. Sin embargo, los granjeros evidentemente están expuestos a otros factores de riesgo en su trabajo, como herbicidas, pesticidas y fertilizantes [30]. En un estudio con 20.025 granjeros, se objetivó que los que trabajaban principalmente con pesticidas son los que tenían mayor riesgo de desarrollar CP, teniendo los más jóvenes un incremento del riesgo de 2,03 veces [52,53].

#### 4.14. DIETA

Numerosos factores dietéticos han sido implicados en el desarrollo del CP. En el punto 6 se va a desarrollar el influjo de estos factores en el desarrollo del CP.

## 5. CONTROL DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Hasta ahora existen dos posibilidades que pueden llevar a una disminución de la muerte por CP: reducir el riesgo de desarrollar esta enfermedad, y otra, diagnosticarla en estadios más precoces, en los cuales la terapia pudiera ser más eficaz.

Los ensayos para actuar contra el cáncer se pueden dividir en dos grandes grupos: ensayos de *tratamiento*, que utilizan quimioterapia, cirugía, radiaciones, terapia génica y hormonal, y ensayos de *prevención*, que utilizan métodos con cambios de estilo de vida, o tratamiento con micronutrientes, vitaminas u hormonas.

Los estudios de prevención contra el cáncer pueden dividirse en 3 grupos, dependiendo a que nivel de la carcinogénesis actúen: la prevención primaria actúa sobre la iniciación, la prevención secundaria sobre la promoción y la prevención terciaria a nivel pre-cáncer. [54].

A continuación desarrollamos brevemente cada uno de los grupos de estudio.

1. Los ensayos de prevención primaria, suelen realizarse con gran número de personas. Cuanto más al comienzo del proceso

neoplásico vayamos, más disminuiríamos el riesgo de desarrollar el tumor. Ejemplos de prevención primaria son las campañas para prevenir el consumo de tabaco entre adolescentes o el uso de protectores solares para prevenir los melanomas y, posiblemente, algunas modificaciones dietéticas.

2. La prevención secundaria trata de evitar factores promotores. Por ejemplo, campañas para dejar de fumar, cambios dietéticos o el uso de algún micronutriente.
3. La prevención terciaria estudia los posibles efectos sobre lesiones preneoplásicas como las leukoplakias en la boca, las displasias cervicales o los cánceres precoces de piel.

Un posible factor que podría contribuir al control del CP sería el "screening", especialmente con el uso del PSA. Sin embargo hay opiniones muy distanciadas en cuanto a su uso, entre los que defienden su uso de forma masiva y los que creen que nunca estaría justificado su uso [12]. En un estudio de "screening" sobre 2.576 varones realizado en el Hospital de Getafe entre Junio de 1993 y Junio de 1996, se llegó a la conclusión de que, dada la baja incidencia de CP en el área geográfica estudiada, y la morbilidad y costes asociados a la biopsia de próstata, no se puede recomendar el "screening" de masas con los métodos diagnósticos disponibles en la actualidad [55].

## **6. DIETA Y CÁNCER DE PRÓSTATA**

### **6.1. DIFERENCIAS GEOGRÁFICAS DIETÉTICAS E INCIDENCIA DEL CP.**

Las importantes diferencias en la incidencia de ciertos tipos de cáncer en diferentes países o regiones del mundo sugieren que algunos factores dietéticos pueden influir en el desarrollo del cáncer, bien jugando un papel activador o bien como inhibidores de la carcinogénesis [3]. El concepto de que pueden existir sustancias protectoras frente al CP se ha desarrollado en los últimos años.

La tasa de incidencia de CP en habitantes negros en USA es treinta veces mayor que la que se da en Osaka (Japón) y 120 veces mayor que la que se da en Shanghai (China) [41].

### **6.2. ASPECTOS NUTRICIONALES Y CÁNCER DE PRÓSTATA**

Diferentes aspectos de la dieta han sido implicados como agentes estimuladores o protectores contra el CP, existen numerosos trabajos sobre algunos componentes de la dieta y su efecto sobre el CP.

### **6.2.1. Grasa**

Numerosos estudios han establecido para los pacientes obesos, un riesgo relativo general de padecer CP del 1,25 [63]. Este riesgo relativo se eleva a 1,54 en los consumidores de grasa animal. Estos datos han sido extraídos de estudios que correlacionaban las tasas internacionales de mortalidad por CP, y el consumo per cápita de grasa [64].

Sin embargo otros estudios contradicen los datos previos. La grasa en la dieta no influiría en la incidencia de CP experimental, aunque sí la ingesta total de calorías. [65]. Esta conclusión es apoyada por Albanes en estudios con pacientes [66]. Los aceites vegetales, por el contrario, no parecen incrementar el riesgo de padecer CP, y los cereales tendrían incluso un papel protector [67].

### **6.2.2. Licopeno**

El licopeno es el carotenoide más prevalente en la dieta occidental, y el más abundante en el suero humano. Se encuentra fundamentalmente en los tomates y en sus derivados y tiene un importante poder antioxidante [68].

Aunque los tomates son la principal fuente de licopeno, en el estudio de "Auckland sobre Próstata", el consumo de tomates crudos no se asoció con reducción en el riesgo de CP. Sin embargo, muchos de los derivados del tomate, como la salsa de espaguetis, sopa de tomate, y salsa "Ketchup", son mejores fuentes de licopeno biodisponible que los tomates frescos [69].

En un estudio con 14.000 varones Adventistas del Séptimo día con alta ingesta de tomates y derivados en grandes cantidades, se observó una reducción en el riesgo de padecer CP en un 35%, y CP agresivo en un 53% [70]. En la actualidad se está realizando un estudio fase I, para tratar de comprender mejor el papel del licopeno como agente preventivo frente al CP auspiciado por el Instituto Nacional del Cáncer [71].

### **6.2.3. Zanahoria y carotenoides**

Los vegetales verde-amarillos (zanahorias, espinacas, lechuga verde y espárragos verdes) contienen más de 600 µg de caroteno/100 g.

En Japón se realizó un estudio de cohortes con 265.118 adultos mayores de 40 años, donde se investigó la relación entre estilo de vida y riesgo de enfermedades. En el mismo se objetivó que el consumo diario

de vegetales verde-amarillos protegía frente al cáncer de estomago y próstata, así como frente a la enfermedad isquémica cardiaca, arterioesclerosis y cirrosis hepática [72]. Varones que consumen importantes cantidades de zanahoria tienen un riesgo relativo de padecer CP de solo el 0.66 siendo este, por lo tanto, un factor protector [63]. Sin embargo, el caroteno tiene muy poca influencia sobre el CP con un riesgo relativo de 0.99, luego deben existir otros componentes en la zanahoria que actúen como factores protectores [30].

La luteína, que es un carotenoide, se encuentra en grandes cantidades en las verduras crucíferas y en las hojas verdes y podría estar relacionada con el CP. La ingestión de 2000  $\mu\text{g}$  o más de luteína asociada a zeaxantina tiene un efecto protector contra el CP, con una odds-ratio de 0,68, comparada con una ingesta inferior a 800  $\mu\text{g}$  [73].

#### **6.2.4. Vitamina E**

La vitamina agrupa a una serie de compuestos llamados tocoferoles y tocotrienoles. Habitualmente los suplementos de vitamina E se administran en forma de alfa-tocoferol [74].

La vitamina E tiene una potente actividad antioxidante, y también protege contra el cáncer estimulando funciones inmunitarias, disminuyendo la actividad de la proteína C kinasa (involucrada en la regulación de la proliferación celular) e induciendo apoptosis. También inhibe el crecimiento de varias líneas celulares de CP [75].

El estudio más convincente sobre el papel protector de la vitamina E contra el CP fue, el "Estudio de Prevención de Cáncer por alfa-tocoferol y beta-caroteno (ATBC)". En este estudio, fumadores finlandeses recibieron 50 mg de vitamina E y presentaron una reducción del 33% en incidencia de CP y una reducción del 41% en la mortalidad por dicha enfermedad [76].

#### **6.2.5. Vitamina D**

El papel fundamental de la vitamina D es actuar sobre el metabolismo óseo y mineral. Sin embargo, también se ha visto que metabolitos de la vitamina D inducen diferenciación y/o inhiben proliferación celular, entre otras de las células de CP [77].

Existen estudios que indican que la forma activa de la vitamina D, la 1,25 dihidroxicolecalciferol o calcitrol, a dosis bajas estimula el

crecimiento de células LNCaP, mientras que a dosis más altas ( $>10^{-9}$  mol / L) inhibe la carcinogénesis prostática [77,78].

#### **6.2.6. Selenio**

El selenio es un oligoelemento que se encuentra en cereales, carne y pescados. Existe gran variabilidad en cuanto al consumo de selenio en la dieta porque su disponibilidad depende, en gran medida, de su concentración en el suelo [79]. El selenio a diferentes dosis, tiene diferentes actividades anticarcinogénicas incluyendo protección antioxidante, metabolismo carcinogénico, estimulación inmunitaria y apoptosis [80].

Clark y colaboradores realizaron un estudio controlado y doble ciego con 1.312 pacientes con historia de carcinoma basal o escamoso de piel, a los cuales se les suministró 200  $\mu$ g de selenio o placebo durante una media de 4,5 años. En los pacientes que tomaron selenio, se objetivó una reducción en la tasa de CP del 66%, en comparación con los del grupo placebo [81].

### 6.2.7. Fitoestrógenos

Existe una importante diferencia en el consumo de fitoestrógenos (estrógenos de las plantas) entre la sociedad americana y la japonesa. Los principales grupos de estos compuestos son los lignanos, flavonoides e isoflavonoides, [30].

Muchos alimentos de origen vegetal, contienen importantes cantidades de estos elementos, y muchas plantas manifiestan cierto grado de actividad estrogénica. Los flavonoides se encuentran en importantes cantidades en muchas frutas, vegetales, cereales y vino [3].

Los fitoestrógenos tienen funciones muy diversas que podrían influir en su capacidad antitumoral:

- Actividad estrogénica:

Los lignanos de los mamíferos (enterolactona y enterodiol), los isoflavonoides (daizeína, genisteína, coumestrol y ecuol) y los flavonoides (apigerina, kaempferol y naringenina) poseen, todos ellos, una actividad estrogénica débil [83].

En los adultos jóvenes, aproximadamente el 98% de la testosterona plasmática se encuentra unida a la globulina para la unión de

hormonas sexuales (SHBG) y a otras proteínas de transporte. Sólo el 2 % está libre, y esta es la fracción biológicamente activa que difunde pasivamente a las células diana prostáticas. Un incremento en la concentración de SHBG reduciría la fracción de testosterona libre plasmática. Los vegetarianos, japoneses y chinos presentan niveles plasmáticos de SHBG más altos, y por tanto, menor concentración de testosterona libre que los occidentales con dieta libre [84,85].

- Inhibición de la 5 $\alpha$ -reductasa:

Los isoflavonoides y los lignanos inhiben la 5 $\alpha$ -reductasa y la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa. Los niveles de marcadores de la actividad 5 $\alpha$ -reductasa son menores en los hombres japoneses jóvenes que en sus homólogos occidentales [86].

- Inhibición de la aromatasa:

Dos tercios de los estrógenos en el varón se derivan de la conversión periférica de los esteroides c19 adrenales (dehidroepiandrosterona y androstendiona) por el sistema enzimático de la aromatasa, en el tejido muscular y adiposo. La enterolactona y los flavonoides, luteolina y kaempferol, disminuyeron la actividad de la aromatasa en preadipocitos humanos [87].

- Inhibición de las proteinkinatas tiroxina-específicas

Las tiroxina-kinasas son necesarias para el funcionamiento de numerosos receptores de factores de crecimiento. La fosforilización de la tiroxina desempeña un importante papel en la proliferación celular.

La genisteína ha demostrado ser un inhibidor específico de la actividad de la tiroxina-kinasa y, por tanto, bloquea receptores de factores de crecimiento.

- Inhibición de las topoisomerasas del ADN

Las topoisomerasas son enzimas que alteran la conformación del ADN, y son cruciales para la división celular [88].

La inhibición de las topoisomerasa es hoy en día un objetivo para el diseño de nuevas drogas anticancerígenas.

La genisteína es un potente inhibidor de estas enzimas. La quercetina, fisetina y morina también inhiben las ADN topoisomerasas I y II, mientras que el kaempferol sólo inhibe la ADN topoisomerasa II [89].

#### **6.2.7.1. Arroz**

El arroz, importante fuente de isoflavonoides, es un producto muy popular en el noreste de Finlandia, área conocida por la menor incidencia de CP de todo el país [90].

En un estudio con japoneses en Hawaii, Severson y colaboradores establecieron que un incremento en el consumo de arroz y soja se asociaba con una disminución del riesgo de padecer CP [91].

También se han realizado estudios inoculando células LNCaP en ratones, alimentados con una dieta rica en arroz, en los cuales no se observó progresión tumoral cuando se comparó con controles. Este efecto desapareció cuando se añadió grasa a la dieta [92].

#### **6.2.7.2. Soja**

Un reciente estudio usando el modelo animal de adenocarcinoma de próstata Dunning R3327 mostró que en las ratas alimentadas con pienso de arroz o flúor de soja el tumor crecía mucho más lentamente que los tumores en los animales control [93].

Tanto estudios epidemiológicos como estudios sobre emigrantes, han demostrado correlación entre un incremento de los niveles de isoflavonas (en especial genisteína) en el suero y orina de los varones asiáticos y disminución de la incidencia de CP [95].

La genisteína es un potente inhibidor de la proteína tiroxina-kinasa y topoisomerasa II, enzimas cruciales para la proliferación celular. También es un inhibidor de la angiogénesis y de numerosas enzimas del metabolismo esteroideo como la aromatasa y la 5 $\alpha$  reductasa [96].

#### **6.2.7.3. Cereales**

Rose y colaboradores han encontrado un efecto protector de las dietas ricas en cereales contra el CP [97].

#### **6.2.7.4. Té verde**

El té es la bebida más consumida en el mundo sino contamos con el agua. El té verde contiene polifenoles, siendo los flavonoles los más importantes. Dentro de estos se encuentran la epicatequina, epicatequina 3-galato, epigallocatequina y epigallocatequina 3-galato [98]. En un estudio en el que se inocularon células LNCaP y PC-3 en ratones atímicos. Se demostró que la inyección diaria de 1 mg de epigallocatequina a las dos semanas de la inoculación tumoral, producía una reducción de ambos tumores entre el 20% y el 30% [99].

## **7. DIETA MEDITERRÁNEA Y CÁNCER DE PRÓSTATA**

La dieta mediterránea tradicional debe tener ocho componentes:

1. Cociente alto entre grasa monosaturada y saturada.
2. Moderado consumo de etanol.
3. Alto consumo de legumbres.
4. Alto consumo de cereales (especialmente pan).
5. Alto consumo de frutas.
6. Alto consumo de vegetales.
7. Bajo consumo de carne y productos cárnicos.
8. Consumo moderado de leche y productos lácteos.

La dieta mediterránea, que es considerada hoy en día protectora contra cánceres endocrinos, así como, frente a enfermedades cardiovasculares, tiene un alto contenido de frutas, vegetales y pasta, y también un consumo moderado de vino [100].

Existen numerosos estudios italianos que demuestran un efecto protector de la fruta fresca y los vegetales crudos frente a numerosos cánceres, incluyendo el de próstata [101,102].

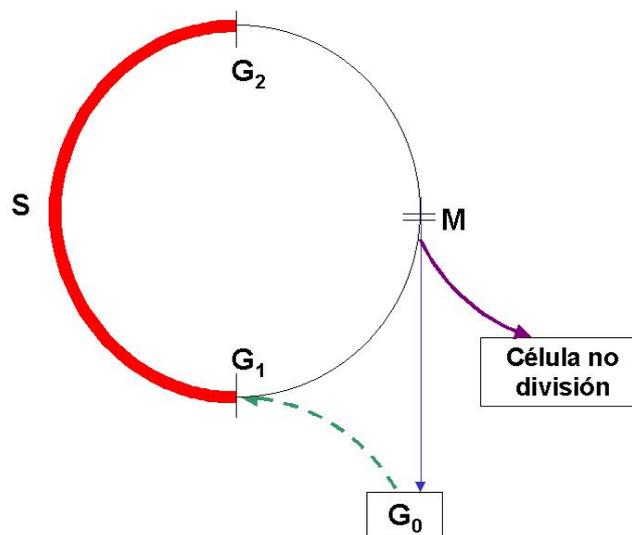
## 8. PROLIFERACIÓN CELULAR

Aunque se multiplique por tres o por cuatro el tamaño de las células, desde el recién nacido al adulto, la mayor parte del crecimiento que se produce en la especie humana se debe a un incremento en el número de células. Un adulto crece desarrollándose hasta una media de  $10^{15}$  células, desde un único huevo fertilizado. Cuando los adultos alcanzamos la madurez el número de células permanece prácticamente constante, hasta el final de nuestros días. Sin embargo, incluso en los adultos, la división celular se mantiene a un ritmo elevado, muriendo un billón de células al día que deben ser reemplazadas. La mayoría de las células que mueren vienen de tejidos y órganos como el tracto gastro-intestinal, piel y médula ósea [110]. En el animal adulto, el número de células que se producen, debe igualar al número de células que mueren. Esta simple ecuación es fundamental para entender un crecimiento normal o anormal.

En toda población de células, existen 3 subpoblaciones. El primer grupo son células que continuamente proliferan, pasando de una mitosis a la siguiente. El segundo grupo se compone de células diferenciadas terminalmente que, de forma irrevocable, abandonan el ciclo celular y están destinadas a morir sin que se vuelvan a dividir otra vez. Y el tercer grupo, son células que no se encuentran en el ciclo celular y que no se

dividen, pero que pueden reentrar en el ciclo celular, y dividirse con un estímulo adecuado (células  $G_0$ ). En la figura 1 se muestra como las células en el ciclo atraviesan las 4 fases diferentes [111].

**Figura 1**



**Figura 1:** Representación de ciclo celular: las células atraviesan 4 fases definidas como  $G_1$ , fase S,  $G_2$  y M (mitosis).

Células en fase  $G_0$  se encuentran presentes en numerosas partes del organismo. En el hígado adulto la mayoría de las células están en  $G_0$ , y cuando se reseca dos terceras partes del mismo, el resto de las células entran en el ciclo celular (en fase  $G_1$ ), proliferan y regeneran el hígado prácticamente hasta su tamaño original [110].

La figura 1 muestra que cualquier población celular puede incrementar su número por cualquier de los tres mecanismos siguientes:

- Acortamiento de la longitud del ciclo celular, produciéndose más células por unidad de tiempo.
- Disminuyendo la tasa de muerte celular.
- Introduciendo células  $G_0$  al ciclo celular, volviendo a resultar en más células por unidad de tiempo.

Los tres mecanismos actúan en el crecimiento normal y anormal. En los tumores, se produce en ocasiones un acortamiento del ciclo celular, puede existir un incremento en la fracción de crecimiento (grupo de células proliferantes), o estar disminuida la fracción de pérdida celular [111].

En la mayoría de los tumores, los tres mecanismos son importantes en determinación de la agresividad del tumor, que se caracteriza por su tiempo de duplicación. Este tiempo varía entre 38 y 116 horas, con una media inferior a 3 días para el linfoma de Burkitt y más de 600 días para algunos adenocarcinomas del colon y recto. El tiempo de duplicación mide la agresividad tumoral y no el índice mitótico o el grado de anaplasia [112].

## 9. APOPTOSIS

El término apoptosis viene del griego, y significa caída de las hojas de un árbol. La apoptosis es un mecanismo por el que se regula el número de células. También es conocido como muerte celular programada. Es la forma de muerte eucariótica más frecuente, actuando como un mecanismo de suicidio fisiológico para preservar la homeostasis tisular. Se produce de forma natural durante el recambio tisular, por ejemplo, la muerte neuronal, la selección de células linfocíticas o la menstruación [113].

Kerr y colaboradores establecen que las dos principales formas de muerte celular son la necrosis y la apoptosis, y establecen unas diferencias entre ambas que se representan en la tabla 2.

Morfológicamente, la apoptosis se caracteriza por una secuencia temporal de sucesos que desembocan en la agregación de la cromatina, condensación nuclear y citoplasmática, y la eventual fragmentación de la célula, que muere en racimos de fragmentos de membranas agregados (cuerpos apoptóticos), que con frecuencia contienen organelas morfológicamente intactas [114].

**Tabla 2**

<b>NECROSIS</b>	<b>APOPTOSIS</b>
Es evitable	Es inevitable
Se produce aumento del tamaño celular	No se produce aumento del tamaño celular
Expansión y disolución del núcleo	Condensación del núcleo y fragmentación ("picnosis")
Desintegración de las organelas	Las organelas pueden permanecer intactas
Liberación de enzimas al espacio extracelular	No hay liberación de enzimas
Secundaria a rotura de membrana celular externa	Secundaria a "mecanismo de burbujeo"
Desencadena respuesta inflamatoria	No hay respuesta inflamatoria
Las células no se separan de las vecinas.	La célula apoptótica se separa de las vecinas tras degradación de moléculas adhesivas, formándose vesículas aisladas (cuerpos apoptóticos)

**Tabla 2:** Principales diferencias entre el proceso de muerte celular por necrosis y por apoptosis.

Los 5 rasgos característicos de las células apoptóticas son:

- 1.- Activación de las caspasas.
- 2.- Acumulación de fosfatidilserina en la cubierta exterior de la membrana celular, detectable con anexina.
- 3.- Fragmentación del ADN: fragmentación de los nucleosomas por las ADNasas.
- 4.- Fragmentación de las membranas y del núcleo y, finalmente, de la célula entera.
- 5.- Fagocitosis de los fragmentos celulares por los macrófagos

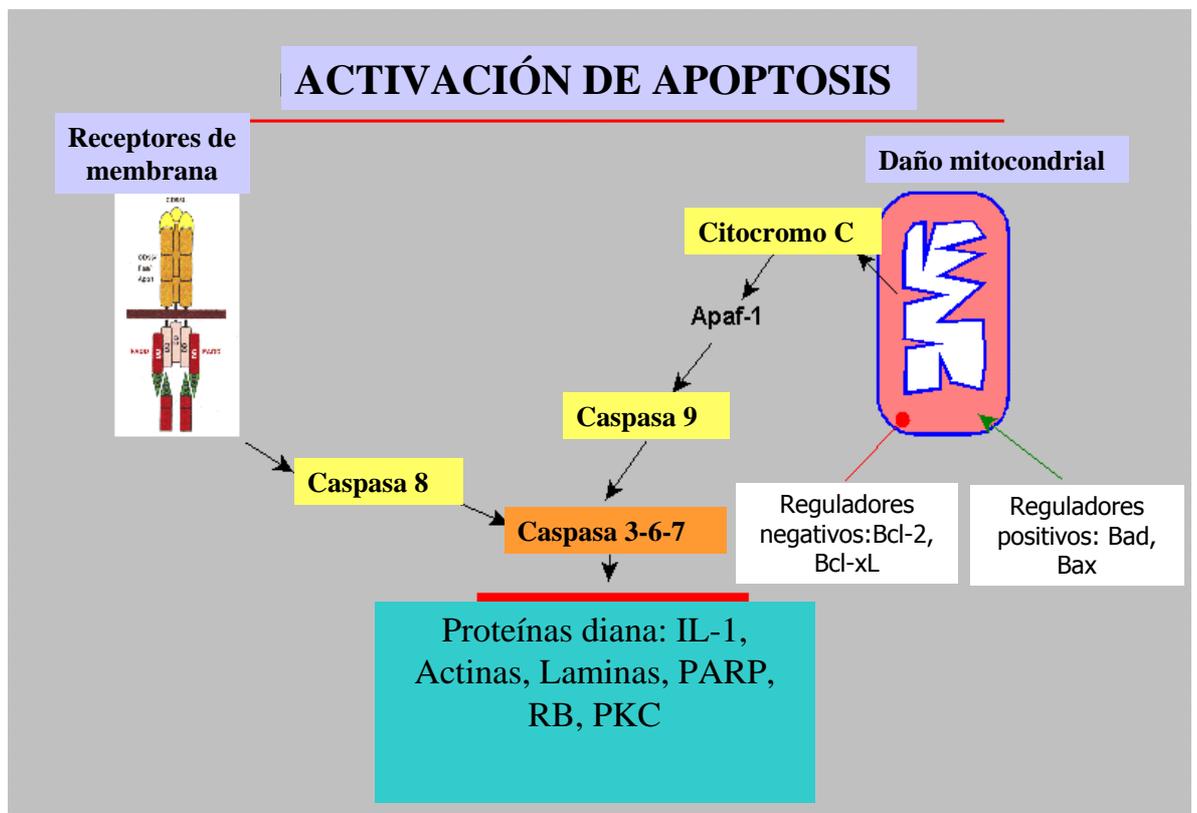
La señal que es capaz de inducir la apoptosis o cascada apoptótica puede actuar a dos niveles (figura 2):

- a.- Sobre receptores de membrana, activándose la caspasa 8.
- b.- Causando un daño mitocondrial, activándose la caspasa 9.

Ambas caspasas activan las caspasas efectoras 3 y 6 que son las que van a producir los efectos antes descritos (condensación de cromatina y formación de cuerpos apoptóticos). Estos cuerpos apoptóticos son rápidamente reconocidos, fagocitados y digeridos tanto por macrófagos como por células epiteliales adyacentes [115].

El patrón característico de la apoptosis es la fragmentación del ADN del genoma, un proceso irreversible que conduce a la célula a su muerte, y se produce antes de los cambios citoplasmáticos y de la permeabilidad de la membrana interna [116].

Figura 2



**Figura 2:** Vías de activación de la apoptosis. La muerte celular programada se puede producir a través de la activación de receptores de membrana o a través de daño mitocondrial.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## HIPÓTESIS

**La quercetina, rutina, morina, y los ácidos gálico y tánico (polifenoles presentes en el vino tinto) inhiben la proliferación in vitro de las células LNCaP, y esta acción se produce, al menos en parte, por inducción apoptótica.**

## OBJETIVOS

### A.- OBJETIVOS PRINCIPALES:

1. Establecer el grado de inhibición sobre la proliferación de las células LNCaP en cultivo, que ejercen la quercetina, la rutina, la morina, y los ácidos gálico y tánico a las 24, 48, 72 y 96 horas de incubación.
2. Evaluar el efecto de dichos nutrientes sobre la muerte celular programada (apoptosis) en la línea celular mencionada, a las 24, 48 y 72 horas de incubación.

### B.- OBJETIVO SECUNDARIO

1. Estudiar la modificación de la proliferación de las células LNCaP tras la adición de dihidrotestosterona (DHT) al medio de cultivo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

## **1. AMBITO DEL ESTUDIO**

### **1.1. ELECCIÓN DE LA LÍNEA CELULAR MÁS APROPIADA.**

Hoy en día podemos disponer de varias líneas celulares de CP. En este trabajo hemos preferido la utilización de células de CP humano, LNCaP. Esta línea celular deriva originalmente de una metástasis supraclavicular de CP humano, siendo las células sensibles (tanto in vivo, como in vitro) a los andrógenos, frente a los cuales responden con un aumento en la proliferación. También son capaces de sintetizar y secretar antígeno específico prostático (PSA), así como de expresar receptores androgénicos. Por último, estas células están disponibles comercialmente (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, USA). Todos estos rasgos hacen de esta línea celular la candidata ideal para cumplir los objetivos del presente proyecto.

### **1.2. PROCESO DE DESCONGELACIÓN.**

Los tubos que contienen las células en congelación (forma de conservación a largo plazo en nitrógeno líquido, a  $-196^{\circ}$  C), se depositaron en un baño de agua a  $37^{\circ}$  C para su descongelación.

Posteriormente, las células se lavaron para eliminar el DMSO (presente en el medio de congelación al 10%), con medio RPMI mediante varias centrifugaciones, hasta conseguir un pellet limpio. En ese momento, todo el contenido se transfirió a un único recipiente de cultivo con medio RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino (FCS), L-glutamina y antibióticos (penicilina, estreptomina y gentamicina). Una vez transferidas a los recipientes con el medio, las células se incubaron en estufa a 37° C, bajo una atmósfera de presión, y una concentración de CO<sub>2</sub> del 5%. Para el mantenimiento del cultivo celular se realizó un cambio de dicho medio una vez cada 2-3 días en función de la densidad celular alcanzada en los recipientes de cultivo.

### 1.3. SIEMBRA CELULAR.

Para los estudios de proliferación celular y apoptosis, la siembra celular se realizó en placas de 96 pocillos (Costar, Acton, USA) de 1 ml de capacidad, a razón de 500, 1000 y 5000 células por pocillo, utilizando medio RPMI - 1640, conteniendo un 10% de suero fetal bovino (FCS), L-glutamina y los antibióticos anteriormente reseñados. Las células se incubaron durante toda la noche para permitir la adherencia de las mismas a la superficie del pocillo. Al día siguiente, se realizó el recuento

para establecer la eficacia de la siembra y para establecer la población celular de "0 horas". Siempre bajo condiciones de esterilidad, el medio de cultivo se eliminó mediante pipeteo, y se sustituyó por medio limpio y fresco cada 24 horas. Tras la adición de las sustancias que se describen en el apartado de manipulaciones, las células se cultivaron durante 4 días (0, 24, 48, 72 y 96 h) al cabo de los cuales se procedió, según manual de fabricación, al procesamiento de las muestras para el estudio de la proliferación celular utilizando un kit específico (Cell Proliferation ELISA BrdU - Roche).

#### 1.4. MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO.

Los cultivos se llevaron a cabo como monocapas de células adherentes en frascos de 75 cm<sup>2</sup> (Costar, Acton, USA) en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Biological Industries, Beit, Haemek, Israel) suplementados con un 10% de FCS termo inactivado (FBS, Biological Industries, Beit, Haemek, Israel), L-glutamina 2 mM (Biological Industries, Beit, Haemek, Israel), penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml y gentamicina 50 mg/ml (Biological Industries, Beit, Haemek, Israel). Para la propagación de los cultivos, las células fueron despegadas del fondo de los frascos con una

solución de tripsina al 0,05% y ácido etilen-diamin-tetraacético (EDTA) al 0,02% (Biological Industries, Beit, Haemek, Israel). Una vez despegadas, las suspensiones celulares se transfirieron a tubos estériles de 50 cc. Se realizó una centrifugación (1.500 rpm durante 5 minutos) y el pellet de células obtenido se resuspendió en medio RPMI - 1640 y se resembró entre 1/10 y 1/5 en frascos de 75 cm<sup>2</sup>. Controlada la calidad de la suspensión (idealmente, las células deben aparecer aisladas), los recipientes se conservaron en estufa a 37° C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. A partir del momento de la siembra, el medio de cultivo se cambió cada 2 días. También cada 24 horas se comprobó la viabilidad del cultivo: crecimientos iguales o superiores al 90 % de la superficie del recipiente (o lo que es lo mismo, superior al 90 % de un campo de gran aumento) traducen una gran actividad celular y suponen un gran consumo de nutrientes. En esas circunstancias, también debe cambiarse el medio de cultivo.

#### 1.5. CONSIDERACIONES ESPECIALES.

Todas las manipulaciones celulares se llevaron a cabo bajo condiciones de esterilidad. Para asegurar la esterilidad de los procesos, se usaron guantes y, todos los procesos se llevaron a cabo en campana

extractora de flujo laminar. Todos los residuos se eliminaron como material biocontaminante.

## 2. NUTRIENTES

La dieta mediterránea, ha sido y es, motivo de estudio como factor protector contra ciertos cánceres, y en especial los endocrinos, como el CP. Uno de los principales compuestos de la dieta mediterránea es el vino.

El vino es una solución hidro-alcohólica producto de la fermentación del mosto de la uva. Sin embargo, no es sólo agua y alcohol, sino que contiene más de 500 compuestos diferentes: azúcares, ácidos, glicerol, polifenoles, aldehídos, vitaminas, etc. Los polifenoles están presentes en cantidades importantes en vinos tintos, y en menor medida, en los blancos, y contribuyen en gran parte a las cualidades deseables del vino, aunque no tienen valor nutritivo.

Nosotros hemos estudiamos in vitro la influencia de 5 polifenoles presentes en el vino tinto sobre la proliferación de las células LNCaP. Los polifenoles utilizados han sido: quercetina, rutina, morina, ácido gálico y ácido tánico. La quercetina, rutina y morina son flavonoides de la familia de los flavonoles, mientras que ácido gálico es un hidroxibenzoato. El ácido tánico es un tanino (polímero de 8 monómeros de ácido gálico y glucosa). Las figuras 3, 4, 5, 6 y 7 representan la formulación química de cada compuesto.

Figura 3

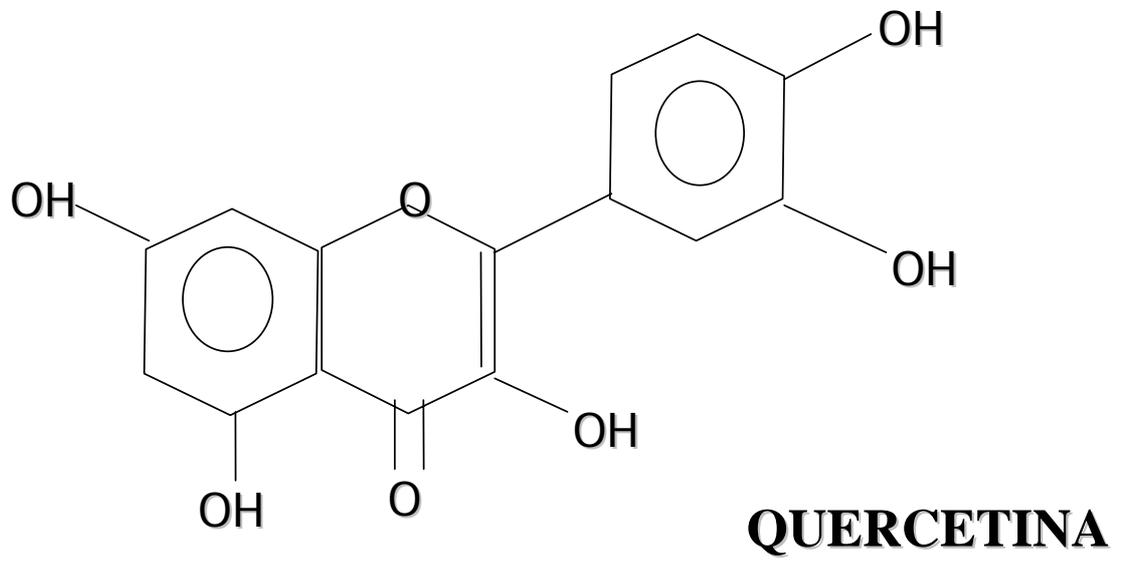


Figura 4

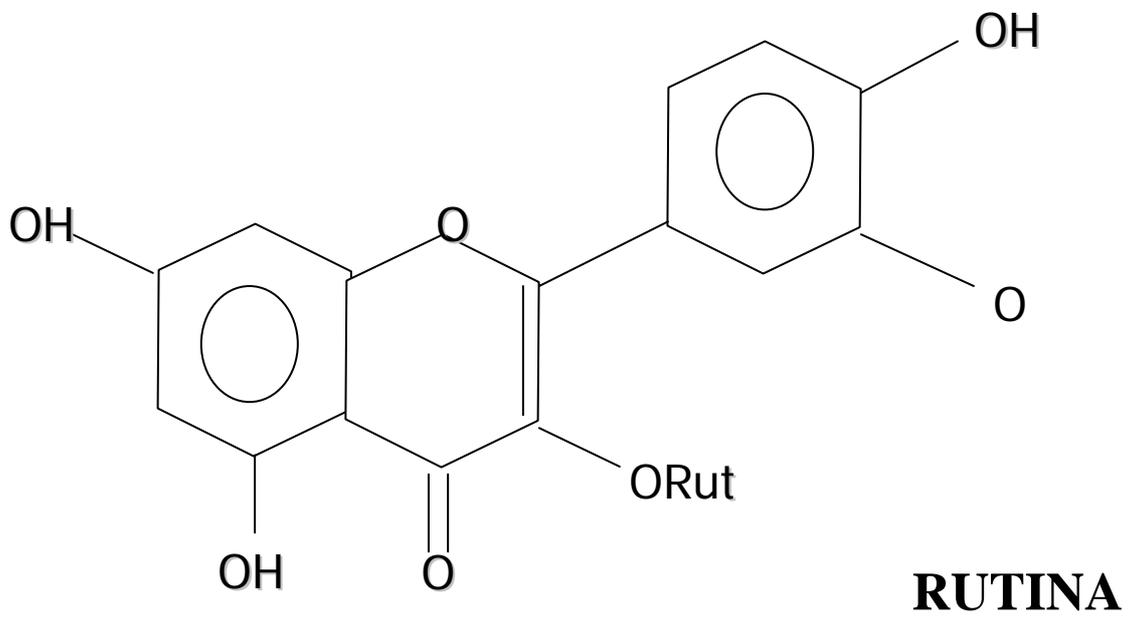


Figura 5

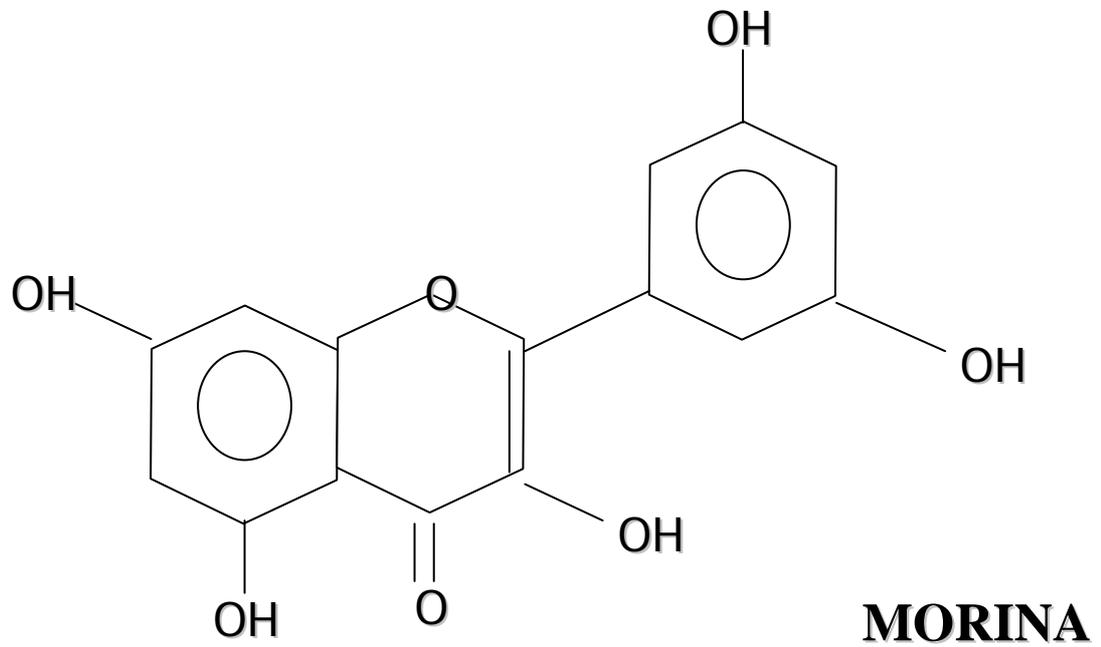


Figura 6

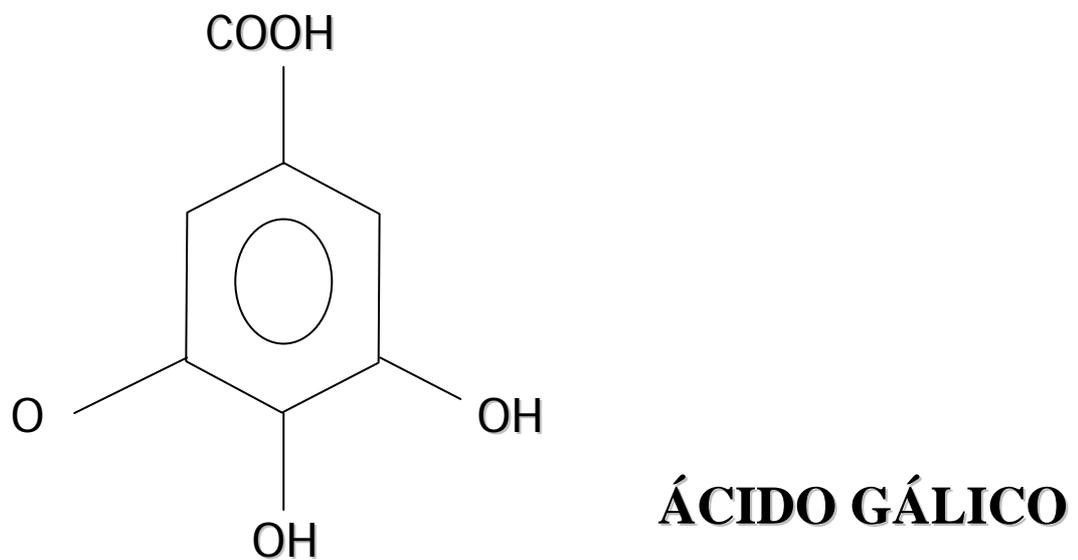
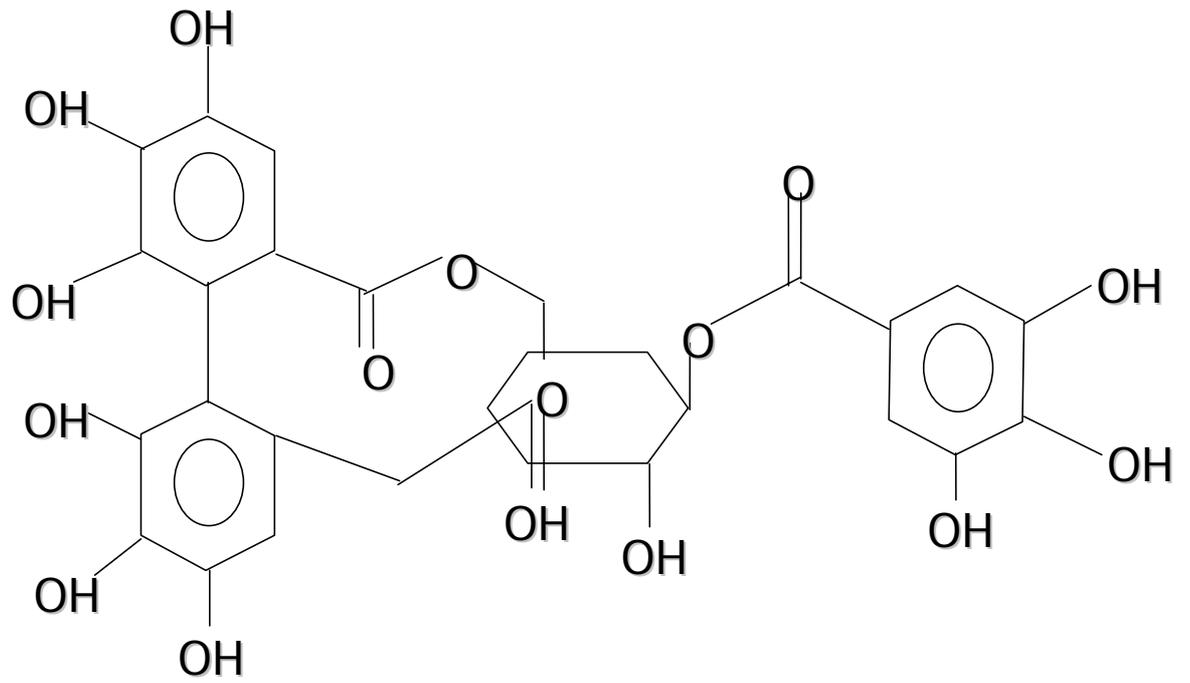


Figura 7



ÁCIDO TÁNICO

### **3. ESTABLECIMIENTO DE “NUESTRAS CONDICIONES” DE INVESTIGACIÓN**

Es fundamental establecer nuestras condiciones previas para el crecimiento y desarrollo de los cultivos celulares, con nuestra partida de FCS y líneas celulares de LNCaP con un determinado número de pases celulares (en nuestro caso, 75 pases).

Las células de CP humano (LNCaP) crecieron en monocapas de cultivo en medio RPMI – 1640 con 5% de FCS y suplementado con penicilina (100 U / ml), estreptomycin (100 mg / ml) y gentamicina (50 mg / ml), en una atmósfera con 95 % de aire y 5 % CO<sub>2</sub>, a 37° C de temperatura.

La descripción del experimento que llevamos a cabo se describe, paso a paso, a continuación:

### 3.1. PROTOCOLO PARA ESTABLECER LAS CONDICIONES DE EXPERIMENTACIÓN

1. Se cultivaron las células en las condiciones de experimentación determinadas, en un volumen final de 100  $\mu$ l.
2. Se añadieron 10  $\mu$ l / pocillo de la solución 1 (BrdU) durante 2 y 4 horas para su incorporación al ADN.
3. Se eliminó el medio mediante aspiración, para eliminar la BrdU no incorporada.
4. Se añadieron 200  $\mu$ l de una solución fijadora (FixDenat) a las células e incubamos durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA).
5. Se eliminó la solución fijadora, se añadió 100  $\mu$ l / pocillo de la solución 3 (Anti – BrdU - POD) y se incubó durante 45 y 90 minutos a TA.
6. Se eliminó la solución 3 y se lavaron los pocillos tres veces con 250  $\mu$ l / pocillo de la solución de lavado 4.
7. Se añadió 100  $\mu$ l / ml de solución sustrato (TMB) y se incubó a TA durante 5 - 30 minutos (hasta observar una intensidad de color suficiente para su detección fotométrica)
8. La reacción se detuvo añadiendo 25  $\mu$ l de  $H_2SO_4$  1 M a cada pocillo e incubando durante 1 minuto en agitación.

9. Se midió la absorbancia a 450 nm, y como canal de referencia 630 nm, dentro de los 5 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

- Solución 1: diluimos 1:100 con medio RPMI completo.

$10 \mu\text{l} / \text{ pocillo} \times 102 \text{ pocillos} = 1020 \mu\text{l}.$

Preparamos  $11 \mu\text{l sol.1} + 1089 \mu\text{l RPMI}$  (solución protegida de la luz).

- Solución 2: disolvimos en 1.1 ml de agua bidestilada durante 10 minutos y mezclamos.
- Solución 3: diluimos la solución 2 1:100 con solución dilución "antibody" (bote 4).

Preparamos un poco antes de usar y no almacenamos.

$100 \mu\text{l} / \text{ pocillo} \times 102 \text{ pocillos} = 10,2 \text{ ml}.$

Preparamos  $102 \mu\text{l sol.2} + 10,098 \text{ ml sol. Bote 4}.$

- Solución 4: diluimos 1 / 10 (solución estable a 2 - 8° C durante varias semanas).

$250 \mu\text{l} / \text{ pocillo} \times 102 \text{ pocillos} = 25,5 \text{ ml} \times 3 = 76.5 \text{ ml}.$

Preparamos  $8 \text{ ml sol. 4} + 72 \text{ ml agua bidestilada}$

### 3.2. CONTROLES

1. Blanco: 100  $\mu$ l RPMI completo + 10  $\mu$ l sol. 1 + 100  $\mu$ l sol. 3 (la absorbancia no debe exceder de 0.1)
2. Background: 100  $\mu$ l células + 100  $\mu$ l sol. 3

### 3.3. CÁLCULO DE LAS DÓISIS

#### 1. Ácido Gálico (170.1 mg / L)

1.a) Solución stock 75 mM: pesamos 127.5 mg en 10 ml etanol absoluto.

1.b) Soluciones 1, 5 y 10 mM:

1.b.1) solución 10 mM: 134  $\mu$ l sol. 75 mM + 866  $\mu$ l etanol.

1.b.2) solución 5 mM: 500  $\mu$ l sol. 10 mM + 500  $\mu$ l etanol.

1.b.3) solución 1 mM: 200  $\mu$ l sol. 5 mM + 800  $\mu$ l etanol.

1.c) Solución células (1:1000) en medio completo 5 % FCS:

1.c.1) solución 10  $\mu$ M: 40  $\mu$ l sol. 10 mM + 39.95 ml medio 5% FCS

1.c.2) solución 5  $\mu$ M: 40  $\mu$ l sol. 5 mM + 39.95 ml medio 5% FCS

1.c.3) solución 1  $\mu$ M: 40  $\mu$ l sol. 1 mM + 39.95 ml medio 5% FCS

2. Ácido Tánico (632 mg / L)

2.a) Solución stock 75 mM: pesamos 474 mg. en 10 ml etanol absoluto.

2.b) Soluciones 1, 5 y 10 mM:

2.b.1) solución 10 mM: 134  $\mu$ l sol. 75 mM + 866  $\mu$ l etanol.

2.b.2) solución 5 mM: 500  $\mu$ l sol. 10 mM + 500  $\mu$ l etanol.

2.b.3) solución 1 mM: 200  $\mu$ l sol. 5 mM + 800  $\mu$ l etanol.

2.c) Solución células (1:1000) en medio completo 5 % FCS:

2.c.1) solución 10  $\mu$ M: 40  $\mu$ l sol. 10 mM + 39.95 ml medio 5% FCS

2.c.2) solución 5  $\mu$ M: 40  $\mu$ l sol. 5 mM + 39.95 ml medio 5% FCS

2.c.3) solución 1  $\mu$ M: 40  $\mu$ l sol. 1 mM + 39.95 ml medio 5% FCS

3. Morina (338.27 mg / L)

3.a) Solución stock 75 mM: pesamos 254 mg en 10 ml DMSO.

3.b) Soluciones 50 y 25 mM:

3.b.1) solución 50 mM: 667  $\mu$ l sol. 75 mM + 333  $\mu$ l DMSO.

3.b.2) solución 25 mM: 500  $\mu$ l sol. 50 mM + 500  $\mu$ l DMSO.

3.c) Solución células (1:1000) en medio completo 5 % FCS:

3.c.1) solución 75  $\mu$ M: 40  $\mu$ l sol. 75 mM + 39.95 ml medio 5% FCS

3.c.2) solución 50  $\mu$ M: 40  $\mu$ l sol. 50 mM + 39.95 ml medio 5% FCS

3.c.3) solución 25  $\mu$ M: 40  $\mu$ l sol. 25 mM + 39.95 ml medio 5% FCS

4. Rutina (664.55 mg / L)

4.a) Solución stock 75 mM: pesamos 498 mg en 10 ml DMSO.

4.b) Soluciones 50 y 25 mM:

4.b.1) solución 50 mM: 667  $\mu$ l sol. 75 mM + 333  $\mu$ l DMSO.

4.b.2) solución 25 mM: 500  $\mu$ l sol. 50 mM + 500  $\mu$ l DMSO.

4.c) Solución células (1:1000) en medio completo 5% FCS:

4.c.1) solución 75  $\mu$ M: 40  $\mu$ l sol. 75 mM + 39.95 ml medio 5% FCS

4.c.2) solución 50  $\mu$ M: 40  $\mu$ l sol. 50 mM + 39.95 ml medio 5% FCS

4.c.3) solución 25  $\mu$ M: 40  $\mu$ l sol. 25 mM + 39.95 ml medio 5% FCS

5. Quercetina (338.3 mg / L)

5.a) Solución stock 75 mM: pesamos 254 mg. en 10 ml DMSO.

5.b) Soluciones 1, 5 y 10 mM:

5.b.1) solución 10 mM: 134  $\mu$ l sol. 75 mM + 866  $\mu$ l etanol.

5.b.2) solución 5 mM: 500  $\mu$ l sol. 10 mM + 500  $\mu$ l etanol.

5.b.3) solución 1 mM: 200  $\mu$ l sol. 5 mM + 800  $\mu$ l etanol.

5.c) Solución células (1:1000) en medio completo 5% FCS:

5.c.1) solución 10  $\mu$ M: 40  $\mu$ l sol. 10 mM + 39.95 ml medio 5% FCS

5.c.2) solución 5  $\mu$ M: 40  $\mu$ l sol. 5 mM + 39.95 ml medio 5% FCS

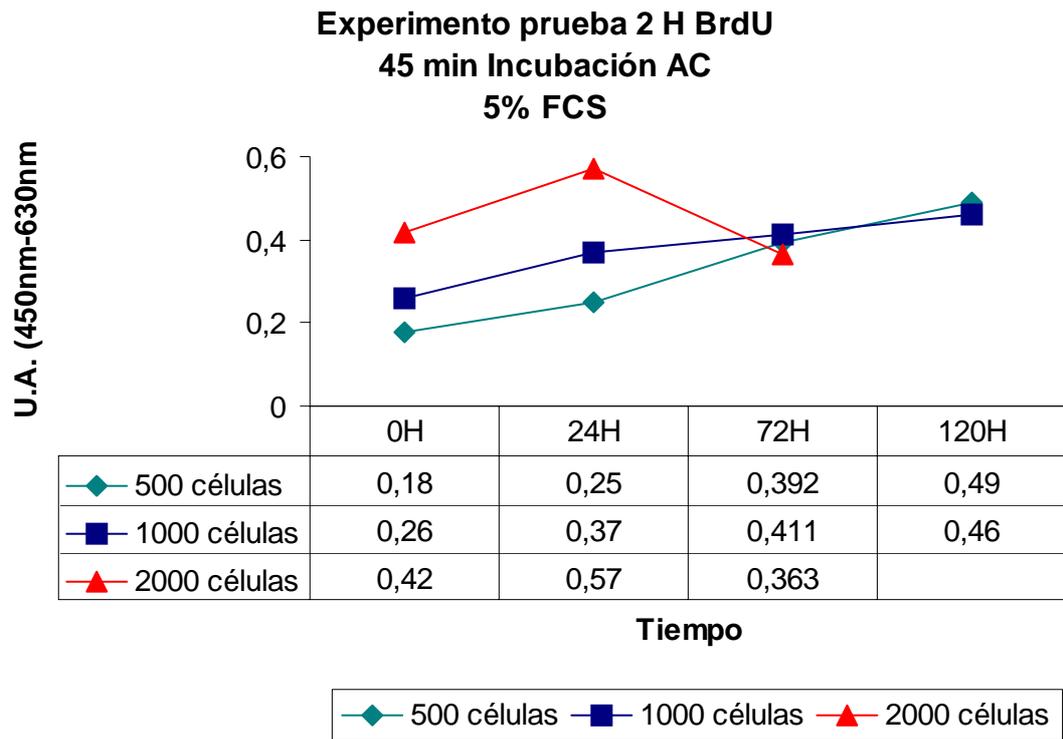
5.c.3) solución 1  $\mu$ M: 40  $\mu$ l sol. 1 mM + 39.95 ml medio 5% FCS

Para establecer el número idóneo de células con un crecimiento exponencial durante las 96 horas de nuestro experimento, utilizamos placas de 96 pocillos y se realizaron siembras celulares a 3 concentraciones diferentes por pocillo: 5 x 100, 1 x 1000 y 2 x 1000 células. Observamos que la curva que mejor se ajustó a un crecimiento exponencial durante las 96 horas se obtuvo con 500 células por pocillo, y esa fue la concentración celular que utilizamos para nuestro trabajo.

El marcaje con BrdU se realizó a 2 y 4 horas con el objeto de establecer cuál era el mínimo tiempo necesario para obtener una incorporación de BrdU a la síntesis "de novo" en el ADN suficiente para poder ser detectada y cuantificada. Los resultados con 2 horas de incubación fueron suficientes y adecuados para nuestras condiciones experimentales.

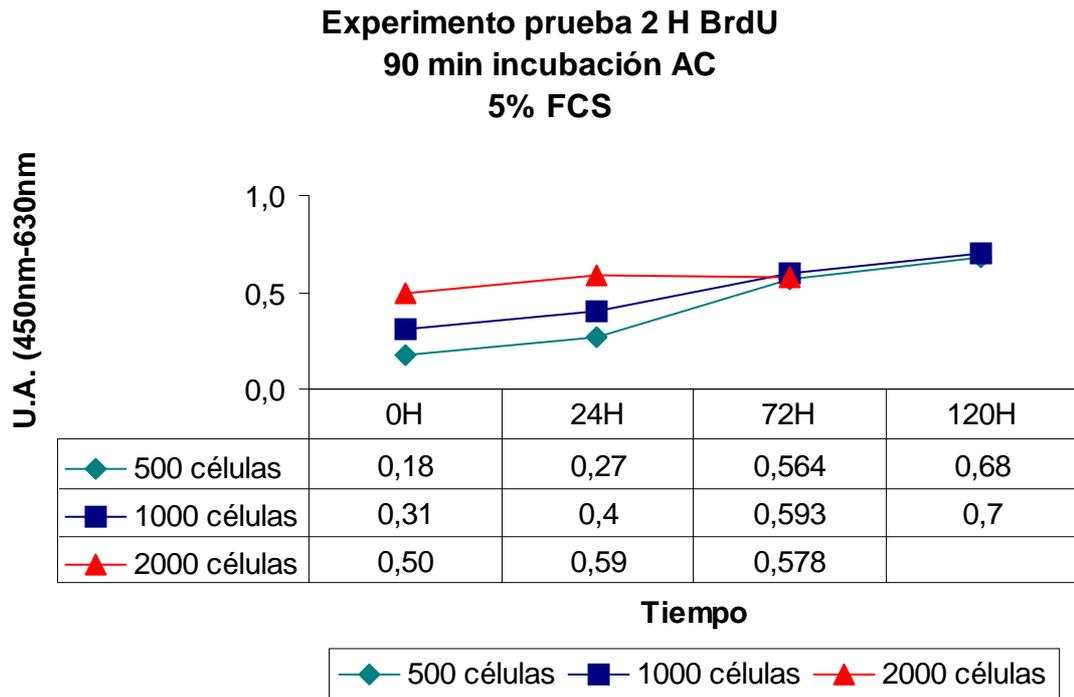
Las figuras 8, 9, 10 y 11 muestran los diferentes experimentos realizados con 500, 1000 y 2000 células tras incubación de la muestra con anticuerpo durante 45 o 90 minutos, y con dos concentraciones diferentes de FCS (5 % y 10 %)

Figura 8



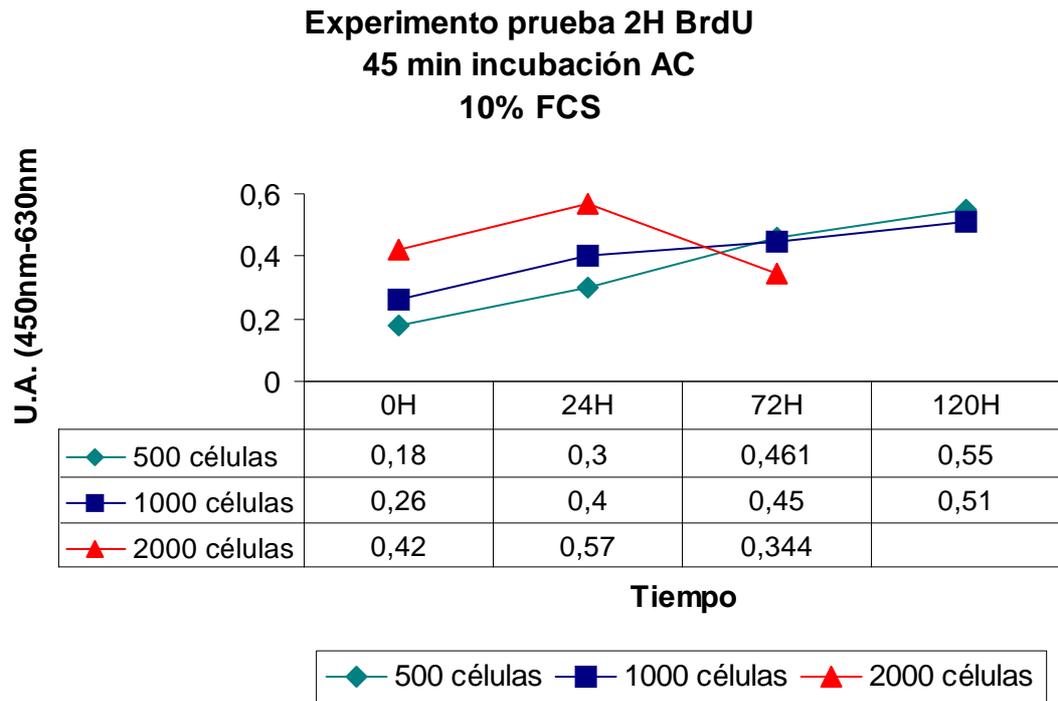
**Figura 8:** Experimento de prueba con 500, 1000 y 2000 células, en el que determinamos la síntesis de ADN en unidades de absorbancia (UA), tras 45 minutos de incubación con el anticuerpo y 2 horas con bromodeoxi-uridina, en un medio con 5% de suero fetal bovino.

Figura 9



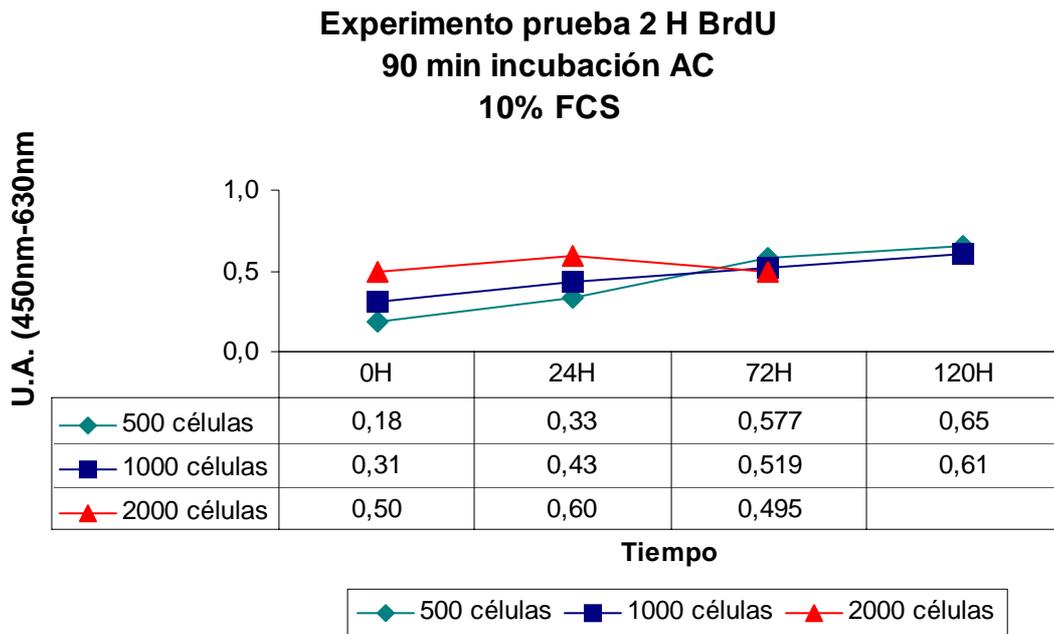
**Figura 9:** Experimento de prueba con 500, 1000 y 2000 células, en el que determinamos la síntesis de ADN en unidades de absorbancia (UA), tras 90 minutos de incubación con el anticuerpo y 2 horas con bromo-deoxi-uridina, en un medio con 5% de suero fetal bovino.

Figura 10



**Figura 10:** Experimento de prueba con 500, 1000 y 2000 células, en el que determinamos la síntesis de ADN en unidades de absorbancia (UA), tras 45 minutos de incubación con el anticuerpo y 2 horas con bromo-deoxi-uridina, en un medio con 10% de suero fetal bovino.

Figura 11



**Figura 11:** Experimento de prueba con 500, 1000 y 2000 células, en el que determinamos la síntesis de ADN en unidades de absorbancia (UA), tras 90 minutos de incubación con el anticuerpo y 2 horas con bromo-deoxi-uridina, en un medio con 10% de suero fetal bovino.

Para los experimentos se utilizaron células LNCaP (500 / pocillo), que se cultivaron en placas de 96 pocillos, a los que se añadieron los diferentes nutrientes disueltos en DMSO (concentración final DMSO  $\leq$  0.01%) o etanol (concentración final de etanol  $\leq$  0.1%), incubándose durante 24, 48, 72 y 96 horas. Se realizaron cambios del medio condicionado cada 24 horas.

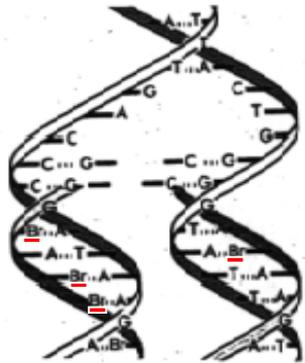
Los nutrientes utilizados en el estudio fueron 4 flavonoides: quercetina, morina y rutina (de la familia de los flavonoles), ácido gálico (un hidroxibenzoato) y ácido tánico (un tanino), todos ellos presentes en el vino. Las concentraciones usadas para el ácido gálico, ácido tánico y quercetina fueron 1, 5 y 10  $\mu$ M; y las de rutina y morina 25, 50 y 75  $\mu$ M.

#### 4. PROLIFERACIÓN CELULAR

La proliferación celular se estudió a las 24, 48, 72 y 96 horas. Para ello, se utilizó un inmunoensayo colorimétrico (Cell Proliferation ELISA BrdU - Roche). Este método, de una gran rapidez y sensibilidad, se basa en la cuantificación de la incorporación de BrdU al ADN de células proliferantes en lugar de la timidina. Una vez incubadas las células con BrdU, se fijan y se añade el anticuerpo anti-BrdU-POD, que lleva unido la enzima peroxidasa (POD), el cual se unirá a la BrdU incorporada al ADN de las células. El complejo inmune formado será detectado tras el aporte del sustrato TMB, que será degradado por la POD generándose un compuesto coloreado (figura 12). Este producto de reacción será cuantificado a 450 nm en un espectrofotómetro (ELISA-Bio-Tek Instruments, Winooski, USA). La intensidad en la coloración y, por tanto, los valores de absorbancia se correlacionan directamente con la síntesis de ADN y en consecuencia con el número de células proliferantes en cada una de las condiciones a estudio. El experimento se repitió tres veces (como en todos los apartados de la fase de determinaciones) hallándose la media de los tres ( $\pm$  desviación estándar) como resultado final.

Figura 12

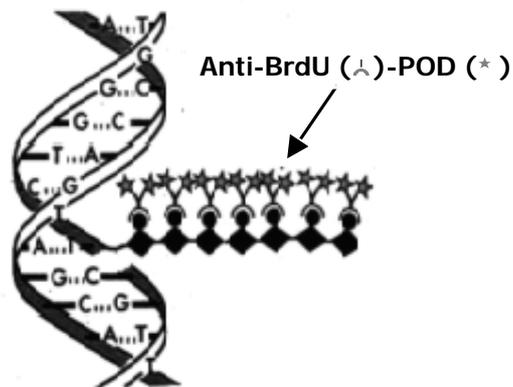
1. Incorporación de BrdU al ADN  
(2 h, 37°C)



2. Fijación y desnaturalización del ADN  
(30 min, TA)



3. Añadir anti-BrdU-POD y lavar con solución de lavado  
(90 min, TA)



4. Añadir sustrato TMB (\*) e incubar (10 min, TA)

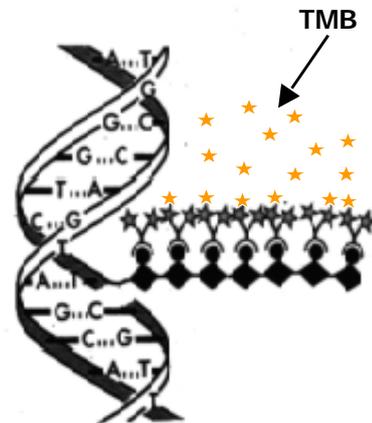


Fig. 12: Protocolo de cuantificación de la proliferación celular mediante la incorporación de BrdU a la síntesis "de novo" del ADN

## 5. APOPTOSIS

Para la evaluación de la apoptosis, se utilizó un kit de detección de muerte celular por ELISA (Cell Death Detection ELISAPLUS, Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo consiste en el reconocimiento de los mono u oligonucleosomas generados tras un proceso apoptótico. Se utilizó un inmunoensayo fotométrico para la determinación cualitativa y cuantitativa de fragmentos de ADN - histonas liberados al citoplasma tras inducir muerte celular. El ensayo utiliza dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra el ADN y las histonas. El anti-histona-biotina se une a las histonas de los nucleosomas y captura simultáneamente el inmunocomplejo al pocillo de la microplaca que esta revestido de estreptavidina, la cual es reconocida por la biotina. Adicionalmente, el anti-ADN-POD reacciona con el componente ADN de los nucleosomas y tras añadir el sustrato ATBS, que es degradado por la peroxidasa (POD) se genera un producto coloreado que se cuantificó en un espectrofotómetro (ELISA-Bio-Tek Instruments, Winooski, USA) a [A450 nm-A490 nm] (figura 13). Los resultados se expresan como un factor de enriquecimiento (EF) en mono y oligonucleosomas, el cual resultará del cociente entre la absorbancia de la muestra (células tratadas con los nutrientes) y la absorbancia del control (células no tratadas);

cuanto mayor el factor de enriquecimiento, mayor el grado de muerte celular. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

Las determinaciones de apoptosis se realizaron a las 24, 48 y 72 horas con los nutrientes y a las concentraciones en las que produjo una inhibición de la proliferación celular estadísticamente significativa.

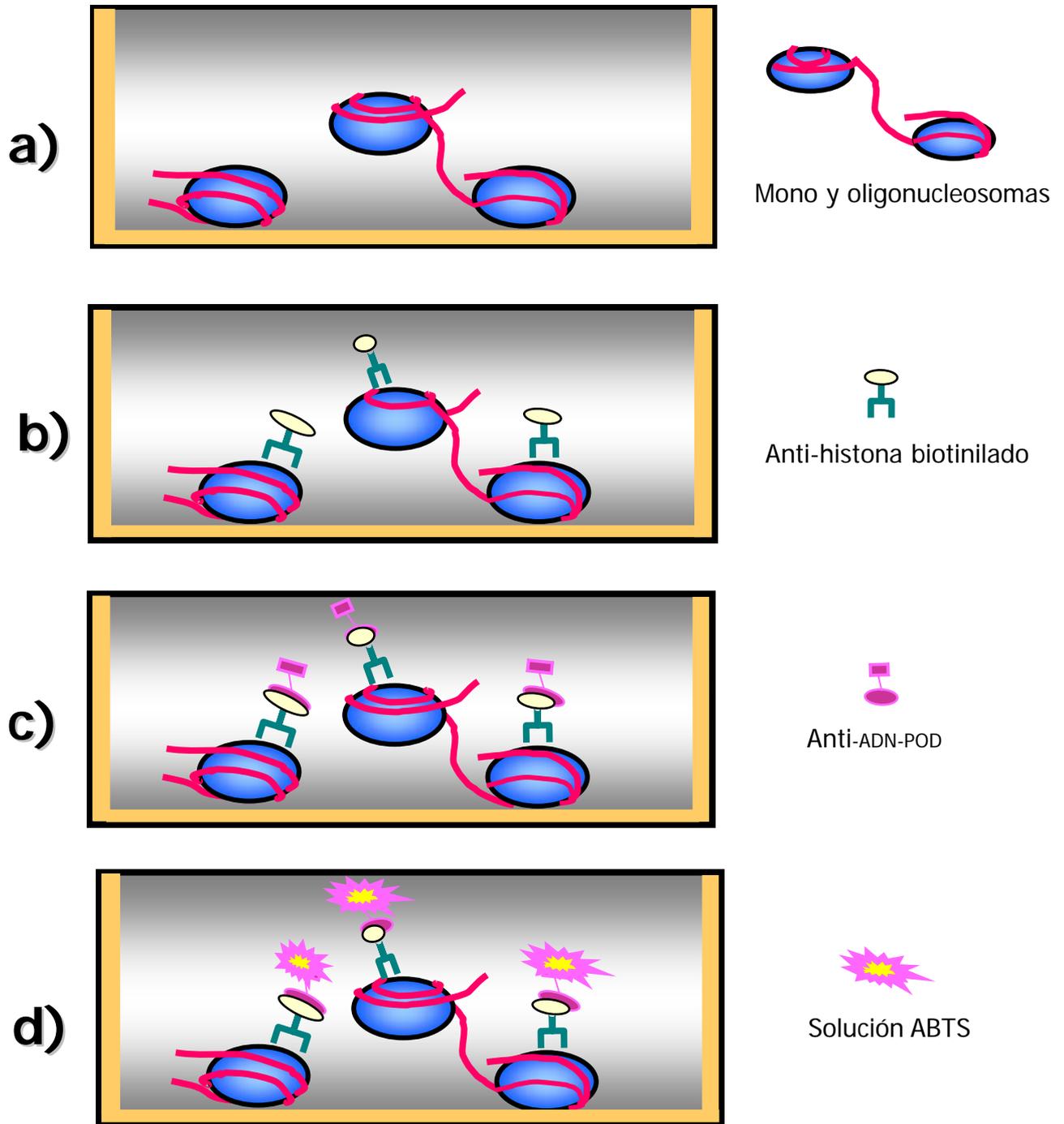


Figura 13. Inmunoensayo para la determinación cuantitativa y cualitativa *in vitro* de muerte celular. POD: peroxidasa; ABTS:

## **6. DISEÑO Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

### **6.1. EL ANALISIS DE LA VARIANZA PARA UN ÚNICO FACTOR**

#### **6.1.1. COMPARACIONES POST HOC (O A POSTERIORI)**

En ocasiones encontramos diferencias no esperadas en nuestros experimentos. Una comparación entre una condición basal (el grupo control, en este estudio) y otras condiciones (las que se dan en la adición activa de cada tipo de nutriente) con frecuencia da lugar a dos niveles de interés: el que es producto de la comparación de todas y cada una de las condiciones activas frente al control, y, en caso de detección de diferencias, los resultados de las comparaciones de todas las condiciones activas entre sí. Estas comparaciones (no previstas inicialmente) se describen como comparaciones post-hoc o a posteriori, y tienen lugar una vez que el primer análisis ha rechazado la hipótesis nula (y, por tanto, las comparaciones previstas a priori). Existen varias pruebas denominadas post hoc (o a posteriori) basadas explícitamente en la asunción de que hemos elegido las medias más extremas de nuestra muestra (las más diferentes). Estas pruebas post hoc aplican correcciones que han sido diseñadas para destacar la ventaja de la

selección "post hoc" en las comparaciones más extremas. Las comparaciones a posteriori deben ser consideradas como un rastreo de datos y, en consecuencia, dotadas de un categoría inferior a la de las comparaciones previstas a priori. En este estudio, para las comparaciones a posteriori o post-hoc, se utilizaron la corrección de Bonferroni y el método de Scheffé. La corrección de Bonferroni convierte el error tipo I (el valor de p) en más severo (menor de 0,05) como medio de penalizar un excesivo número de comparaciones. Utilizando la media de los cuadrados, el método de Scheffé lleva a cabo comparaciones apareadas (dos a dos) para todas las posibles comparaciones de medias. De modo similar a la corrección de Bonferroni, Scheffé penaliza las múltiples comparaciones en las cuales un vínculo entre variables puede aparecer como significativo como consecuencia del simple azar.

#### 6.1.2. ASUNCIONES DE ANOVA

El empleo de este test estadístico obliga a realizar algunas asunciones: la variable dependiente se mide a nivel de una escala de intervalo, y debe distribuirse de modo normal o "gaussiano" en cada una de las poblaciones bajo estudio. El ANOVA asume que las varianzas en los diferentes grupos del

diseño son idénticas; esta asunción se denomina homogeneidad de las varianzas (u homoscedasticidad). Debe tenerse presente que el error de la varianza se calcula sumando los cuadrados dentro de cada grupo. Si las varianzas en los dos grupos son diferentes, sumarlas resulta inapropiado y no proporciona una estimación de la varianza común intragrupal. ¿Por qué, entonces, el nombre de análisis de la varianza si lo que se compara son medias? El nombre se deriva del hecho de que para probar la significación estadística entre medias, realmente lo que se compara son varianzas. En el corazón del ANOVA se encuentra el hecho de que las varianzas pueden ser divididas. Hay que recordar que la varianza se computa como la suma de las desviaciones cuadráticas de la media total dividida por  $n-1$  (número de muestras menos uno). Así, dado un número de muestras  $n$ , la varianza es una función de las sumas de sus cuadrados (de las desviaciones con respecto a la media, en realidad). Por ejemplo (tabla 3):

Tabla 3

	Grupo 1	Grupo 2
Observación 1	2	6
Observación 2	3	7
Observación 3	1	5
Media de la suma de cuadrados (SC)	2	6
	2	2
Media total	4	
Total SC	28	

Las medias de los grupos 1 y 2 son bastante diferentes (2 y 6, respectivamente). Las sumas de los cuadrados dentro de cada grupo son iguales a 2. Si las sumamos, obtenemos 4. Si repetimos estos cálculos ignorando el grupo al que pertenecen, esto es, si computamos la SC total basándonos en la media total (4), obtenemos un resultado de 28. En otras palabras, el cálculo de la varianza (SC) basado en la variabilidad dentro de cada grupo proporciona una estimación muy inferior a la que se obtiene cuando se calcula en base a la variabilidad total / media total. En el ejemplo que nos ocupa, la razón para estas diferencias reside en la gran diferencia de medias en la SC. Si lleváramos a cabo un ANOVA de los datos que aparecen en la tabla 4, obtendríamos el siguiente resultado.

En la tabla 6 y la SC total (28) se divide entre la SC debida a la variabilidad dentro del grupo ( $2+2=4$ ) y la variabilidad debida a diferencias entre las medias ( $28-(2+2)=24$ ).

**Tabla 4**

	EFECTO PRINCIPAL				
	SC	gl	MEDIA CUADRATICA	F	p
Efecto	24,0	1	24,0	24,0	0,008
Error	4,0	4	1,0		

La variabilidad intragrupal (SC) es conocida como varianza del error. Este término denota el hecho de que no podemos explicar de modo sencillo su dimensión con el diseño del que disponemos. Sin embargo, el efecto SC sí podemos explicarlo: se debe a las diferencias en las medias entre grupos. Dicho de otro modo, la pertenencia a un grupo u otro explica la variabilidad porque sabemos que obedece a las diferencias en las medias.

Muchas pruebas estadísticas representan la proporción de variabilidad explicada y no explicada. El ANOVA es un buen ejemplo de lo anterior. El propósito del ANOVA es probar si las diferencias en las medias de grupos o

variables obedecen al azar o no. Esto se consigue analizando la varianza, esto es, dividiendo la varianza total en el componente que obedece al verdadero error aleatorio (esto es, la SC intragrupal) y en los componentes que son producto de las diferencias entre medias. Se estudia si existe significación estadística en las diferencias de las varianzas de los componentes de este último tipo de varianza y, si resulta significativa, se rechaza la hipótesis nula de no diferencia entre las medias y aceptamos la hipótesis alternativa de que las medias (en la población) son diferentes.

El ANOVA posee una ventaja sobre las pruebas de la *t* de Student: permite detectar los efectos de la interacción entre variables; dos variables interactúan entre sí cuando el efecto de una de ellas se modifica por el efecto de la otra.

#### 6.1.2.1. EFECTO DE LAS VIOLACIONES DE LAS ASUNCIONES

El estadístico *F* (el característico del ANOVA) es muy robusto (fiable) frente a las violaciones de las anteriores asunciones. Sin embargo, una situación en la que el estadístico *F* puede resultar equívoco, es la que se da cuando las medias se correlacionan con las varianzas a través de las celdas

del diseño. Una representación gráfica de las varianzas o de las desviaciones estándar mediante una nube de puntos detectará esas correlaciones. La razón por la cual este tipo de violación es peligrosa es la siguiente: Imagínese que tenemos 8 casillas en el diseño, siete de las cuales contienen medias iguales, y una, una media muy superior. El estadístico F puede sugerir un efecto estadísticamente significativo. Sin embargo, supóngase que también existe una varianza mucho mayor en la celda con la media más elevada, esto es, las medias y las varianzas se correlacionan a través de las celdas (cuanto mayor sea la media, mayor la varianza). En este caso, la elevada media en una celda es en realidad bastante poco fiable, como indica la gran varianza. No obstante, dado que el estadístico F global se basa en una estimación agregada de la varianza intra-celdas, esa media tan alta se identifica como significativamente diferente de las demás, cuando de hecho no es en absoluto diferente si la varianza intra-celdas fuera estimada a través de una única celda. Este patrón, una media alta y una varianza elevada en una única celda, ocurre con frecuencia cuando existen "outliers" (casos muy extremos) presentes en los datos. Uno o dos casos extremos en una celda con sólo 10 casos pueden sesgar notablemente la media, e incrementarán dramáticamente la varianza.

## 6.2. JUSTIFICACIÓN PARA LA ELECCIÓN DE LOS TEST ESTADÍSTICOS

Como primera medida, se exploró la distribución de las variables proliferación y apoptosis: en concreto, se determinó si ambas variables exhibían una distribución normal. En este sentido, el test de Kolmogorov-Smirnov para una muestra compara la función de distribución acumulada para una determinada variable con una distribución teórica bien especificada, que puede ser normal, uniforme, de Poisson, o exponencial. El estadístico Z de Kolmogorov-Smirnov se obtiene a partir de la mayor diferencia (en valor absoluto) entre las funciones de distribución acumulada teórica y observada. Este test de bondad de ajuste prueba si las observaciones podrían razonablemente haber tenido su origen en una distribución específica. El paquete estadístico empleado para este análisis (SPSS version 8.0) posibilita seleccionar explícitamente el tipo de distribución que se desea probar. Adicionalmente, permite establecer a priori el rigor del test (asumiendo únicamente asintotismo, permitiendo la aplicación de los experimentos de Monte Carlo o asumiendo exactitud).

En este estudio se asumió sólo asintotismo en base al elevado número de observaciones.

Como resultado de ese análisis resultó evidente ( $p < 0,0001$ ) que la distribución de la proliferación celular siguió una distribución no gaussiana. Por el contrario, la apoptosis observó una distribución normal (test de Kolmogorov-Smirnov no significativo).

**Tabla 5**

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		UNIDADES ABSORBANCIA
N		576
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	,19808
	Std. Deviation	,16491
Most Extreme Differences	Absolute	,138
	Positive	,138
	Negative	-,131
Kolmogorov-Smirnov Z		3,304
Asymp. Sig. (2-tailed)		,000

a. Test distribution is Normal.  
b. Calculated from data.

**Tabla 5:** Kolmogorov- Smirnov aplicado a los datos de proliferación, objetivando una distribución no normal

Con esa evidencia, y aplicando el teorema central del límite, y teniendo presentes las evidencias obtenidas tras los experimentos de Monte Carlo, se optó por el análisis de la varianza (ANOVA) unifactorial como test para el análisis de las variables proliferación y apoptosis.

**Tabla 6**

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		UNIDADES ABSORBANCIA
N		101
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	1.3730346
	Std. Deviation	.7384443
Most Extreme Differences	Absolute	,120
	Positive	,120
	Negative	-,078
Kolmogorov-Smirnov Z		1,206
Asymp. Sig. (2-tailed)		,109

a. Test distribution is Normal.  
b. Calculated from data.

**Tabla 6:** Kolmogorov-Smirnov aplicado a los datos de apoptosis, objetivando una distribución normal.

## RESULTADOS

No obtuvimos diferencias en términos de proliferación en presencia o ausencia de dihidrotestosterona (DHT). Analizando el medio de cultivo FCS obtuvimos una concentración de testosterona total de 4 ng / dl; esta concentración explicaría por qué no se producen modificaciones en la proliferación celular, a pesar de que las células LNCaP sean andrógeno-sensibles.

#### **A. Proliferación**

Obtuvimos una inhibición significativa de la proliferación celular a las 24 horas de incubación con rutina (50  $\mu$ M y 75  $\mu$ M), morina (75  $\mu$ M), ácido tánico (10  $\mu$ M) y ácido gálico (10  $\mu$ M). Los resultados se expresan en la tabla 7.

Tabla 7

NUTRIENTE	DÓSIS ( $\mu$ M)	ABSORBANCIA (U.A.)	p
Control		0.068	
Quercetina	1	0.089	0.102
Quercetina	5	0.07	0.883
Quercetina	10	0.059	0.370
Rutina	25	0.537	0.312
Rutina	50	0.04	<b>0.01</b>
Rutina	75	0.034	<b>0.005</b>
Morina	25	0.051	0.204
Morina	50	0.053	0.273
Morina	75	0.038	<b>0.024</b>
Ácido Gálico	1	0.066	0.838
Ácido Gálico	5	0.059	0.429
Ácido Gálico	10	0.041	<b>0.012</b>
Ácido Tánico	1	0.067	0.936
Ácido Tánico	5	0.04	0.528
Ácido Tánico	10	0.036	<b>0.005</b>

**Tabla 7.-** Inhibición de la proliferación celular a las 24 horas. La intensidad en la coloración y, por tanto, los valores de absorbancia se correlacionan directamente con la síntesis de ADN y, en consecuencia, con el número de células proliferantes en cada uno de las condiciones a estudio. P: En negrita valores estadísticamente significativos.

A las 48 horas obtuvimos inhibición significativa del crecimiento celular con rutina 75  $\mu\text{M}$ , morina 50  $\mu\text{M}$ , y ácidos tánico y gálico a 10  $\mu\text{M}$ . Los resultados se representan en la tabla 8.

**Tabla 8**

<b>NUTRIENTE</b>	<b>DOSIS</b> ( $\mu\text{M}$ )	<b>ABSORBANCIA</b> (U.A.)	<b>p</b>
Control		0.151	
Quercetina	1	0.155	0.09
Quercetina	5	0.109	0.14
Quercetina	10	0.104	0.09
Rutina	25	0.095	0.08
Rutina	50	0.090	0.07
Rutina	75	0.073	<b>0.011</b>
Morina	25	0.138	0.10
Morina	50	0.113	<b>0.018</b>
Morina	75	0.103	0.062
Ácido Gálico	1	0.154	0.942
Ácido Gálico	5	0.107	0.146
Ácido Gálico	10	0.078	<b>0.009</b>
Ácido Tánico	1	0.135	0.589
Ácido Tánico	5	0.097	0.067
Ácido Tánico	10	0.058	<b>0.002</b>

**Tabla 8.-** Inhibición de la proliferación celular a las 48 horas. La intensidad en la coloración y, por tanto, los valores de absorbancia se correlacionan directamente con la síntesis de ADN y, en consecuencia, con el número de células proliferantes en cada uno de las condiciones a estudio. P: En negrita valores estadísticamente significativos.

Inhibición significativa de la proliferación también se obtuvo a las 72 horas con quercetina (10  $\mu\text{M}$ ), rutina (75  $\mu\text{M}$ ), ácido tánico (5  $\mu\text{M}$ ), y ácido gálico (10  $\mu\text{M}$ ). Tabla 9.

**Tabla 9**

<b>NUTRIENTE</b>	<b>DOSIS</b> ( $\mu\text{M}$ )	<b>ABSORBANCIA</b> (U.A.)	<b>p</b>
Control		0.333	
Quercetina	1	0.347	0.825
Quercetina	5	0.260	0.64
Quercetina	10	0.200	<b>0.037</b>
Rutina	25	0.241	0.137
Rutina	50	0.281	0.10
Rutina	75	0.173	<b>0.016</b>
Morina	25	0.350	0.79
Morina	50	0.242	0.11
Morina	75	0.226	0.059
Ácido Gálico	1	0.349	0.817
Ácido Gálico	5	0.222	0.10
Ácido Gálico	10	0.110	<b>0.001</b>
Ácido Tánico	1	0.326	0.916
Ácido Tánico	5	0.180	<b>0.023</b>
Ácido Tánico	10	0.090	<b>0.001</b>

**Tabla 9.-** Inhibición de la proliferación celular a las 72 horas. La intensidad en la coloración y, por tanto, los valores de absorbancia se correlacionan directamente con la síntesis de ADN y, en consecuencia, con el número de células proliferantes en cada uno de las condiciones a estudio. P: En negrita valores estadísticamente significativos.

A las 96 horas diferencias significativas se observaron con quercetina (5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ), rutina (50  $\mu\text{M}$  y 75  $\mu\text{M}$ ), morina (50  $\mu\text{M}$  y 75  $\mu\text{M}$ ), ácidos tánico y gálico (5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ). Tabla 10.

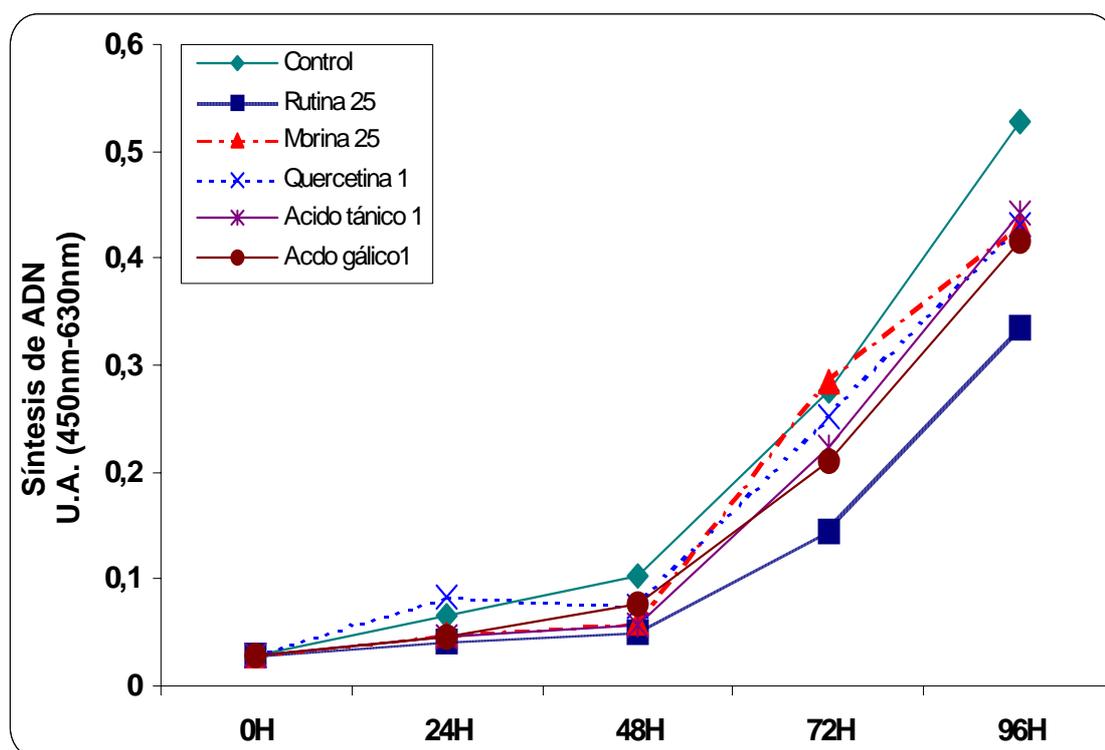
**Tabla 10**

<b>NUTRIENTE</b>	<b>DOSIS</b> ( $\mu\text{M}$ )	<b>ABSORBANCIA</b> (U.A.)	<b>p</b>
Control		0.554	
Quercetina	1	0.534	0.555
Quercetina	5	0.445	<b>0.01</b>
Quercetina	10	0.357	<b>0.001</b>
Rutina	25	0.421	<b>0.01</b>
Rutina	50	0.344	<b>0.001</b>
Rutina	75	0.250	<b>0.001</b>
Morina	25	0.501	0.17
Morina	50	0.359	<b>0.001</b>
Morina	75	0.312	<b>0.001</b>
Ácido Gálico	1	0.054	0.18
Ácido Gálico	5	0.373	<b>0.001</b>
Ácido Gálico	10	0.178	<b>0.001</b>
Ácido Tánico	1	0.548	0.85
Ácido Tánico	5	0.269	<b>0.001</b>
Ácido Tánico	10	0.127	<b>0.001</b>

**Tabla 10.-** Inhibición de la proliferación celular a las 96 horas. La intensidad en la coloración y, por tanto, los valores de absorbancia se correlacionan directamente con la síntesis de ADN y, en consecuencia, con número de células proliferantes en cada uno de las condiciones a estudio. P: En negrita valores estadísticamente significativos.

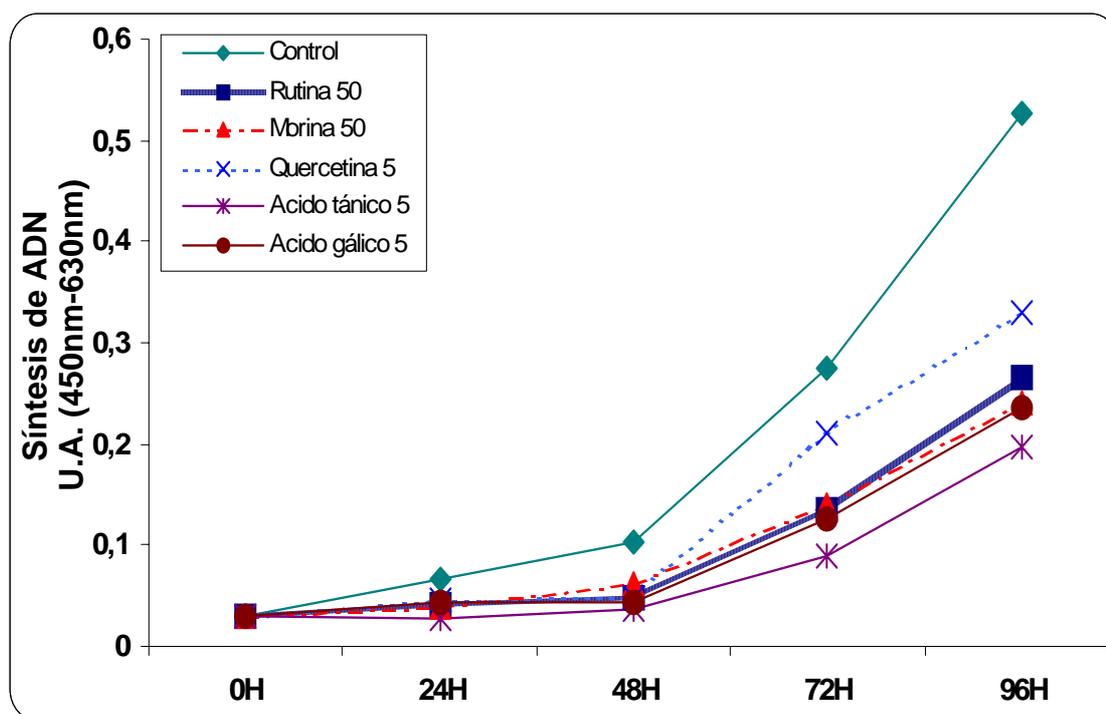
Representamos la inhibición de la proliferación de las células LNCaP inducida por los polifenoles a lo largo de las 96 horas del experimento con las diferentes dosis de cada nutriente en las figuras 14, 15 y 16.

Figura 14



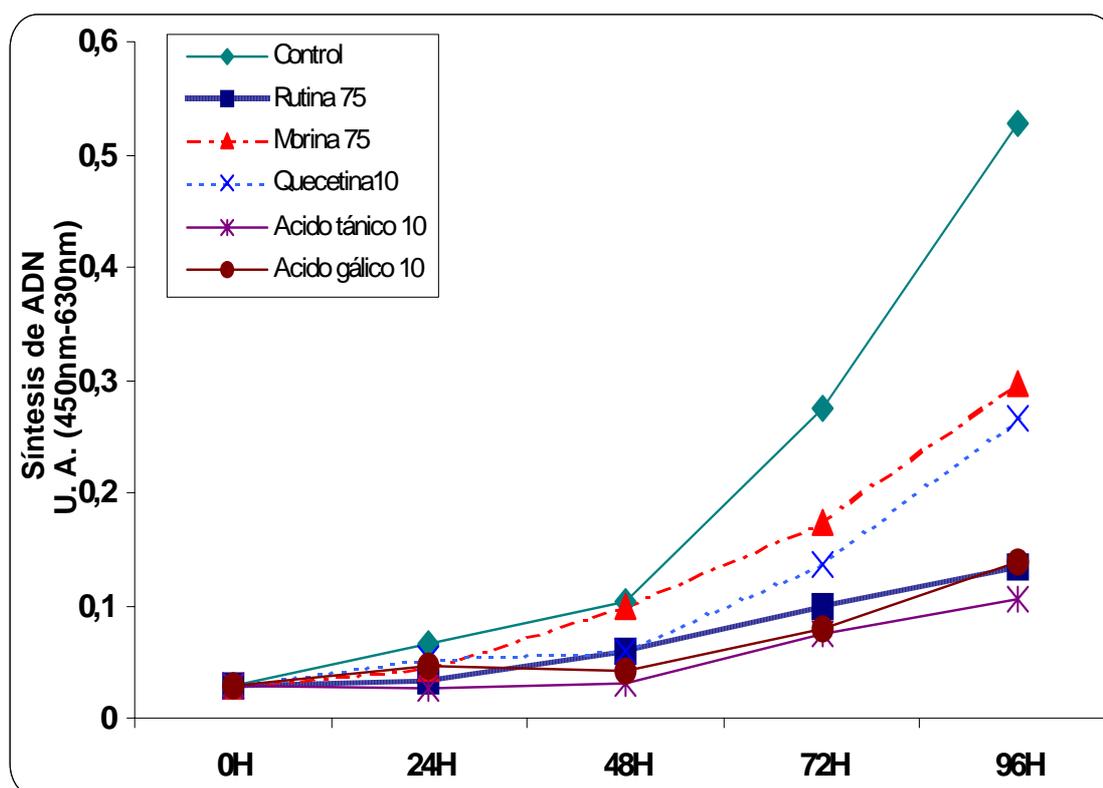
**Figura: 14.** Efecto de rutina 25  $\mu\text{M}$ , morina 25  $\mu\text{M}$ , quercetina 1  $\mu\text{M}$ , ácidos gálico 1  $\mu\text{M}$  y tánico 1  $\mu\text{M}$  sobre la proliferación de células LNCaP in vitro comparado con control a las 24, 48, 72 y 96 horas. La absorbancia (U.A.) expresa la síntesis de ADN (una forma directa de establecer la proliferación celular). Los resultados se obtuvieron de la media de tres experimentos diferentes.

Figura 15



**Figura: 15.** Efecto de rutina 50  $\mu\text{M}$ , morina 50  $\mu\text{M}$ , quercetina 5  $\mu\text{M}$ , ácidos gálico 5  $\mu\text{M}$  y tánico 5  $\mu\text{M}$  sobre la proliferación de células LNCaP in vitro comparado con control a las 24, 48, 72 y 96 horas. La absorbancia (U.A.) expresa la síntesis de ADN (una forma directa de establecer la proliferación celular). Los resultados se obtuvieron de la media de tres experimentos diferentes.

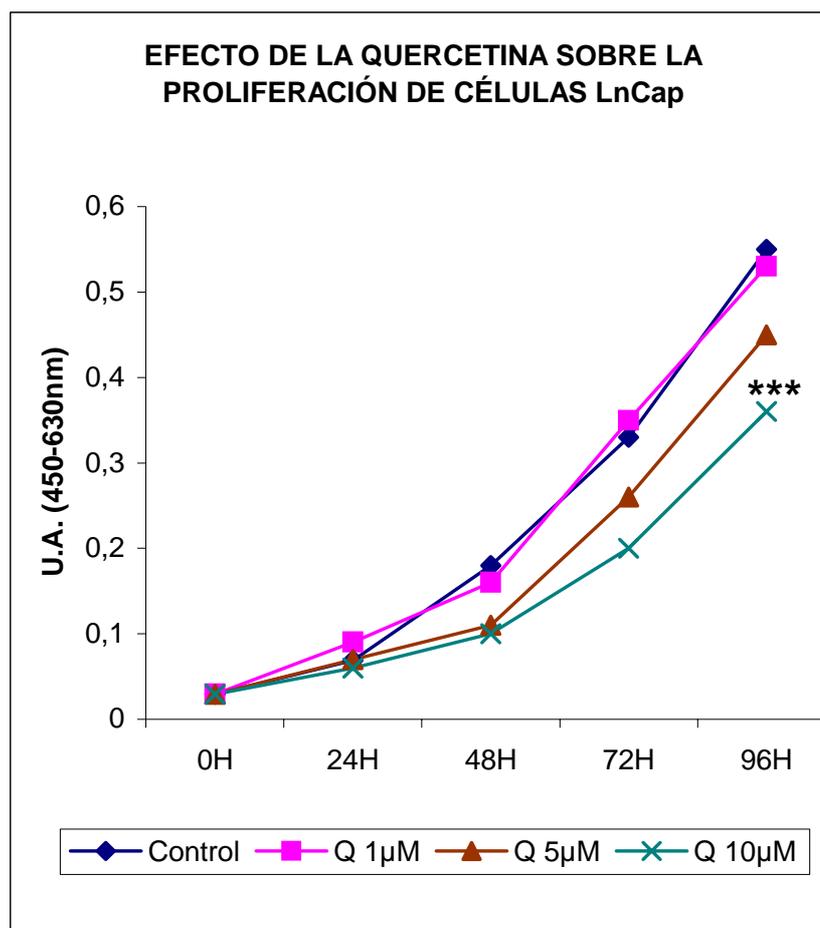
Figura 16



**Figura: 16.** Efecto de rutina 75  $\mu\text{M}$ , morina 75  $\mu\text{M}$ , quercetina 10  $\mu\text{M}$ , ácidos gálico 10  $\mu\text{M}$  y tánico 10  $\mu\text{M}$  sobre la proliferación de células LNCaP in vitro comparado con control a las 24, 48, 72 y 96 horas. La absorbancia (U.A.) expresa la síntesis de ADN (una forma directa de establecer la proliferación celular). Los resultados se obtuvieron de la media de tres experimentos diferentes.

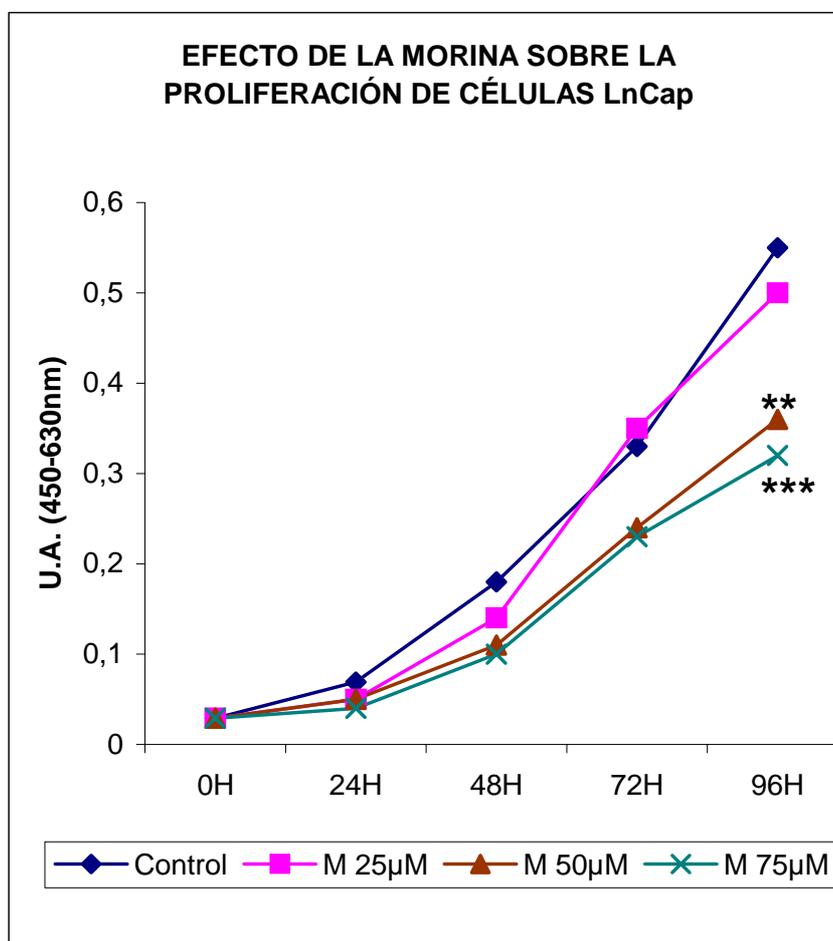
A continuación representamos la inhibición en proliferación celular durante las 96 horas de incubación, producida por cada nutriente.

Figura 17



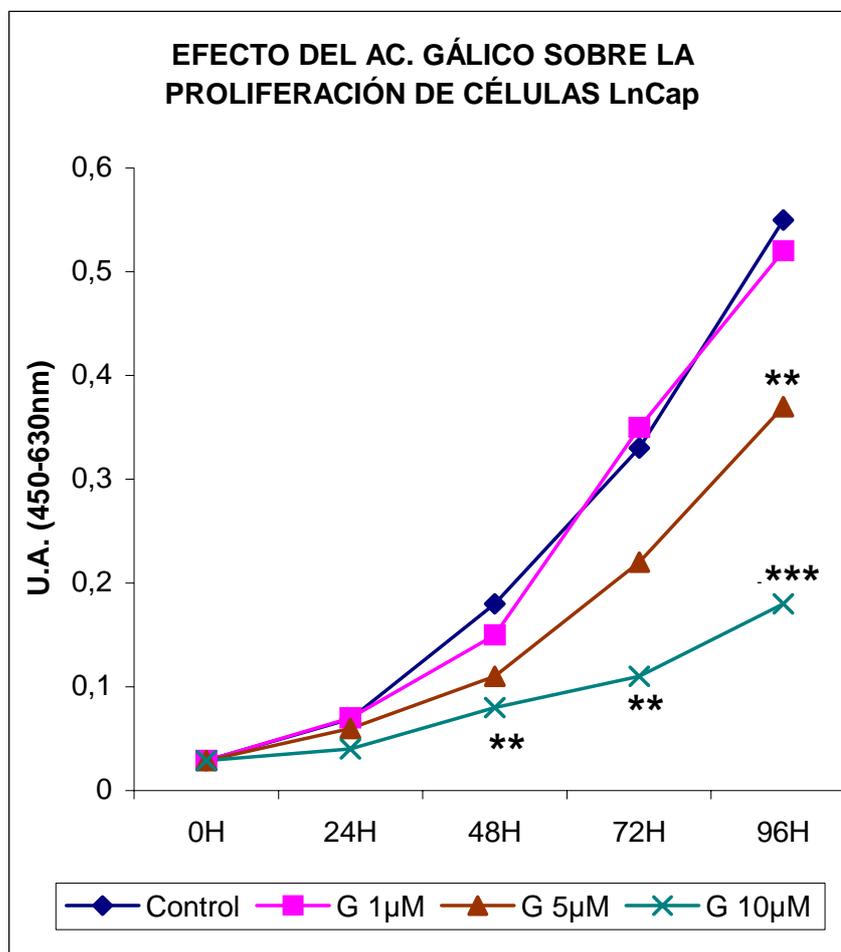
**Figura 17.** Inhibición de la proliferación inducida por quercetina tras 96 horas de incubación. La síntesis de ADN se representa en unidades de absorbancia (U.A). Significación estadística: \*\*\* probabilidad de una diferencia  $< 0.001$  con el control. Q 1:M: quercetina 1:M, Q 5:M: quercetina 5:M, y Q 10:M: quercetina 10:M.

Figura 18



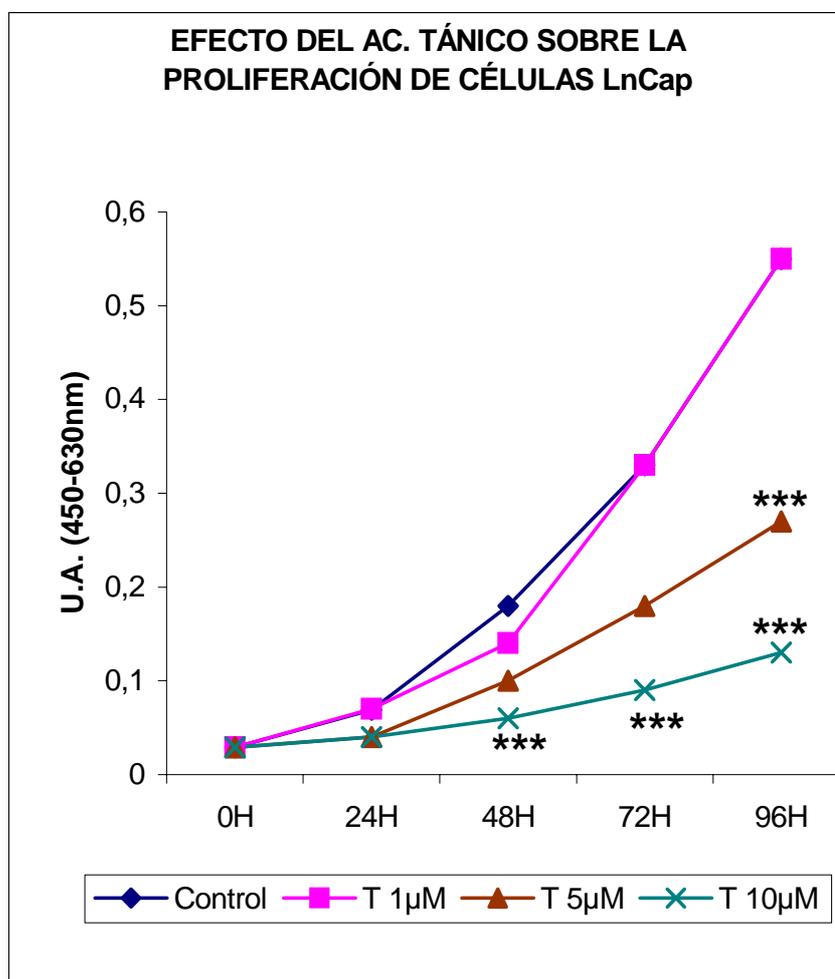
**Figura 18.** Inhibición de la proliferación inducida por morina tras 96 horas de incubación. La síntesis de ADN se representa en unidades de absorbancia (U.A). Significación estadística: \*\* probabilidad de una diferencia < 0.01 con el control.\*\*\* probabilidad de una diferencia < 0.001 con el control. M 25:M: morina 25:M, M 50:M: morina 50:M, y M 75:M: morina 75:M

Figura 19



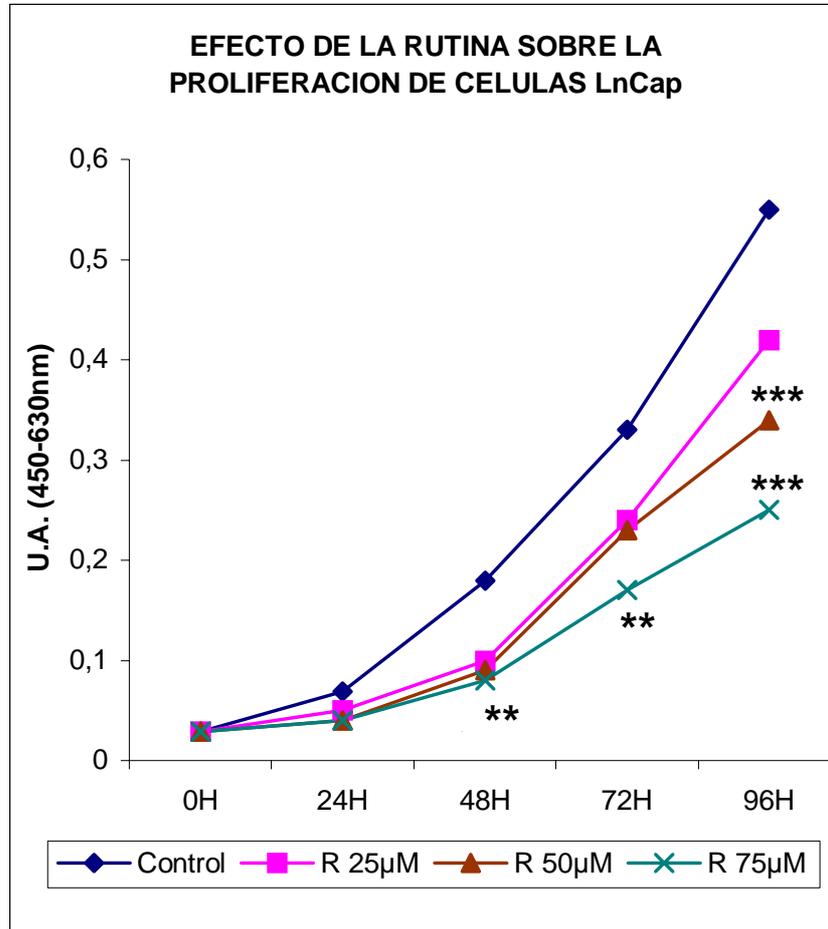
**Figura 19.** Inhibición de la proliferación inducida por ácido gálico tras 96 horas de incubación. La síntesis de ADN se representa en unidades de absorbancia (U.A). Significación estadística: \*\* probabilidad de una diferencia  $< 0.01$  con el control. \*\*\* probabilidad de una diferencia  $< 0.001$  con el control. G 1:M: ácido gálico 1:M, G 5:M: ácido gálico 5:M, y G 10:M: ácido gálico 10:M

Figura 20

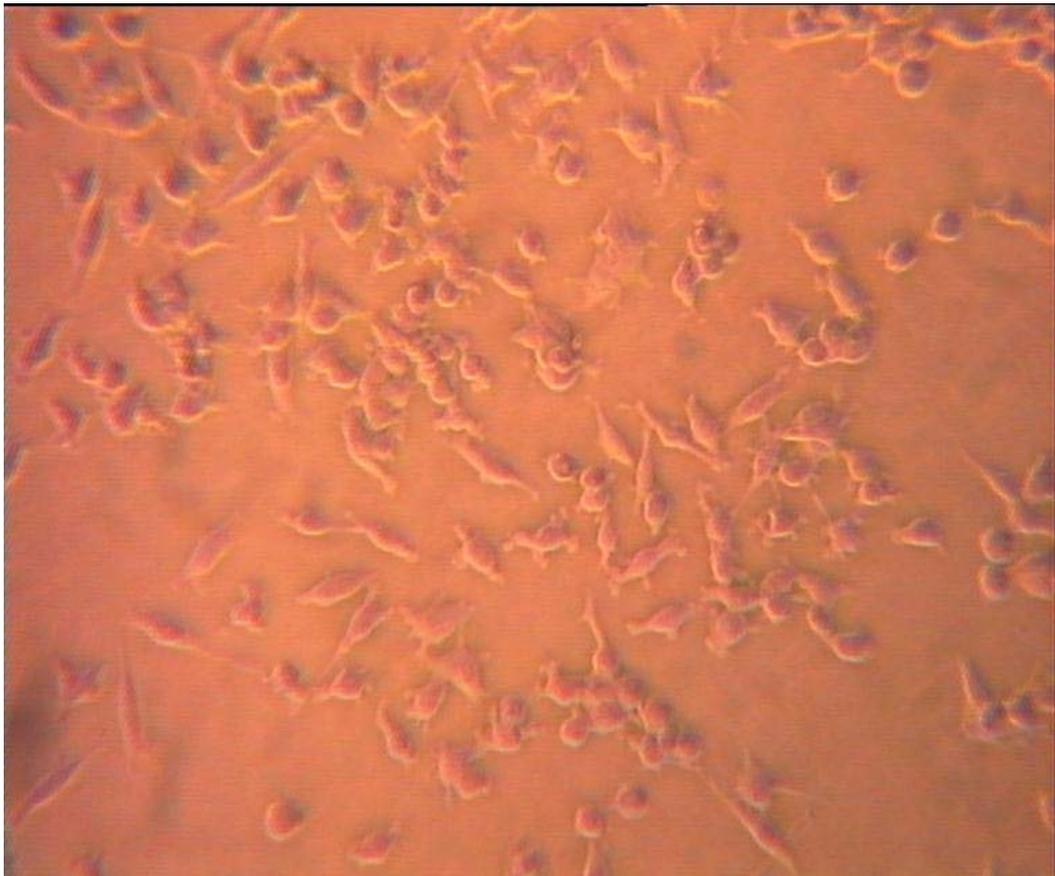


**Figura 20.** Inhibición de la proliferación inducida por ácido tánico tras 96 horas de incubación. La síntesis de ADN se representa en unidades de absorbancia (U.A). Significación estadística: \*\*\* probabilidad de una diferencia < 0.001 con el control. T 1:M: ácido tánico 1:M, T 5:M: ácido tánico 5:M, y T 10:M: ácido Tánico 10:M.

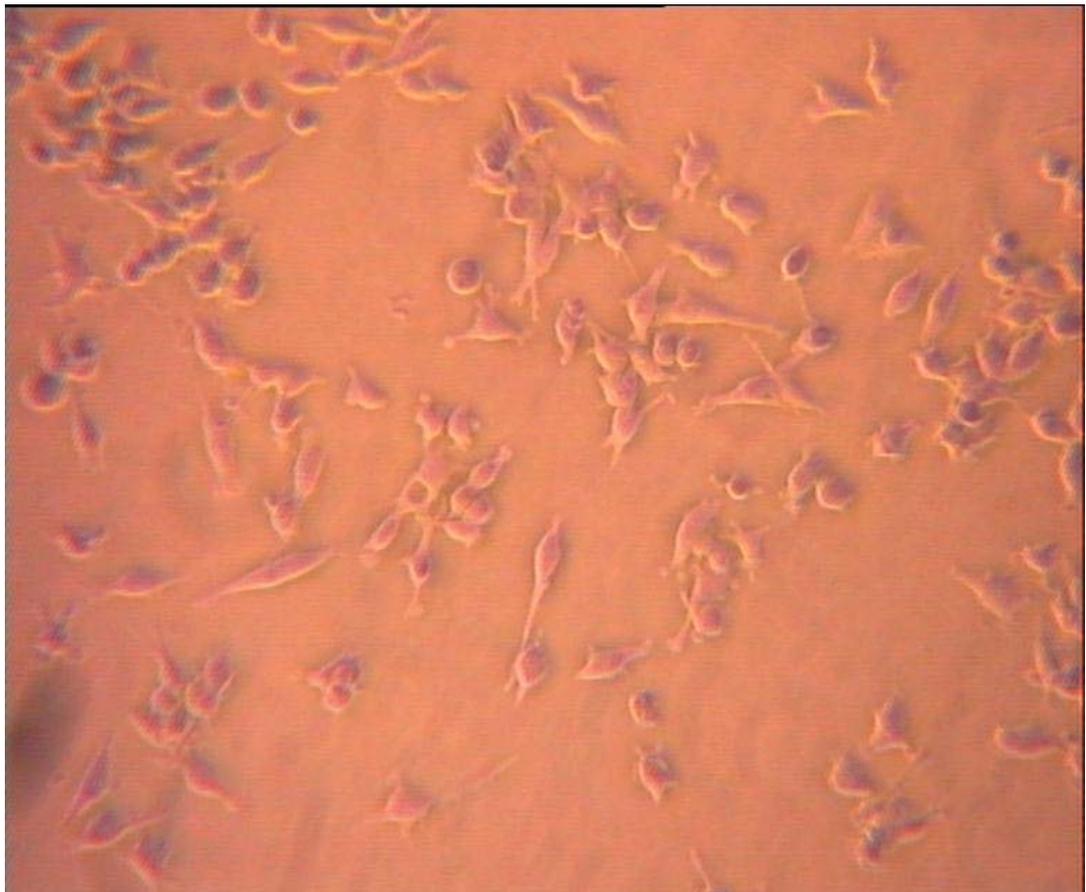
Figura 21



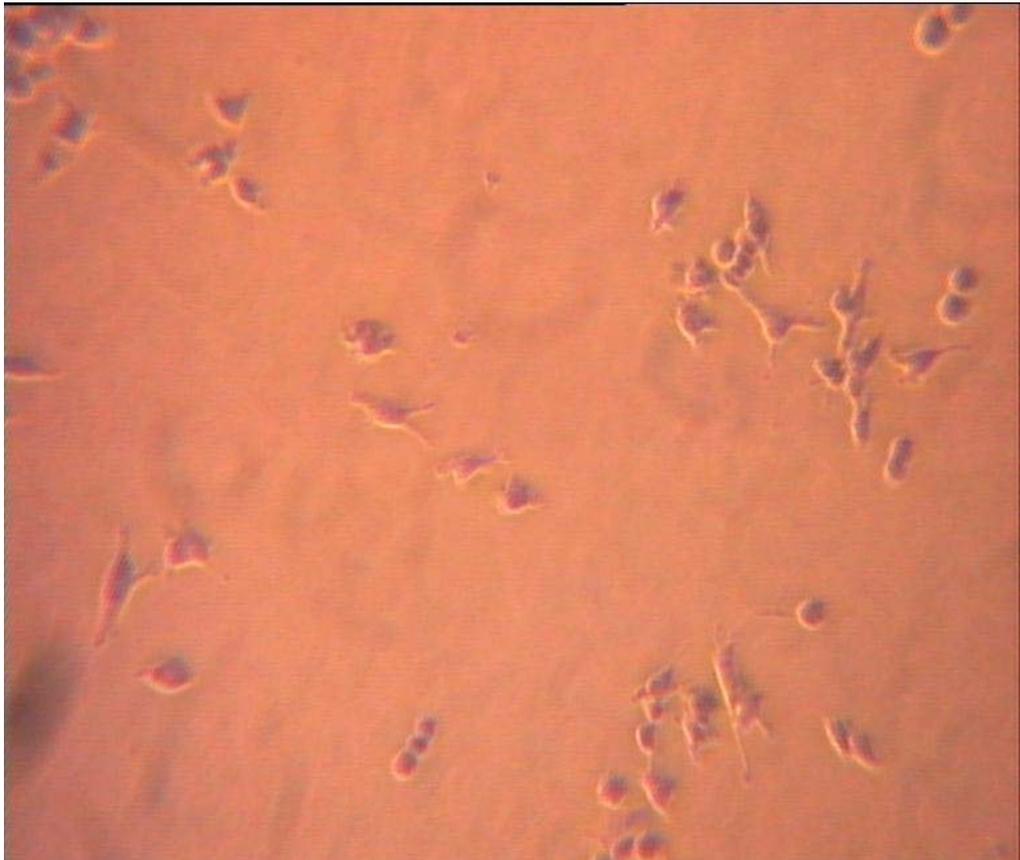
**Figura 21.** Inhibición de la proliferación inducida por rutina tras 96 horas de incubación. La síntesis de ADN se representa en unidades de absorbancia (U.A). Significación estadística: \*\* probabilidad de una diferencia < 0.01 con el control. \*\*\* probabilidad de una diferencia < 0.001 con el control. R 1:M: rutina 1:M, R 5:M: rutina 5:M, y R 10:M: rutina 10:M.

**Figura 22**

**Figura 22:** Células LnCap en medio de cultivo RPMI-1640 con 5% FCS. Aspecto de las placas de cultivo tras 24 horas de incubación con Ácido Tánico 10 $\mu$ M. Microscopía óptica 20x.

**Figura 23**

**Figura 23:** Células LnCap en medio de cultivo RPMI-1640 con 5% FCS. Aspecto de las placas de cultivo tras 48 horas de incubación con Ácido Tánico 10 $\mu$ M; Microscopía óptica 20x.

**Figura 24**

**Figura 24:** - Células LnCap en medio de cultivo RPMI-1640 con 5% FCS. Aspecto de las placas de cultivo tras 96 horas de incubación con Ácido Tánico 10 $\mu$ M; Microscopía óptica 20x.

## B. Apoptosis

A las 24 horas no se produjo inducción significativa de apoptosis con ningún nutriente utilizando las dosis que producían inhibición significativa de la proliferación. A partir de las 48 horas de incubación índices apoptóticos significativamente más altos ( $p < 0.01$ ) se obtuvieron en presencia de ácido gálico 5 y 10  $\mu\text{M}$ , tánico 5 y 10  $\mu\text{M}$ , y rutina 75  $\mu\text{M}$ , ( $p < 0.05$  comparados con el control). Este efecto se mantuvo durante las primeras 72 horas. El efecto de la morina 75  $\mu\text{M}$ , aunque significativo ( $p < 0.01$ ), sólo apareció a las 72 horas. Inversamente, quercetina 5 y 10  $\mu\text{M}$  indujeron apoptosis significativa ( $p < 0.05$ ) durante las primeras 48 horas comparada con el control. Tablas 11, 12 y 13 muestran los resultados de inducción apoptótica. Los resultados se expresan como un factor de enriquecimiento (EF), en mono y oligonucleosomas, el cual resultará del cociente entre la absorbancia de la muestra (células tratadas con los nutrientes) y la absorbancia del control (células no tratadas), cuanto mayor sea el factor de enriquecimiento, mayor será el grado de muerte celular.

**Tabla 11**

<b>Nutriente</b>	<b>Dosis (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Absorbancia (U.A.)</b>	<b>p</b>	<b>Factor de enriquecimiento</b>
Control		0.585		1
Quercetina	5	0.614	0.60	1.13
Quercetina	10	0.563	0.214	0.96
Rutina	50	0.524	0.297	0.89
Rutina	75	0.518	0.211	0.89
Morina	50	0.563	0.547	0.96
Morina	75	0.552	0.139	0.94
Ácido tánico	5	0.600	0.198	1.03
Ácido tánico	10	0.655	0.142	1.11
Ácido gálico	5	0.580	0.093	0.99
Ácido gálico	10	0.536	0.279	0.91

**Tabla 11.- U.A.:** media de absorbancia de nueve experimentos. **P:** Significancia comparada con el control a las 24 horas. **Factor de enriquecimiento:** enriquecimiento en oligo y mononucleosomas liberados al citoplasma a las 24 horas. Control actua como estándar con un valor de 1.

Tabla 12

<b>Nutriente</b>	<b>Dosis</b> ( $\mu$ M)	<b>Absorbancia</b> (U.A.)	<b>P</b>	<b>Factor de enriquecimiento</b>
Control		0.595		1
Quercetina	5	0.879	<b>&lt; 0.05</b>	2.3
Quercetina	10	0.995	<b>&lt; 0.01</b>	2.8
Rutina	50	1.00	<b>&lt; 0.05</b>	1.4
Rutina	75	1.099	0.39	1.5
Morina	50	0.888	0.25	1.3
Morina	75	1.050	0.11	1.3
Ácido tánico	5	0.693	<b>&lt; 0.01</b>	2.8
Ácido tánico	10	0.707	<b>&lt; 0.01</b>	3.3
Ácido gálico	5	0.652	<b>&lt; 0.001</b>	2.3
Ácido gálico	10	0.651	<b>&lt; 0.001</b>	3.1

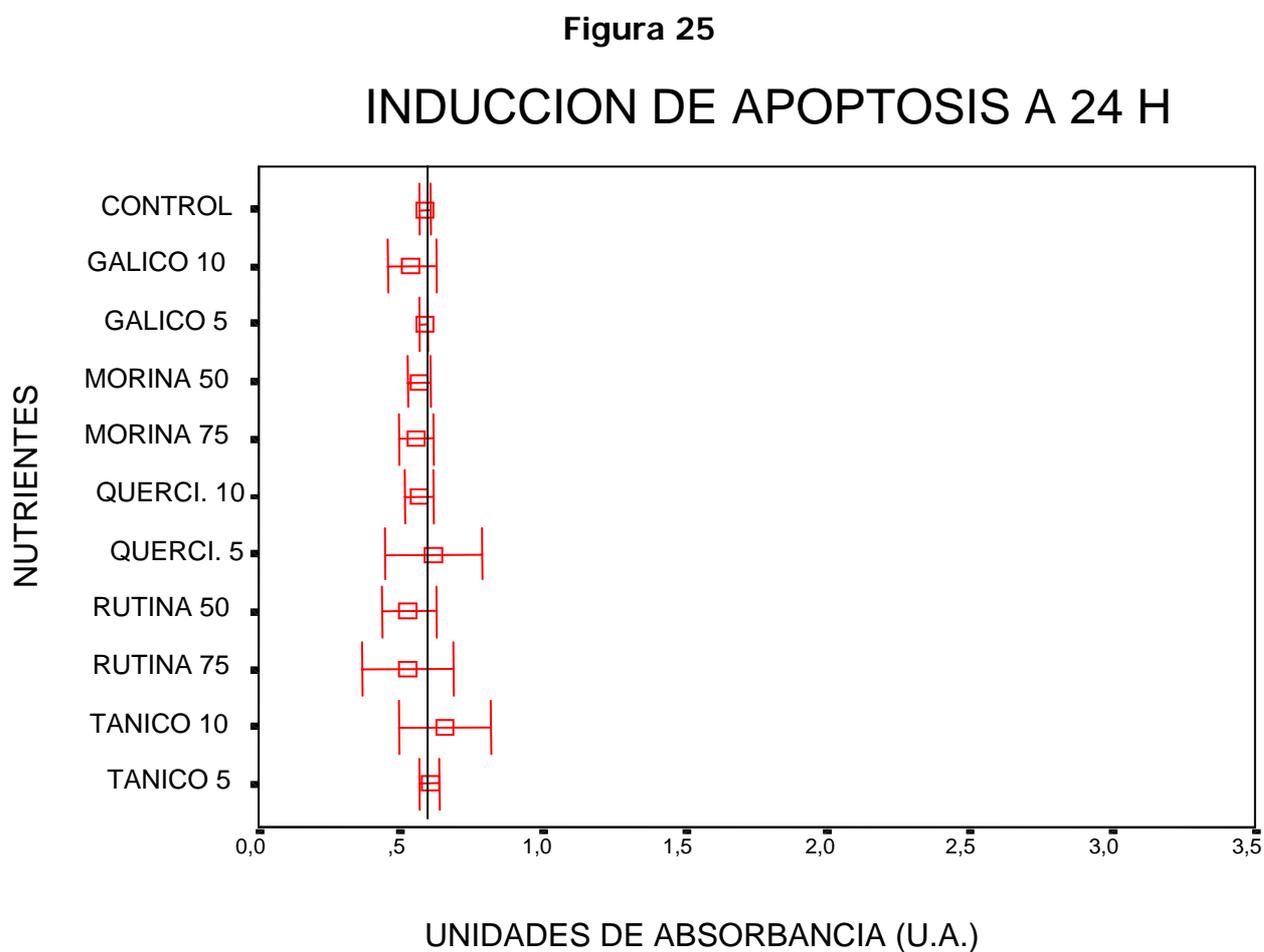
**Tabla 12.- U.A.:** media de absorbancia de nueve experimentos. **P:** Significancia comparada con el control a las 48 horas, en negrita los valores estadísticamente significativos. **Factor de enriquecimiento:** enriquecimiento en oligo y mononucleosomas liberados al citoplasma a las 48 horas. Control actúa como estandar con un valor de 1.

Tabla 13

<b>Nutriente</b>	<b>Dosis</b> ( $\mu\text{M}$ )	<b>Absorbancia</b> (U.A.)	<b>P</b>	<b>Factor de enriquecimiento</b>
Control		1.48		
Quercetina	5 $\mu\text{M}$	1.51	0.80	1
Quercetina	10 $\mu\text{M}$	1.40	0.48	0.9
Rutina	50 $\mu\text{M}$	2.01	< 0.05	1.6
Rutina	75 $\mu\text{M}$	2.83	< <b>0.05</b>	1.3
Morina	50 $\mu\text{M}$	2.80	0.88	1
Morina	75 $\mu\text{M}$	2.53	< <b>0.01</b>	1.5
Ácido tánico	5 $\mu\text{M}$	2.21	< <b>0.01</b>	1.5
Ácido tánico	10 $\mu\text{M}$	1.84	< <b>0.001</b>	2.2
Ácido gálico	5 $\mu\text{M}$	1.47	< <b>0.001</b>	2.1
Ácido gálico	10 $\mu\text{M}$	2.11	< <b>0.001</b>	1.9

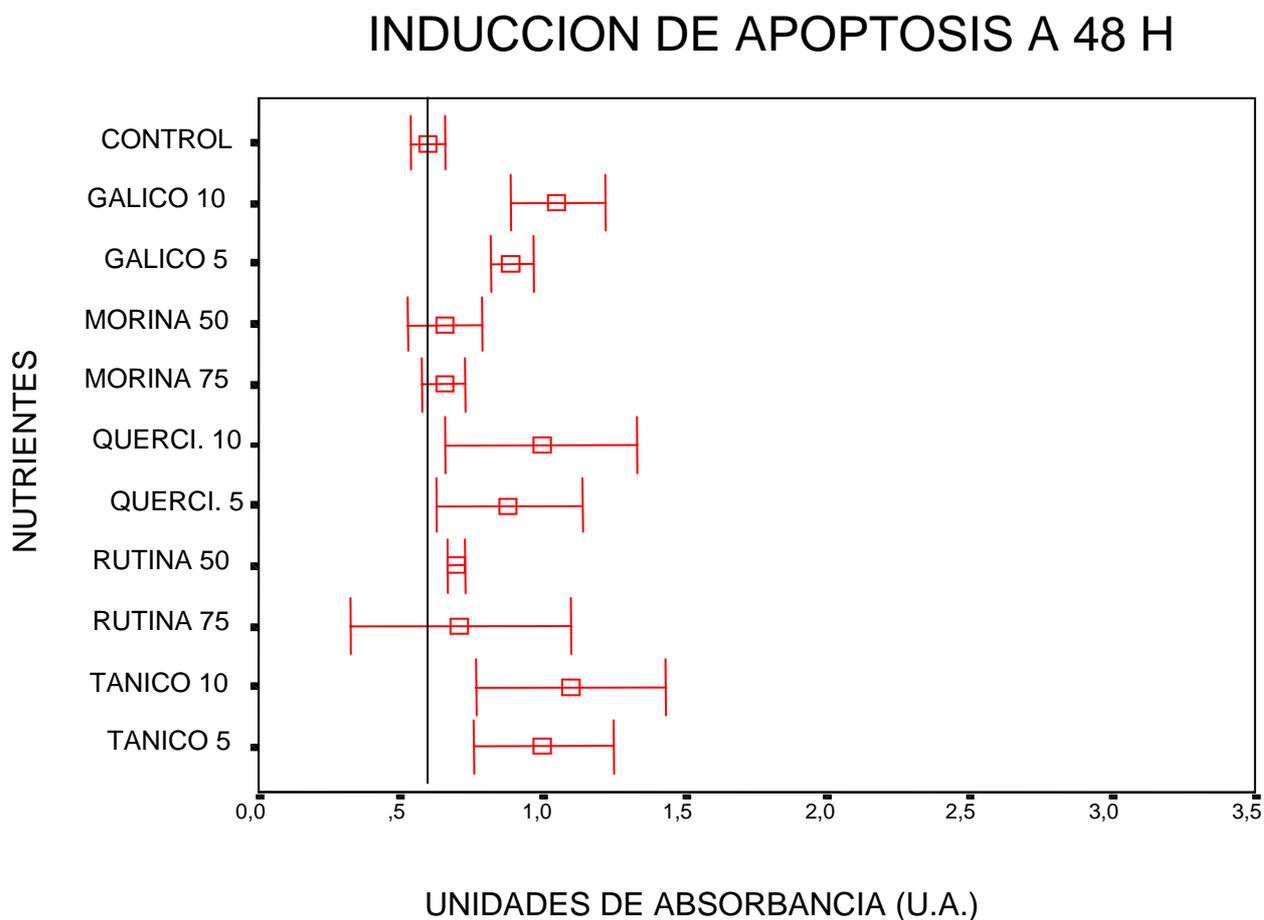
**Tabla 16.- U.A.:** media de absorbancia de nueve experimentos. **P:** Significancia comparada con el control a las 24 horas, en negrita los valores estadísticamente significativos. **Factor de enriquecimiento:** enriquecimiento en oligo y mononucleosomas liberados al citoplasma a las 72 horas. Control actua como estandar con un valor de 1.

Las figuras 25, 26 y 27 representan ANOVAS de la inducción apoptótica mediada por los polifenoles en relación al control.



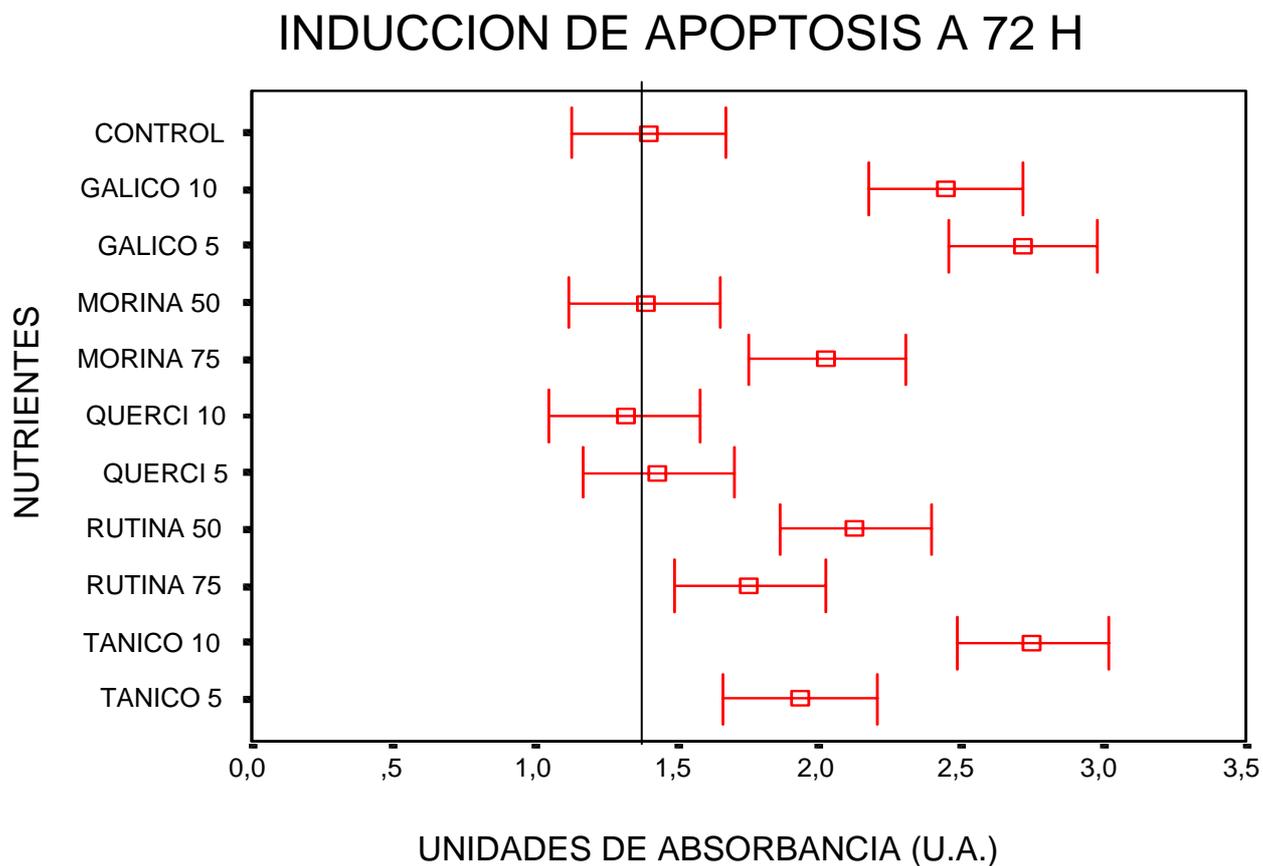
**Figura 25.** ANOVA de la inducción apoptótica por ácido gálico (5 y 10  $\mu$ M), morina (50 y 75  $\mu$ M), quercetina (5 y 10  $\mu$ M), rutina (50 y 75  $\mu$ M) y ácido tánico (5 y 10  $\mu$ M), comparada con el control tras 24 horas de incubación. La línea vertical representa la media de los 9 resultados del control.

Figura 26



**Figura 26.** ANOVA de la inducción apoptótica por ácido gálico (5 y 10 $\mu$ M), morina (50 y 75  $\mu$ M), quercetina (5 y 10  $\mu$ M), rutina (50 y 75  $\mu$ M) y ácido tánico (5 y 10  $\mu$ M), comparada con el control tras 48 horas de incubación. La línea vertical representa la media de los 9 resultados del control.

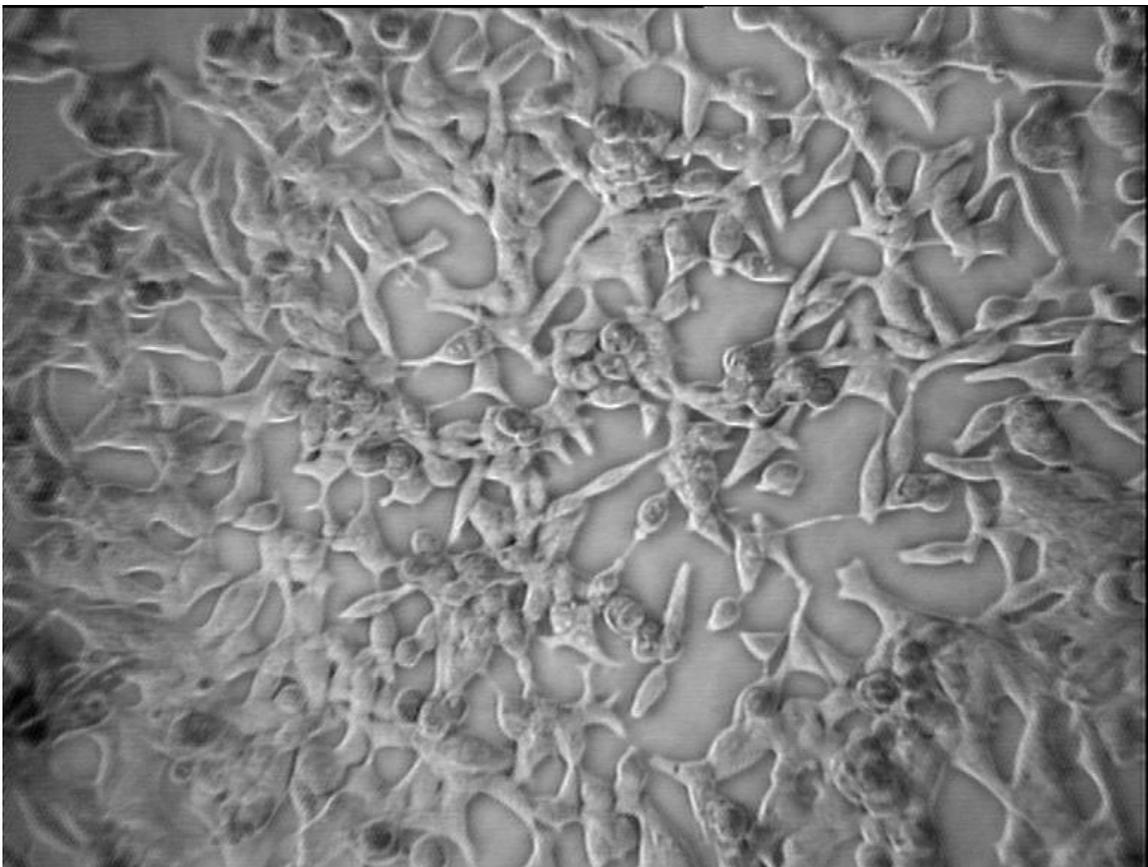
Figura 27



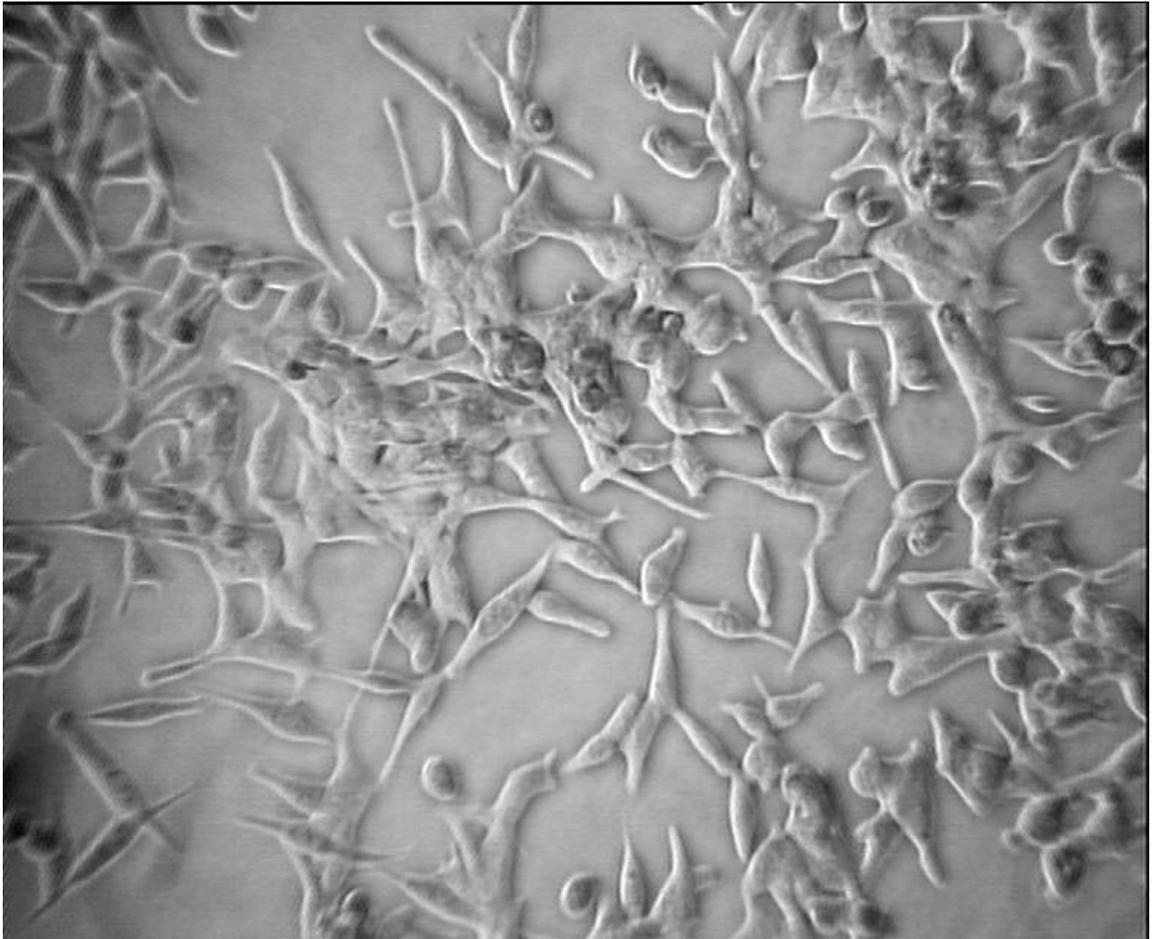
**Figura 27.** ANOVA de la inducción apoptótica por ácido gálico (5 y 10  $\mu\text{M}$ ), morina (50 y 75  $\mu\text{M}$ ), quercetina (5 y 10  $\mu\text{M}$ ), rutina (50 y 75  $\mu\text{M}$ ) y ácido tánico (5 y 10  $\mu\text{M}$ ), comparada con el control tras 72 horas de incubación. La línea vertical representa la media de los 9 resultados del control.

Las figuras 28, 29 y 30 son fotos de microscopía óptica a 20 aumentos, en las que observamos la diferente densidad celular tras la inducción apoptótica por ácido gálico a concentración de 10  $\mu$ M a las 48 y 72 horas.

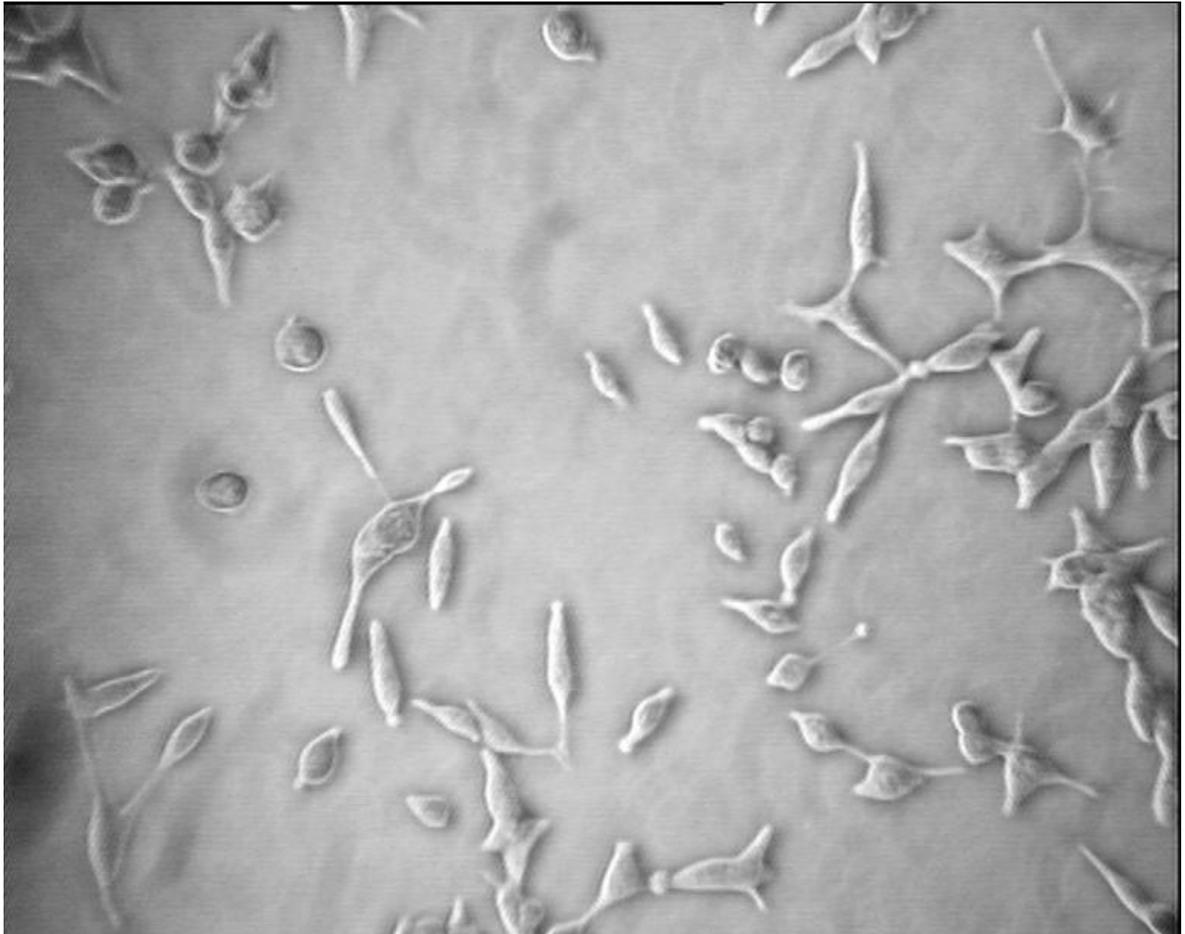
**Figura 28**



**Figura 28:** Células LnCap en medio de cultivo RPMI-1640 con 5% FCS. Aspecto de las placas de cultivo a las 24 horas de la siembra; Microscopía óptica 20x.

**Figura 29**

**Figura 29:** Células LnCap en medio de cultivo RPMI-1640 con 5% FCS. Aspecto de las placas de cultivo a las 48 horas de la siembra, tras incubación con ácido gálico 10  $\mu$ M; Microscopía óptica 20x.

**Figura 30**

**Figura 30:** - Células LnCap en medio de cultivo RPMI-1640 con 5% FCS.

Aspecto de las placas de cultivo a las 72 horas de la siembra, tras incubación con ácido gálico 10  $\mu$ M; Microscopía óptica 20x.

## DISCUSIÓN

## 1. ASPECTOS GENERALES

El CP es una de las patologías más importantes en nuestros días y se estima que en los próximos 5 o 10 años será la primera causa de muerte por cáncer en los Estados Unidos y en otros países desarrollados [117].

La inducción del cáncer parece que ser un proceso multiescalonado, e incluye las fases de iniciación y promoción. La mayoría de los cánceres presentan un período de latencia entre 10 y 20 años, proporcionándonos la posibilidad de actuar contra ellos con medidas preventivas.

Las características del CP -alta prevalencia, larga latencia, "screening" deficiente y, mortalidad y morbilidad significativas-, lo convierten en un buen candidato para la quimioprevención [16].

## 2. QUIMIOPREVENCIÓN

Una interesante forma para luchar contra el cáncer, radica en la posibilidad de quimioprevención.

La quimioprevención persigue reducir la probabilidad de desarrollar una enfermedad, administrando una sustancia determinada a individuos sanos [12].

La quimioprevención cuando se trata de prevenir una enfermedad tumoral, consiste en la prevención o prolongación del comienzo de la carcinogénesis, utilizando agentes para prevenir, suprimir o revertir la transformación maligna.

Los agentes quimiopreventivos se pueden clasificar como bloqueantes o supresores. Los agentes bloqueantes se cree que actúan previniendo el efecto inicial de los agentes carcinogénicos bloqueando su interacción con los receptores diana. Los agentes supresores, sin embargo, parecen suprimir la evolución y propagación de un proceso neoplásico ya inducido [118].

Las diferencias entre quimioprevención y quimioterapia son claras:

A.- La quimioprevención actúa sobre la carcinogénesis, encontrándose los mecanismos de control celular intactos y, estableciendo unos objetivos más definidos, que cuando se trata de prevenir el desarrollo de la enfermedad invasiva [16].

La quimioprevención es a largo plazo incluso, en ocasiones, a lo largo de toda la vida. Por esta razón, los agentes que se utilicen deben tener mínima toxicidad.

B.- La quimioterapia se administra en cortos períodos de tiempo, o en ciclos establecidos y controlados por el médico, para así poder detectar precozmente los efectos secundarios y tratarlos rápidamente [16].

La utilización de micronutrientes para la quimioprevención del cáncer, se basa en evidencias de epidemiología humana, resultados de algunos ensayos clínicos, y estudios de modelos animales de carcinogénesis [57].

Algunos agentes quimiopreventivos que han sido o están siendo estudiados actualmente, así como los mecanismos a través de los cuales actuarían, se resumen en la tabla 14.

**Tabla 14**

MECANISMO QUIMIOPREVENTIVO	EJEMPLOS DE AGENTES CAUSANTES
Inhibidores esteroideos de 5 $\alpha$ -reductasa	Finasteride
Retinoides	Ácido 9- <i>cis</i> -retinóico
RAMBA (Bloqueante del metabolismo del Ácido Retinoíco)	Liarozole
Antiproliferativos	DFMO, análogos de la Dihidrotestosterona
Inductores de apoptosis	Alcohol perillyl y congéneres
Agentes sobre la diferenciación	Análogos de la vitamina D
Antioxidantes	Vitamina E, selenio, licopenos.
Agentes estimuladores de GSH	Oltipraz
Antiestrógenos	Toremifene, tamoxifén, raloxifén, Serm-3
Antiandrógenos	Leuprolide, flutamida
Inhibidores de la aromatasa	Vorozole
Inhibidores de angiogénesis	Linomide
Reguladores de la señal de transducción	Genistéina
Inhibidores de la 5-lipoxygenasa	Zileuton
Antagonistas de receptor de leucotrienos	Zafirlukast
Anti-inflamatorios no esteroideos	Inhibidores de COX-2

**Tabla 14:** Factores de quimioprevención y sus mecanismos de acción.

El agente quimiopreventivo ideal, debería ser eficaz, no-tóxico, barato y fácilmente disponible. Este puede formar parte de una dieta modificada, o puede ser sintetizado. Los compuestos dietéticos tienen el beneficio añadido de que con ellos hay gran experiencia, incluyendo amplios estudios epidemiológicos, los cuales ayudan a definir su seguridad y eficacia en humanos [119].

El CP representa un blanco de primer orden para realizar estudios de quimiopreención por sus factores de riesgo conocidos, dependencia hormonal y lesiones precursoras bien establecidas [56].

Algunos agentes presentan varios mecanismos de acción como agentes quimiopreventivos como, por ejemplo, el selenio (que actúa como antioxidante, inductor de apoptosis, inhibidor del metabolismo de aminoácidos, inmunoestimulante, etc.) o las isoflavonas de la soja (inhibidores de angiogénesis, antiestrogénicos, antioxidantes, inductores de apoptosis, inhibidores de la expresión de oncogenes, inhibidores de la tiroxina kinasa, etc.) [59].

Por otro lado, con muchos países en vías de desarrollo adoptando el estilo de vida y los hábitos dietéticos de los países occidentales, la

intervención y la educación pueden tener un gran efecto preventivo en la incidencia mundial del cáncer.

Numerosos datos apuntan a que las diferencias regionales en la incidencia del cáncer pueden deberse a factores dietéticos. Esta teoría se sustenta en los cambios observados en las tasas de incidencia en inmigrantes que se desplazaron de áreas con bajo riesgo a países donde el riesgo era mayor [61].

Esos cambios se confirmaron con los datos de inmigrantes chinos y japoneses que emigraron a Hawaii, o al territorio continental de los Estados Unidos, en los cuales el riesgo de desarrollar CP o de mama (previamente bajo) se incrementa hasta igualar al de la población autóctona en pocas generaciones [3].

Adlercreutz y colaboradores han establecido que algunos componentes de las dietas mediterráneas y asiática protegen contra el desarrollo del CP, y que la carencia de estos compuestos en la dieta occidental, constituiría un importante factor para el desarrollo de este cáncer [62].

Los asiáticos tienen una incidencia claramente inferior de CP si la comparamos con la de los occidentales. También los vegetarianos tienen una incidencia menor de CP en comparación con personas con dieta libre. Tanto los vegetarianos como los asiáticos tienen una dieta baja en grasa, con alto contenido en fibra, la cual, a la vez, les proporciona un importante suplemento de estrógenos débiles [3].

Los agentes quimiopreventivos se encuentran en múltiples ocasiones formando parte de las dietas habituales. Uno de los principales componentes de la dieta mediterránea tradicional es vino. En nuestro trabajo hemos pretendido analizar el factor protector de este como agente quimiopreventivo contra el CP.

## 2.1. EL VINO

El vino ha estado presente en la alimentación humana desde hace más de 6000 años. Según una cita de Omar Ibn Al Faridh (siglo XIII), "El vino es algo limpido que no es agua, algo fluido que no es aire, es una luz sin fuego y un espíritu sin cuerpo".

Pero, ¿qué es el vino realmente? El vino es fundamentalmente una solución hidro-alcohólica producto de la fermentación del mosto de la uva. Sin embargo, no es sólo agua ( $\approx 87\%$ ) y alcohol ( $\approx 10\%$ ), sino que contiene más de 500 compuestos diferentes: azúcares, ácidos, glicerol, polifenoles, aldehídos, vitaminas, etc. Los polifenoles están presentes en cantidades importantes en vinos tintos y, en menor, medida en los blancos, y contribuyen en gran parte a las cualidades deseables del vino, aunque no tienen valor nutritivo. Estos compuestos fenólicos pueden provenir de la uva (pieles y semillas) y del raspón, ser producidos por el metabolismo de las levaduras o extraídos de las cubas de madera y estar libres o esterificados. Los polifenoles son estructuras químicas con uno o más anillos fenólicos unidos entre sí, con un número variable de grupos hidroxilo. Para lograr una mayor solubilidad, habitualmente están conjugados, con frecuencia, con residuos sacáridos, lipídicos o carboxílicos. En función del pH, de la temperatura y de su grado de oxidación, se asociarían o disociarían entre sí [103].

Se conocen actualmente más de 8000 polifenoles, y se clasifican en dos grandes grupos:

1. No flavonoides.
  - 1.a. Ácidos fenólicos (benzoico, cinámico).
  - 1.b. Estilbenos (resveratrol).
  
2. Flavonoides.
  - 2.a. Flavonoles (quercetina y su derivado glucosilado, la rutina).
  - 2.b. Antocianinas.
  - 2.c. Flavanoles (catequina y epicatequina).
  - 2.d. Flavonas (luteonina y apigenina).
  - 2.e. Flavanonas (hesperidina).
  - 2.f. Proantocianidinas: oligómeros de unidades de catequina condensados.
  - 2.g. Taninos: polímeros de unidades de catequina condensados.

Las principales fuentes nutricionales de las diferentes familias de flavonoides son:

- Flavonolas: cebollas, col rizada, brócoli, manzanas, cerezas, té, y vino tinto.
- Flavonas: perejil y tomillo.
- Flavanonas: cítricos.
- Catequinas: manzanas y té.
- Antocianinas: cerezas y uvas.
- Isoflavonas: frijoles y legumbres.

En los vinos tintos los flavonoides constituyen normalmente más del 85% del contenido fenólico ( $\geq 1000$  mg/l), mientras que en los vinos blancos suele ser menos del 20% ( $\leq 50$  mg/l). Tabla 15 [104].

En el vino tinto los taninos, se forman por la polimerización de las antocianinas y de otros flavonoides, produciendo el característico color y sabor del vino [104].

**Tabla 15**

	Vino blanco	Vino tinto
No flavonoides		
Ácido gálico	7	95
Ácido caftárico	50	60
Flavonoides		
Antocianos	-	300
Flavonoles	Trazas	45
Flavanoles		
Catequina	35	190
Epicatequina	20	80
Procianidina B1	6	80
Procianidina B4	1,5	50

**Tabla 15.** Diferentes concentraciones de algunos compuestos fenólicos en el vino tinto y blanco (los valores representan el valor medio de los valores obtenidos en diferentes vinos). Tomada de Cabanis et al (1998).

Aun cuando existían referencias previas, el papel cardioprotector del vino se popularizó a partir de la publicación del grupo de Renaud de la llamada "paradoja francesa", por la cual se argumentaba que el moderado consumo de vino tinto en aquel país, era responsable de la baja mortalidad cardiovascular a pesar de tener unos niveles de colesterol similares a los americanos y con un consumo de grasas similar [105].

Estudios epidemiológicos han demostrado que cuando enfrentamos el consumo de alcohol con la mortalidad, se produce una curva en forma de U. Un consumo nulo de alcohol se correlaciona con mayor mortalidad, si lo comparamos con un bajo consumo, mientras que, a partir de un consumo moderado (40 ml de etanol / día), conforme aumenta la dosis de alcohol aumenta la tasa de mortalidad [106].

El beneficio del alcohol sobre la mortalidad total ocurriría a dosis aproximadas de 3 a 30 g / día en las mujeres, y de 12 a 60 g/día en los varones. [107].

Incluso la OMS estima el límite del consumo saludable de alcohol en, una cerveza o un vaso de vino al día.

Pero, ¿cual sería el alcohol más beneficioso? En un meta-análisis llevado a cabo por la Escuela de Salud Pública de Harvard, se llega a la conclusión, después de analizar 12 estudios comparativos internacionales, 10 estudios de cohortes y 3 estudios caso-control, de que, en la mayoría de los estudios ecológicos, el vino demostraba ser superior a las otras bebidas alcohólicas, lo que no ocurría en los estudios de casos-contrroles, ni en los estudios prospectivos, donde 4 encontraron mayor beneficio para el consumo de vino, 4 para el consumo de cerveza y 4 para el consumo de licores [108].

Renaud y colaboradores realizaron un interesante estudio epidemiológico en el que evaluaron durante 12 años la mortalidad por enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras causas en 34.000 varones entre 40 y 60 años, cuyo consumo de vino representaba el 82% de las bebidas alcohólicas consumidas. La mortalidad por cáncer sólo se redujo de manera significativa (en un 20%) cuando el consumo de vino fue de 1 a 3 vasos al día, mientras que por encima de este consumo el riesgo de cáncer aumentó [109].

### **3. CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS**

#### **3.1. LÍNEA CELULAR A ESTUDIO**

En este trabajo hemos utilizado células de CP humano LNCaP. Esta línea celular deriva originalmente de una metástasis supraclavicular de CP humano. Por tanto las células a estudio tienen las mismas características que la mayoría de los CP clínicos, haciendo de esta línea celular la ideal para cumplir los objetivos del presente proyecto.

La mayoría de los trabajos realizados sobre la modificación de la proliferación celular y estudios de apoptosis mediante nutrientes, se han realizado con la línea celular LNCaP [99, 120, 121].

#### **3.2. ELECCIÓN DE NUTRIENTES**

Existen trabajos que relacionan la dieta mediterránea, rica en legumbres, aceite de oliva, vino y vegetales, con una menor incidencia de CP, si lo comparamos con la incidencia de esta enfermedad en los Estados Unidos [100].

Datos relativos a la incidencia de CP, muestran una importante protección en Chinos y Japoneses, así como en vegetarianos, con una menor incidencia de este cáncer que la población general de países occidentales [101]. Los chinos y japoneses presentan niveles de isoflavonoides altos en orina y plasma [91].

Muchas frutas, vegetales, granos, nueces, té y vino contienen importantes cantidades de flavonoides [122].

El vino es uno de los principales componentes de la dieta mediterránea y es consumido en todo nuestro territorio nacional. El vino por su alto contenido en polifenoles [103], ha sido implicado como un agente protector contra el CP [123, 124].

Los polifenoles son compuestos formados por uno o más anillos fenólicos unidos entre sí con un número variable de grupos hidroxilo. Están conjugados, con frecuencia, con residuos sacáridos, lipídicos o carboxílicos para lograr una mayor solubilidad. En función del pH, de la temperatura y de su grado de oxidación, se asociarían o disociarían entre sí. Están presentes en cantidades importantes en los vinos tintos y, en menor medida, en los blancos y contribuyen, en gran parte, a las cualidades deseables del vino, aunque no tienen un valor nutritivo. Su

interés clínico actual arranca de su capacidad de quelar los radicales libres y, por tanto, de su poder antioxidante. En la actualidad, se conocen más de 8000 polifenoles, que se clasifican en no flavonoides y flavonoides. En los vinos tintos, los flavonoides constituyen normalmente más del 85 % del contenido fenólico, mientras que en los vinos blancos suele ser menos del 20% [104].

La complejidad estructural de los polifenoles varía desde simples moléculas fenólicas (como el ácido gálico) hasta complejos altamente polimerizados, como son los taninos. Los polifenoles se pueden dividir en 16 clases diferentes, aunque las clases más conocidas actualmente son los flavonoides, de los que se conocen unos 5000, y que a su vez se ordenan en subclases distintas.

Los flavonoides se definen químicamente como sustancias compuestas por una estructura común fenilcromanona (C 6 - C 3 - C 6), con uno o más grupos hidroxilo, y presentan una importante actividad estrogénica y antioxidante. Los flavonoides e isoflavonoides se presentan habitualmente como ésteres, éteres, derivados glicosilados o mezclas de varios de ellos [125].

En los mamíferos, los flavonoides e isoflavonoides aparecen únicamente por ingesta con la dieta. La ingesta media diaria de

flavonoides en el Reino Unido y Estados Unidos, se ha estimado entre 20 mg y 1 g. Varios autores han estudiado las numerosas propiedades biológicas que presentan los flavonoides e isoflavonoides, y que pueden actuar en la quimioprevención del cáncer [126, 127].

Existe evidencia sobre un posible efecto de estos nutrientes contra cánceres endocrinos como el de próstata [101].

En los últimos años han sido descritas numerosas propiedades de estos compuestos, como la posibilidad de inhibir el ciclo celular, la proliferación celular y el estrés oxidativo, y de inducir la detoxificación de enzimas, la apoptosis, y de estimular el sistema inmune.

Un interesante estudio prospectivo realizado con 12.763 personas en siete países diferentes, con un seguimiento de 25 años, no demostró relación alguna entre la ingesta de flavonoles y flavonas y la mortalidad por cáncer [128].

Si embargo otros estudios sí aportan evidencias sobre un posible efecto protector de los flavonoides en algunos cánceres, como el de próstata.

En Holanda se realizó un estudio con 878 hombres seguidos durante 25 años, publicándose sus resultados en 1994 por Hertog. En este estudio se correlacionó la ingesta de cinco flavonoides (quercetina, kaempferol, mirecitina, apigenina y luteonina) con la incidencia o mortalidad de todos los cánceres, y con la mortalidad de los cánceres del tracto digestivo o respiratorio. La ingesta de estos flavonoides no modificó la incidencia o mortalidad de los cánceres de todas las localizaciones o las tasas de cáncer del tracto respiratorio o digestivo. Sin embargo, la ingesta de flavonoides cuyo origen sean vegetales o frutas, se asociaba inversamente con el riesgo de cáncer del tracto digestivo y respiratorio, sugiriendo que agentes de las frutas y vegetales, sin ser los flavonoides, serían factores importantes en la disminución de estos cánceres [129].

Un estudio más reciente, y con un número mucho mayor de participantes, realizado en Finlandia entre 1967 y 1991, investigó la asociación entre la ingesta de flavonoides y el cáncer humano. Este estudio proporciona una importante evidencia del factor protector de los flavonoides contra el cáncer. La incidencia de cáncer de todas las localizaciones se asoció de forma inversa con la ingesta de flavonoides. El mayor efecto protector se encontró en el cáncer de pulmón. Esta protección fue mayor en los individuos con menos de 50 años de edad (riesgo relativo de 0,33, intervalo de confianza 95%, entre 0,15 - 0,77), y

en no fumadores (riesgo relativo de 0,13 intervalo de confianza 95%, entre 0,03 – 0,58) [130].

En Hawai se realizó un interesante estudio entre hombres Hawaianos descendientes de Japoneses. Las tasas de CP fueron inferiores entre los hombres que tenían una dieta rica en arroz ( $p = 0,017$ ) y, en menor medida, con la ingesta de tofu ( $p = 0,054$ ). Estos estudios sobre poblaciones asiáticas sugieren que los alimentos ricos en soja, la principal fuente de isoflavonas, se asocia, con frecuencia, con una reducción en la incidencia de cáncer [91].

Se han realizado estudios con CP transplantado a ratas Dunning R3327; alimentándolas con un 33 % del peso de la dieta en harina de soja se observó una reducción del 30%-40% en el crecimiento del adenocarcinoma de próstata [131].

Estudios usando 3,2'-dimetil-1-4-aminobifenil y propionato de testosterona en modelos con ratas alimentadas con una mezcla conteniendo 74% de genisteína y 21% de daidzeína, reducían la incidencia de adenocarcinoma de próstata un 50% en comparación con las ratas alimentadas con dieta libre [132].

Las dietas con quercetina entre 0% y 5%, y rutina al 4% inhiben la hiperproliferación y la displasia, así como la incidencia de cáncer de colon en ratones tratados con azoxymetano. [133].

Otros estudios realizados con resveratrol, han demostrado un efecto tumoricida in vitro, induciendo apoptosis de las células tumorales [134].

Csokay y colaboradores establecen que la quercetina a una concentración de 5.5  $\mu\text{M}$  activa tanto la apoptosis como los mecanismos de diferenciación en las células de leucemia humana K562. La apoptosis se pudo objetivar a la hora de incubación, mientras que para observar diferenciación celular hubo que esperar al menos 12 horas [135].

Otros estudios realizados sobre células de leucemia mieloide crónica k562, leucemia linfocítica aguda Molt-4, linfoma Rajii Burkitt, y sobre cistoadenocarcinoma mucinoso de ovario, también sugieren que la quercetina ejerce su acción antitumoral activando apoptosis, que comienza a dosis de 1  $\mu\text{M}$  y alcanza su máxima expresión a 200  $\mu\text{M}$  [136].

La apigenina, la luteolina y la fisetina inhibieron de forma significativa la proliferación de las células SHEP (línea celular de

neuroblastoma humano) y MCF7 (línea celular de adenocarcinoma de mama) [137].

Algunos estudios indican el efecto antiproliferativo y anticarcinogénico de algunos flavonoides especialmente la quercetina que lograría evitar la proliferación de células leucémicas humanas in vitro [138].

Los taninos han demostrado una amplia acción como agentes quimio-preventivos en numerosos modelos animales, actuando tanto contra la iniciación tumoral como contra la promoción [139].

Se han realizado estudios de apoptosis en células Rat-I con trans-resveratrol. Se objetivó una importante inducción de apoptosis de dichas células, determinándose la muerte celular tanto por ELISA, como mediante análisis morfológico [140].

Nosotros para nuestro experimento hemos utilizado cinco polifenoles, todos ellos presentes en importantes concentraciones en el vino tinto. La quercetina es el que ha sido estudiado más ampliamente, mientras que no existen en la literatura datos sobre el efecto de los otros

4 agentes presentes en el vino tinto (rutina, morina y ácidos gálico y tánico) sobre las células LNCaP.

### 3.3. DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN

En nuestro trabajo hemos utilizado para los estudios sobre la modificación de la proliferación celular una técnica basada en un inmunoensayo colorimétrico (Cell Proliferation ELISA BrdU - Roche). Este método se basa en la cuantificación de la incorporación de BrdU al ADN de células proliferantes en lugar de la timidina y, por lo tanto, cuantifica las células en proliferación. Es un método sencillo y fácilmente reproducible.

Otros trabajos, como el de Hsieh y colaboradores, utilizaron un hemocitómetro para determinar el número de células [141].

Kampa y colaboradores utilizan ensayos con sales de tetrazolio para estudiar la proliferación celular [121].

### 3.4. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS

Para la determinación de la apoptosis se utilizó un kit de detección de muerte celular por ELISA. El ensayo consiste en el reconocimiento de

los mono u oligonucleosomas generados tras un proceso apoptótico, evaluando los fragmentos de ADN-histonas liberados al citoplasma tras inducir muerte celular.

Otros investigadores han determinado la apoptosis mediante citometría de flujo tras marcaje con fluoresceína. [141, 142].

#### **4. RESULTADOS DE PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PRÓSTATA**

Para tratar de establecer la influencia de andrógenos sobre nuestro estudio se realizó un experimento de proliferación celular con y sin dihidrotestosterona (DHT). No se encontraron diferencias significativas en presencia o ausencia de DHT. Este comportamiento podría estar relacionado con el suero fetal bovino utilizado para el mantenimiento del cultivo, el cual contiene una concentración suficientemente alta de DHT como para diluir el efecto esperado por el aporte exógeno de la misma. En efecto, la concentración de DHT en el FCS alcanzó 4 ng/ml, una concentración lo suficientemente elevada, como para que no se produzca ningún cambio en la respuesta celular ante un aporte suplementario de DHT.

##### **4.1. PROLIFERACIÓN**

El crecimiento de muchos tumores, entre otros el de próstata y mama, se inhibe por isoflavonoides y lignanos. Genisteína (un

isoflavonoide) y su precursor, la biocatenina A, inhiben el crecimiento de células de CP [95].

Otro estudio con cultivos celulares de CP, también realizado con Genisteína (1  $\mu\text{M}/\text{ml}$  y 100  $\text{ng}/\text{ml}$ , respectivamente), demostró que esta era citotóxica sobre la línea celular de CP MAT-lylu y sobre la línea de CP humano PC-3. Sin embargo, la adición de genisteína a concentraciones entre 0,07 y 0,285  $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$  no inhibió el crecimiento de células MAT-lylu implantadas en ratas [143].

El resveratrol, otro polifenol presente en el vino tinto, inhibe el crecimiento del CP, alterando la mitogénesis. Se observó una inhibición significativa en la proliferación de las células tumorales LNCaP al cuarto día de la incubación cuando añadimos una concentración de  $2.5 \times 10^{-6}$  M de resveratrol al medio de cultivo. Para producir ese mismo efecto sobre las líneas celulares DU-145 y PC-3, se necesitó una concentración diez veces mayor ( $2.5 \times 10^{-5}$  M) [141].

Otro estudio se realizó con quercetina, catequina y epicatequina, a dosis de  $10^{-12}$  M. Se observó una inhibición de la proliferación significativa de las células PC3, siendo las células LNCaP algo menos sensibles a su efecto. Por el contrario, el resveratrol fue completamente ineficaz sobre

las células LNCaP. El efecto de estas sustancias fue dependiente de la dosis y del tiempo de exposición [121].

La genisteína, la genistina, la daidzeína y la biochanina A, a concentraciones entre 0 y 50  $\mu\text{M}$  inhiben el crecimiento de líneas celulares de cáncer vesical murino y humano, induciendo paro en el ciclo celular, apoptosis y angiogénesis [144].

Otros estudios con genisteína a concentraciones similares establecen los mismos resultados sobre células de CP humano [145].

Estudios con silimarina (0-75  $\mu\text{M}$ ) encontraron que las alteraciones en la progresión del ciclo celular serían las responsables de su efecto anticarcinogénico sobre las células de carcinoma prostático DU145 [146].

Se realizó un estudio sobre la línea celular PC-3 andrógeno-independiente con quercetina, kaempferol, luteolina, genisteína, apigerina, naringerina, mirecitina y rutina. La adición de 100  $\mu\text{M}$  de genisteína, apigerina y mirecitina inhibió el crecimiento celular en un 73%, 70% y 59%, respectivamente, mientras que la misma concentración de naringerina y rutina inhibió la proliferación celular menos de un 25%. Si embargo, la quercetina, el kaempferol y la luteolina a concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  inhibieron completamente el crecimiento celular [147].

Nosotros tras 24 horas de incubación obtuvimos una inhibición significativa de la proliferación celular de las células LNCaP, con rutina (50  $\mu\text{M}$  y 75  $\mu\text{M}$ ), morina (75  $\mu\text{M}$ ), ácido tánico (10  $\mu\text{M}$ ) y ácido gálico (10  $\mu\text{M}$ ). A las 48 horas se detectó inhibición con rutina 75  $\mu\text{M}$ , morina 50  $\mu\text{M}$ , y ácido tánico y gálico a 10  $\mu\text{M}$ . A las 72 horas, con quercetina (10  $\mu\text{M}$ ), rutina (75  $\mu\text{M}$ ), ácido tánico (5  $\mu\text{M}$ ), y ácido gálico (10  $\mu\text{M}$ ), y a las 96 horas se observaron diferencias significativas con quercetina (5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ), rutina (50  $\mu\text{M}$  y 75  $\mu\text{M}$ ), morina (50  $\mu\text{M}$  y 75  $\mu\text{M}$ ) y ácidos tánico y gálico (5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ).

#### 4.2. APOPTOSIS

Tras 4 días de incubación de células LNCaP y, 3 líneas celulares andrógeno-independientes (PC-3, DU-145 y JCA-1) con resveratrol [ $2.5 \times 10^{-5}$  M] Hsieh obtuvo un porcentaje de células apoptóticas del 14.7% +/- 15.0% en células LNCaP, del 3,7% +/- 3,2% para las DU-145, del 4,3% +/- 5,9 para las PC-3 , y no obtuvo apoptosis con las células JCA-1 [141].

Se objetivó apoptosis mediante el tratamiento de las líneas celulares PC-3 y LNCaP en modelos animales 104-R cuando se añadió epigallocatequina-3-galato [99].

Otro experimento, esta vez realizado sobre células de CP humano DU-145, con epigallocatequina-3-galato (principal componente del té verde) a una dosis de 80  $\mu\text{M}$ , y tras incubación durante 48 horas, indujo apoptosis [142].

Un estudio con quercetina y kaempferol a dosis de 100  $\mu\text{M}$ , no indujo apoptosis en la línea celular andrógeno-independiente PC-3 [147].

En nuestro trabajo, utilizando las dosis que producían inhibición significativa de la proliferación, a las 24 horas no observamos inducción significativa de apoptosis con ningún nutriente. A las 48 horas se obtuvieron índices apoptóticos significativamente más altos ( $p < 0.01$ ) en relación al control en presencia de ácido gálico 5 y 10  $\mu\text{M}$ , tánico 5 y 10  $\mu\text{M}$ , y rutina 75  $\mu\text{M}$ . Este efecto se mantuvo durante las primeras 72 horas. El efecto de la morina 75  $\mu\text{M}$ , aunque significativo ( $p < 0.01$ ), sólo apareció a las 72 horas. Inversamente, quercetina 5 y 10  $\mu\text{M}$  indujeron apoptosis ( $p < 0.05$ ) durante las primeras 48 horas comparada con la que se produjo en el control.

## 5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Si reunimos la experiencia de los estudios de biología celular y molecular, así como los estudios animales ,y hasta un cierto límite, los ensayos clínicos con humanos, podemos afirmar que los flavonoides podrían tener un efecto beneficioso sobre varias patologías entre las que se encuentran:

- Enfermedades cardiovasculares.

Estudios epidemiológicos muestran una relación inversamente proporcional entre la ingesta de flavonoides y la mortalidad por enfermedad coronaria.

Este efecto se puede explicar, al menos en parte, por la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y por la reducción de la agregación plaquetaria [148].

Los niveles elevados de LDL en plasma se asocian con una aterosclerosis acelerada [149].

- Cáncer de próstata.

Varios trabajos sugieren un efecto protector de los flavonoides contra el CP. [15, 150]. El mecanismo de acción de estas sustancias sería a diferentes niveles.

#### A.- Inhibición de la 5 $\alpha$ -reductasa

Los isoflavonoides y los lignanos inhiben la 5  $\alpha$ -reductasa y la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa, esto disminuiría la concentración de DHT.

#### B.- Inhibición de las proteinkineras específicas de tiroxina (tiroxin-kinasas).

Las tiroxin-kinasas son necesarias para la función de varios receptores de factores de crecimiento, incluyendo los factores de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de las plaquetas y factores de crecimiento insulínicos I y II; la fosforilación de la tiroxina juega un importante papel en la proliferación y transformación celular. Los inhibidores específicos de las tiroxin-kinasas están siendo investigados como nuevos agentes contra el cáncer[151].

La genisteína es un inhibidor específico de la actividad tiroxin-kinasa. [152].

### C.- Inhibición de las topoisomerasas del ADN.

La topoisomerasas del ADN son enzimas que alteran la conformación del ADN y son cruciales para la división celular [153].

La genisteína es un inhibidor potente de estas enzimas, y se cree que actúa mediante la estabilización de un "complejo segmentable" putativo entre el ADN y la enzima topoisomerasa [154].

La quercetina, la fisetina y la morina también inhiben las topoisomerasas del ADN I y II, mientras que el kaempferol sólo inhibe la topoisomerasa II [89].

La inhibición de las topoisomerasas es hoy uno de los objetivos para el diseño de nuevas drogas anticancerosas.

### D.- Inhibición de la angiogénesis.

Se necesitan nuevos vasos capilares para que el cáncer se expanda más allá de 2 mm [155].

La genisteína, fisetina, apigenina y luteolina inhibieron la proliferación de células normales y tumorales así como la angiogénesis in vitro, a concentraciones submáximas en el rango micromolar bajo [137].

- Osteoporosis.

Estudios epidemiológicos realizados en Hong Kong y Estados Unidos, establecen que las tasas de fracturas de cadera para hombres y mujeres con 85 años o más, en Hong Kong era un tercio de las que se presentaron en Estados Unidos. Esto probablemente pueda ser achacado a la dieta rica en flavonoides en los países asiáticos [156].

Estudios con ipriflavona, un derivado de las isoflavonas, a dosis diarias entre 200 y 600 mg/día, han sido eficaces promoviendo la síntesis de masa ósea y previniendo la pérdida ósea. [157, 158].

- Sintomatología menopáusica, ciclos menstruales y hormonas endógenas.

#### A.- Actividad estrogénica

Apigerina, kaempferol y naringerina poseen todos una actividad estrogénica débil, compitiendo con más fuerza que el estradiol para unirse al receptor estrogénico- $\beta$  (RE- $\beta$ ) [83].

### B.- Duración del ciclo menstrual

Las asociaciones entre la ingesta de fitoestrógenos y cáncer de mama y entre la duración del ciclo menstrual y cáncer de mama, hacen de la conexión entre fitoestrógenos y duración del ciclo menstrual una importante área de investigación. Se han objetivado ciclos menstruales significativamente más cortos en pacientes con cáncer de mama en relación a controles [159].

Se ha sugerido que ciclos menstruales 2 o 3 días más largos en las mujeres asiáticas que en las mujeres occidentales, serían debidos en parte a la ingestión de cantidades importantes de estrógenos no esteroideos presentes en la soja [160].

### C.- Sintomatología menopaúsica.

Los sofocos aparecen en menor medida entre las mujeres en Japón que en Canadá, y podría ser debido por la alta ingesta en comidas con soja en Japón [161].

Nuestro estudio proporciona una fuerte base para estudiar los efectos in vivo de estos nutrientes, y quizás en un futuro, se puedan realizar recomendaciones a cerca de su ingesta como agentes preventivos contra el CP.

## CONCLUSIONES

1. Los polifenoles del vino tinto (quercetina, morina, rutina y ácidos gálico y tánico) inhibieron la proliferación in vitro de células de cáncer de próstata humano LNCaP.
  - 1.1. La rutina, la morina, y los ácidos tánico y gálico produjeron una inhibición de la proliferación celular en las primeras 24 horas de incubación.
  - 1.2. La quercetina únicamente inhibió la proliferación celular a partir de las 72 horas de incubación.
  
2. Estos polifenoles también indujeron apoptosis, explicando, en parte al menos, la inhibición en la proliferación de las células LNCaP.
  - 2.1. Ningún nutriente indujo apoptosis a las 24 horas, utilizándolos a las dosis que produjeron inhibición de la proliferación.

- 2.2. A las 48 horas de incubación, la quercetina, la rutina y los ácidos gálico y tánico indujeron apoptosis. Con excepción de la quecetina, esos nutrientes mantuvieron su efecto hasta las 72 horas.
  - 2.3. La morina, sólo indujo apoptosis a las 72 horas.
3. La adición de dihidrotestosterona al medio de cultivo no modificó la proliferación de las células LNCaP.

## BIBLIOGRAFÍA

1. - Fair WR, Heston W.D., y Cordon-Cardo C.: An Overview of cancer biology. En "Campbell's Urology": 7ª Ed., vol. III: pp. 2259-2282. Walsh P.C., Retik A.B., Vaughan E.D., Wein A.J. (Eds). W.B. Saunders, Philadelphia (USA). 1998.
- 2.- Greenlee R.T., Hill-Harmon M.B., Murray T., Thun M.: Cancer Statistics, 2001. CA Cancer J Clin 51: 15-36. 2001.
- 3.- Denis L., Morton M.S., Griffiths K.: Diet and its preventive role in prostatic disease. Eur Urol 35: 377-387. 1999.
- 4.- Landis S.H., Murray T., Bolden S., et al.: Cancer Statistics, 1998. CA Cancer J Clin 48: 6- 29. 1998.
- 5.- Scardino P.T., Weaver R., Hudson M.A.: Early detection of prostate cancer. Hum Pathol 23: 211-222. 1992.
- 6.- Lieberman R., Nelson W.G., Sakr W.A., Meyskens F.L., Klein E.A., Wilding G., Partin A.W., Lee J.J., Lippman S.M.: Executive summary of The National Cancer Institute workshop: highlights and recommendations. Urology (Sup. 4A): 4-27. 2001.

- 7.- Parkin D.M., Pisani P., Ferlay J.: Worldwide burden of cancer, in Biennial Report 1994-1995 Lyon, IARC: 14-15. 1995.
- 8.- Boyle P., Maisonneuve P., Napalkov P.: Geographical and temporal patterns of incidence and mortality from prostate cancer. *Urology* 46: 47-55. 1995.
- 9.- Jensen O.M., Esteve J., Moller H., Renard H.: Cancer in the European Community and its member states. *Eur J Cancer* 26: 1167-1256. 1990.
- 10.- Arrizabalaga M., Navarro M., Moras J. et al.: Incidencia de los principales carcinomas urológicos en el área sanitaria VII de Madrid. Libro de resúmenes del LIX Congreso de la Asociación Española de Urología. *Actas Urológicas Españolas*; P-145: 161. 1994
- 11.- Boyle P., Severi G.: Epidemiology of Prostate Cancer. *Chemoprevention. Eur Urol* 35: 370-376. 1999.
- 12.- Kirby R., Fitzpatrick J., Kirby M., Fitzpatrick A.: A shared care for prostatic diseases. *ISIS Medical Media*. 1994.

- 13.- Tablas de Mortalidad de la Población Española 1996-1997, Madrid 1999. <http://www.ine.es>
- 14.- Adlercreutz H., Mazur W.: Phyto-estrogens and Western diseases. *Ann Med* 29: 95-120. 1997.
- 15.- Kelloff G.J., Lieberman R., Steele V.E., Boone C.W., Lubet R.A., Kopelovitch L., Malone W.A., Crowell J.A., Sigman C.C.: Chemoprevention of prostate cancer: concepts and strategies. *Eur Urol* 35: 342-350. 1999.
- 16.- Schroeder G.H.: The natural history of prostatic carcinoma. En "Altwin JE, Faul P, Schneider W" (editores): *Incidental carcinoma of the prostate*. ISBN 3-540-53225-0. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York: 56-62. 1991.
- 17.- Bostwick D.: Prostatic intraepithelial neoplasia: current concepts. *J Cell Biochem* 16 (supl. H): 10-19. 1992.
- 18.- Lowe B.A., Linstron M.B.: Incidental carcinoma of the prostate: an analysis of the predictors of progression. *J Urol* 140: 1340-1344. 1988.

- 19.- Kelloff G.J., Boone C.W., Malone W.F., Steele V.E., Doody L.A.: Introductory remarks: Development of chemopreventive agents for prostate cancer. *J Cell Biochem* 16 (sup. H9): 1-8. 1992.
- 20.- Johanson J.E., Adami H.O., Anderson S.O., Bergston R., Holmberg L., Krusemo U.B.: High 10 years survival rate in patients with early untreated prostatic carcinoma. *JAMA* 267 (16): 2191-2196. 1992.
- 21.- Albertsen P.C., Hanley J.A., Gleason D.F., Barry M.J.: Competing risk analysis of men aged 55 to 74 years at diagnostic managed conservatively for clinically localized prostate cancer. *JAMA* 280: 975-980, 1998.
- 22.- Grönberg H., Damber J., Jonsson H., Lenner P.: Patient age as a prognosis factor in prostate cancer. *J Urol* 152: 892-895. 1994.
- 23.- Wolf C.M.: An Investigation of familiar aspects of carcinoma of the prostate. *Cancer* 13: 739-744. 1960.
- 24.- Steinberg G.D., Carter B.S., Beaty T.H., Childs B., Walsh P.C.: Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 17(4): 337-347. 1990.

- 25.-Grönberg H., Damber L., Damber J.E.: Familiar prostate cancer Sweden. A nation-wide register cohort study. *Cancer* 77: 138-143. 1996.
- 26.- Aprikian A.G., Brazinet M., Plante M., Meshref A., Trudel C., et al: Family history and the risk of prostatic carcinoma in the high-risk group of urological patients. *J Urol* 154: 404-406. 1995.
- 27.- Carter B.S., Beaty T.H., Steinberg G.D., Childs B., Walsh P.C.: Mendelian inheritance of familiar prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3367-3371. 1992
- 28.- Batacky S.I., Wojno K.J., Walsh P.C., Carmichael M.J., Epstein J.I.: Pathological features of hereditary prostate cancer. *J Urol* 153: 987-992. 1995.
- 29.- Ekman P.: Genetic and Environmental Factors in Prostate Cancer Genesis: Identifying High-Risk Cohorts. *Eur Urol* 35: 362-369. 1999.
- 30.- Matsuyama H., Yi P., Yoshihiro S., Häggarth L., Chunde L., Tribukait B., et al.: Deletion of chromosome 8p22 for the development of disease progression in prostate cancer. *Cancer Res.*

- 31.- Pan Y., Matsuyama H., Naining W., Yoshihiro S., Häggarth L., et al.:  
Chromosome 16q24 deletion and decreased E-cadherin expression:  
Possible association with metastatic potential in prostate cancer.  
Prostate 36: 31-38. 1998.
- 32.- Smith J.R., Freier D., Crapten J., Grönberg H., et al.: Major  
susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by  
a genomic wide search. Science 274: 1371-1373. 1996.
- 33.- Xu J., Schleutker J., Berry R., Grönberg H., Smith J., et al.: Evidence  
for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. Nat  
Genet 20: 175-179. 1998
- 34.- Edwards A., Hammond H.A., Lin J., Caskey C.I., Chakraborty R.:  
Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in  
four human population groups. Genomics 12: 241-253. 1992.
- 35.- Ingles S.A., Ross R.K., Yu N.C., Irvine R.A., et al.: Association of  
prostate cancer risk with genetic polymorphism in vitamin D receptor  
and androgen receptor. J Natl Cancer Inst 89: 166-170. 1997.

- 36.- Peelh D.M., et al.: Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on primary cultures of human prostatic cells. *Cancer Res* 54: 805-810. 1994.
- 37.- Corder E.H., Guess H.A., Hulka B.S., Friedman G.D., Sadler M., et al.: Vitamin D and prostate cancer: A prediagnostic study with stored sera. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2: 467-472. 1993.
- 38.- M'Buyamba-Kabangu J.M.R., Fagard R., Lijnem P., Bouillon R., Lissens W., Amery A.: Calcium, vitamin D-endocrine system, and parathyroid hormone in black and white males. *Calcif Tissue Int* 41: 70-74. 1987.
- 39.- Zaridze D.G., Boyle P., Smans M.: International trends in prostatic cancer. *Int J Cancer* 33: 223-230. 1984
- 40.- Parkin D.M., Muir C.S., Whelan S., Gao Y.T., Ferlay J., Powell J. (editores); *Cancer incidence in five continents, vol VI*; IARC Sci Publ No 120. Lyon, IARC. 1992.

- 41.- Ross R.K., Bernstein L., Judd H., Hanisch R., Pike M., Henderson B.: Serum testosterone levels in healthy young black and white men. JNCI 76: 45-48. 1986.
- 42.- Glantz G.: Cirrhosis and carcinoma of the prostate gland. J Urol 91: 291-294. 1964.
- 43.- Herbert J.T., Birkhoff J.D., Feorino P.M., Cadwell G.G.: Herpes simplex virus type 2 and cancer of the prostate. J Urol 116: 611-612. 1976.
- 44.- Viola M.V., Fromowitz F., Oravez S., Deb S., Finkel G., Lundy J., Hand P., Thor A., Schlom J.: Expression of ras oncogene p21 in prostate cancer. N Engl J Med 314: 133-137. 1986.
- 45.- Habib F.K., Lee I.R., Stich S.R., et al.: Androgen levels in plasma and prostatic tissues of patients with benign hypertrophy and carcinoma of the prostate. J Endocrinol 71: 99-107. 1976.
- 46.- Rooney C., Beral V., Maconochie N., Fraser P., Davies G.: Case-control study of prostatic cancer in employees of the United Kingdom Atomic Energy Authority. BMJ 307: 1391-1397. 1993

- 47.- Eisman J.A., Barkla D.H., Tutton P.J.: Suppression of in vivo growth of human solid tumor xenografts by  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$ . Cancer Res 47: 21-25. 1987.
- 48.- Chida K., Hashiba H., Fukushima M., Suda T., Kuroki T.: Inhibition of tumor promotion in mouse skin by  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$ . Cancer Res 45: 5426-5430. 1985
- 49.- Reitsma P.H., Rothberg P.G., Astrin S.M., et al.: Regulation of myc gene expression in HL-60 leukaemia cells by a vitamin D metabolite. Nature 306: 4992-4996. 1983.
- 50.- Morrison H., Savitz D., Semenciw R., Hulka B., Yang M., et al.: Farming and prostate cancer mortality. Am J Epidemiol 137: 270-280. 1993.
- 51.- Wilkund K., Dich J.: Cancer risks among male farmers in Sweden. Eur J Cancer Prev 4: 81-9. 1995.
- 52.- Dich J., Wilkund K.: Prostate cancer in pesticide applicators in Swedish agriculture. Prostate 34: 100-112. 1998.

- 53.- Bertram F.J., Kolonel L.N., Meyskens F.L.: Strategies and rationale for chemoprevention in cancer in humans. *Cancer Res* 47: 3012-3031. 1987.
- 54.- Martín E.O., Luján M.G., Sánchez E.S., Herrero A.P., Páez A.B., Berenguer A.S.: Resultado de un programa de screening para el cáncer de próstata. *Actas Urol Esp* 23(4): 287-29. 1999.
- 55.- Schulman C.C., Kelloff G.J.: Introduction: Strategies for chemoprevention of Prostate Cancer Symposium proceedings. Brussels. *Eur Urol* 35: 341-547, 1999.
- 56.- Reddy B.S.: Micronutrients as chemopreventive agents. *IARC Sci Publ* 139: 221-235. 1996.
- 57.- Cancer Facts and Figures, 1999. Atlanta, Ga: American Cancer Society. 1999.
- 58.- Haenzel W., Kurihara M.: Studies of Japanese migrants. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst* 40: 43-68. 1968.

- 59.- Adlercreutz H.: Western diets and Western diseases: Some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scan J Clin Lab Invest* 50 (sup. 201): 3-23. 1990.
- 60.- Key T.: Risk factors for prostate cancer. *Cancer Surv* 23: 63-77. 1995.
- 61.- Boyle P., Zaridze D.G.: Risk factors for prostate and testicular cancer. *Eur J Cancer* 29A: 1048-1055. 1993.
- 62.- Grönberg H., Damber L., Damber J.E.: Total food consumption and body mass index in relation to prostate cancer risk: A case-control study in Sweden with prospectively collected exposure data. *J Urol* 155: 969-974. 1996.
- 63.- Albanes: Caloric intake, body weight and cancer. A review. *Nutr Cancer* 9: 199-217. 1987.
- 64.- Kolonel L.N.: Nutrition and prostate cancer. *Cancer Causes Control* 7: 83-94. 1996.

- 65.- Nguyen M.L., Schwartz S.J.: Lycopene: Chemical and biological properties. *Food Technol* 53: 38-45. 1999.
- 66.- Norrish A.E., Jackson R.T., Sharpe S.J., et al.: Prostate cancer and dietary carotenoids. *Am J Epidemiol* 151: 129-123. 2000.
- 67.- Giovannucci E.: Tomatoes, tomato-base products, lycopene and cancer: review of the epidemiological literature. *J Natl Cancer Inst* 91: 317-331. 1999.
- 68.- Woo E.W., Quinn M.R., Figg W.D., Dahut W.: The use of complementary and alternative medicine in prostate cancer patients. *Onc Issues* 15 (6): 23-27. 2000.
- 69.- Hirayama T.: A large-scale cohort study on cancer risks by diet – with special reference to the risk-reducing effects of green-yellow vegetable consumption. En Hayash Y et al. (Editores); *Diet, Nutrition and Cancer*. Utrecht, VNU Sci Press/ Tokyo, Jpn Sci Soc Press, 41-53. 1986.
- 70.- Cohen J.H., Cristal A.R., Stanford J.L.: Fruit and vegetables ingestion, and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst*: 92: 61-68. 2000.

- 71.- Moyad M.A., Brumfield S.K., Pienta K.J.: Vitamin E, alpha- and gamma-tocopherol, and prostate cancer. *Semin Urol Oncol* 17: 85-90. 1999.
- 72.- Fleshner N., Fair W.R., Huryk R., Heston W.D.: Vitamin E inhibits the high-fat diet promoted growth of established human prostate LNCaP tumours in nude mice. *J Urol* 161: 1651-1654. 1999.
- 73.- Heinonen O.P., Albanes D., Virtamo J., et al.: Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: Incidence and mortality in a controlled trial. *J Natl Cancer Inst* 90: 440-446. 1998.
- 74.- Kumar N.B., Besterman K.B.: Nutrients in the Chemoprevention of Prostate Cancer: Current and future Prospects. *Cancer Control; JMCC* 6 (6): 580-586. 1999.
- 75.- Konety B.R., Johnson C.S., Trump D.L., Getzenberg R.H.: Vitamin D in the prevention and treatment of prostate cancer. *Sem Urol Oncol* 17 (2): 77-84. 1999.

- 76.- Institute of Medicine, National Academy of Sciences; Food and Nutrition Board; Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids: Washington DC: National Academy Press 2000.
- 77.- Combs G.F., Gray W.P.: Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol Ther* 79: 179-192. 1998.
- 78.- Clark L.C., Combs G.F. Jr., Turnbull B.W., et al.: Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomised controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA* 276: 1957-1963. 1996.
- 79.- Hertog M. G., et al. *Nutr Cancer* 20, 21-29. 1993.
- 80.- Miksicek R.J.: Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Pro Soc Exp Biol Med* 208:440-450. 1995.

- 81.- Belanger A., Locong A., Noel C., Cusan L., Dupont A., Prevost J., Caron S., Sevigny J.: Influence of diet on plasma steroids and sex hormone-binding globulin levels in adult men. *J Steroid Biochem* 32, 829-833. 1989.
- 82.- Vermeulen A.: Metabolic effects of obesity in men. *Verhandelingen-Koninklijke Academie Voor Geneeskunde Van Belgie*, 55, 393-397. 1993.
- 83.- Ross R.K., Berstein L., Lobo R.A., et al.: 5-alpha –reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. *Lancet* 339: 887-889. 1992.
- 84.- Adlercreutz H., Bannwart C., Wahala K., et al.: Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J Steroid Biochem Molec Biol* 44: 147-153. 1993.
- 85.- Cummings J., Smith J.F.: DNA topoisomerase I and II as targets for rational design of new anticancer drugs. *Ann Oncol* 4: 533-543. 1993.

- 89.- Constantinou A., Mehta R., Runyann C., Rao K., Vaughan A., Moon R.: Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *J Nat Prod* 58: 217-225. 1995.
- 87.- Kleemola P., Virtanen M., Pietinen P.: The 1992 diet survey of Finnish adults, vol B2/1994. Helsinki, Helsinki National Public Health Institute, Department of Nutrition. 1994.
- 88.- Severson R.K., Nomura A.M., Grove A.S., Stemmermann G.N.: A prospective study of demographics, diet and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii. *Cancer Res* 49: 1857-1860. 1989.
- 89.- Bylund A., Zhang J.X., Bergh A., Damber J.E., et al.: Rye bran and soy protein delay growth and increase apoptosis of human LNCaP prostate adenocarcinoma in nude mice. *Cancer Res* 51: 847-850. 1990.
- 90.- Landstrom M., Zhang J.X., Hallmans G., Aman P., et al.: Inhibitory effects of soy and rye diets on the development of Dunning R3327 prostate adenocarcinoma in rats. *Prostate* 36: 151-161. 1998.

- 91.- Davis J.N., Kucuk O., Sarkar F.H.: Genistein inhibits NF-Kappa B activation in prostate cancer cells. *Nutr Cancer* 35: 167-174. 1999.
- 92.- Griffiths K., Morton M.S., Dennis L.: Certain aspects of molecular endocrinology that relate to the influence of dietary factors on the pathogenesis of prostate cancer. *Eur Urol* 35: 443-455. 1999.
- 93.- Rose D.P., Boyar A.P., Wynder E.L.: International comparisons of mortality rates for cancer of the breast, ovary, prostate and colon and per capita food consumption. *Cancer* 58: 2363- 2371. 1986.
- 94.- Gupta S., Ahmad N., Mukhtar H.: Prostate cancer chemoprevention by green tea. *Sem Urol Oncol* 17 (2): 70-76. 1999.
- 95.- Liao S., Umekita Y., Guo J., Kokontyis J. M., Hiipakka R.A.: Growth inhibition and regression of human prostate and breast tumours in athymic mice by tea epigallocatechin gallate. *Cancer Lett* 96: 239-243. 1995.
- 96.- Block G., Patterson B., Subar A.: Fruit, vegetables and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 18: 1-29. 1992.

- 97.- Negri E., La Vecchia C., Franceschi S., D'Avanzo B., Parazzini F.: The role of vegetables and fruit in cancer risk; en Hill MJ, Giacosa A, Caygill CPJ (editores): *Epidemiology of Diet and Cancer*. Chichester, Horwood: 327-334. 1994.
- 98.- La Vecchia C., De Carli A., Negri E., Parazzini F.: Epidemiological aspects of diet and cancer: A summary review of case-control studies from Northern Italy. *Oncology* 45: 364-370. 1988.
- 99.- Álvarez- Sala L.A., Valderrama M., Porres A., Gómez-Gerique J.A., Rodríguez-Gorostiza F.J., Torres F.J., Millán J.: Alcohol y enfermedad cardiovascular. *Cardiovascular risk factors* vol 9 (5): 328-341. 2000.
- 100.- Blade C., Ardevol A., Arola L., Salvadó J.: Efectos del consumo moderado de vino en la salud: *Nutrición y obesidad* 2: 167-178. 1999.
- 101.- Renaud S., de Lorgeril M.: Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339: 1523-1526. 1992.
- 102.- Poikolainen K.: Alcohol and mortality: a review. *J Clin Epidemiol* 48: 455-465. 1995.

- 103.- Friedman L.A., Kimball A. W.: Coronary heart disease mortality and alcohol consumption in Framingham . Am J Epidemiol 124, 481-489. 1986.
- 104.- Rimm E.B., Klatsky A., Grobbee D., Stampfer M.J.: Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits. BMJ 312, 731-736. 1996.
- 105.- Renaud S.C., Gueguen R., Schenker J., Houtaud A.: Alcohol and mortality in middle-aged men from Eastern France. Epidemiology 9: 184-188. 1998.
- 106.- Baserga R.: Principles of Molecular Cell Biology of Cancer. The cell Cycle. 4: 60-66, Cancer Principles and Practice of Oncology, 4<sup>a</sup> Edición. Editado por DeVita VT, Hellman S, Rosenberg JB, Lippincott JB. Philadelphia. 1993.
- 107.- Baserga R.: The biology of cell reproduction. Cambridge, MA: Harvard University Press. 1995.

- 108.- Steel G.G.: Growth kinetics of tumours. Oxford: Clarendon Press. 1977.
- 109.- Evan G., Littlewood T.: A matter of life and cell death. Science 281: 1317-1322. 1998.
- 110.- Majno G., Joris I.: Apoptosis, oncosis, and necrosis: An overview of cell death. Am J Pathol 146: 3-15. 1995.
- 111.- Tang D.G., Porter A.T.: Apoptosis: A current molecular analysis. Patho Oncol Res 2:117-137. 1996.
- 112.- Kroemer G., Petit P., Zamzami N., et al.: The biochemistry of programmed cell death. FASEB J 9: 1277-1287. 1995.
- 113.- Oliveria S.A., Christos P.J., Berwick M.: The role of epidemiology in cancer prevention. Proc Soc Exp Biol Med 216: 142. 1997.
- 114.- Wattenberg L.W.: Prevention-therapy-basic science and the resolution of the cancer problem. Cancer Res 53: 5890-5896. 1993.

- 115.- Kamat A.M. Lamm D.L.: Chemoprevention of urological cancer. J Urol 161: 1748-1760. 1999.
- 116.- Pterson G., Barnes S.: Genistein and biochain-A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation. Prostate 22: 335-345. 1993.
- 117.- Kampa M., Hatzogluo A., Notas G., Damianaki A., Bakogeorgou E., Gemetzi C., Kouroumalis E., Martin P.M., Castanas E.: Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. Nutrition and Cancer 37 (2): 223-233. 2000.
- 118.- Pierpoint W.S.: Flavonoids in the human diet. En V Cody, E Middleton Jr & J B Harbone (Eds), Progress in Clinical and Biological Research: 125-140. New York: Alan R Liss.
- 119.- Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huget F, Barrier L, Decendit A, et al: Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro test. Life Sci 61: 2003-2010, 1997.

- 120.- Jang M., Cai L., Udenai G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., et al.:  
Cancer chemo preventive activity of resveratrol, a natural product  
derived from grapes. *Science* 275: 218-220. 1997.
- 121.- Harbone J.B.: General procedures and measurement of total  
phenolics. En Dey P.M. & Harbone J.B. (editores) *Methods in plants  
biochemistry* vol 1: 1-28. London, Academic Press.
- 122.- Bravo I.: Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and  
nutritional significance. *Nutr Rev* 56, 317-333. 1998.
- 123.- Kuo S.M.: Antiproliferative potency structurally distinct dietary  
flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett* 110: 41-48. 1996.
- 124.- Armstrong B.E., Doll R.: Environmental factors and cancer incidence  
and mortality in different countries with special reference to dietary  
practices. *Int. J. Cancer* 15: 617-631. 1975.
- 125.- Hertog M.G., Feskens E.J., Holman P.C., Katan M.B., Kromhout D.:  
Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen elderly study. *Nutr  
Cancer* 22: 175-184. 1994.

- 126.- Knert P., Järvinen R., Seppänen R., Heliövaara M., Teppo L., Pukkala E., Aromaa A.: Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol* 146: 223-230. 1997.
- 127.- Zhang J.X., Hallmans G., Landstrom M., Bergh A., Damber J.E., Aman P., Aldlercreutz H.: Soy and rye diets inhibit the development of Dunning r3327 prostatic adenocarcinoma in rats: *Cancer Lett* 114: 313-314. 1997.
- 128.- Onozawa M., Kawamori T., Baba M., Fukuda K., Toda T., Sato H., Ohtani M., Akaza H., Sugimura T., Wakabayashi K.: Effects of a soybean isoflavone mixture on carcinogenesis in prostate and seminal vesicles of F344 rats. *Jpn J Cancer Res (Amsterdam)* 90: 393-398. 1999.
- 129.- Deschner E.E., Ruperto J.F., Wong G.Y., Newmark H.L.: The effect of dietary quercetin and rutin on AOM indicated acute colonic epithelial abnormalities in mice fed a high-fat diet. *Nutr Cancer* 20: 199-204. 1993.

- 130.- Carbó N., Costelli P., Baccino F.M., Lopez Soriano F.J., Argiles J. M.:  
Resveratrol a natural product present in wine, decreases tumour  
growth in a rat tumour model. *Biochem Biophys Res Commun* 254:  
739-743. 1999.
- 131.- Csokay B., Prajda N., Weber G., Olah E.: Molecular mechanism in  
the antiproliferative action of quercetin. *Life Sci* 60: 2157-2163. 1997.
- 132.- Wei Y., Zhao X., Kariya Y., Fukata H., Teshiwara K., Uchida A.:  
Induction of apoptosis by Quercetin: involvement of heat shock  
protein. *Cancer Res* 54: 4952-4957. 1994.
- 133.- Fotsis T., Pepper M.S., Aktas E., Breit S., Rasku S., Adlercreutz H.,  
Wähälä K., Montesano R., Schweigerer L.: Flavonoids, dietary-derived  
inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res* 57:  
2916-2921. 1997.
- 134.- Uddin S., Choudhry M.A.: Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the DNA  
synthesis of human leukaemia cells. *Bichem Mol Biol Int* 36: 545-550,  
1995.

- 135.- Böhm H., Boeing H., Hempel J., Raab B., Kroke A.: Flavonole, flavone und anthocyane als natürliche antioxidantien der nahrung und ihre mögliche rolle bei der prävention chronischer erkrankungen. Z Ernährungswiss; 37: 147-163. 1998.
- 136.- Holmes-Mc Nary M., Baldwin A.S.: Chemopreventive Properties of trans-Resveratrol Are Associated with inhibition of Activation of I $\kappa$ B Kinase. Cancer Res 60: 3477-3483. 2000.
- 137.- Hsieh T., Wu J.: Differential effects on Growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. Exp Cell Res 249: 109-115. 1999.
- 13.- Ahmad N., Feyes D., Nieminen A., Agarwal R., Mukhtar H.: Green tea constituent Epigallocatechin-3-Gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. J. Natl Cancer Inst 89: 1881-1886. 1997.
- 139.- Naik H.R., Lehr J.E., Pienta K.J.: An in vitro and in vivo study of antitumor effects of genisteína on hormone refractory prostate cancer. Anticancer Res 14: 2617-2620. 1994.

- 140.- Zhou J.R., Mukherjee P., Gugger E.T., Tanaka T., Blackburn G. L., Clinton S.K.: Inhibition of murine bladder tumorigenesis by soy isoflavones via alterations in cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. *Cancer Res* 58: 5231-5238. 1998.
- 141.- Kyle E., Neckers L., Takimoto C., Curt G., Bergan R.: Genistein-induced apoptosis of prostate cancer cells is preceded by a specific decrease in focal adhesion kinase activity. *Mol Pharmacol* 51: 193-200. 1997.
- 142.- Zi X.L., Grasso A. W., Kung H.J., Agarwal R.: A flavonoid antioxidant, silymarin, inhibits activation of erbB1 signalling and induces cycling-dependent kinase inhibitors, G1 arrest, and anticarcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells. *Cancer Res* 58: 1920-1929. 1998.
- 143.- Knowles L.M., Zigrossi D.A., Tauber R.A., Hightower C., Milner J.A.: Flavonoids Suppress Androgen-Independent Human Prostate Tumor Proliferation. *Nutr Cancer* 38(1): 116-122. 2000.

- 144.- Cook N.C., Samman S.: Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem* 7: 66-76. 1996.
- 145.- Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., Khoo J.C., Witztum J.L.: Beyond cholesterol: Modification of low-density-lipoprotein that increases its atherogenicity. *New Engl J Med* 320: 915-924. 1989.
- 146.- Barnes S., Peterson T.G., Coward L.: Rationale for the use of genistein-containing soy matrices in chemoprevention trials for breast and prostate cancer. *J Cell Biochem* 22: 181-187. 1995.
- 147.- Kenyon G.L., Garcia G.A.: Design of kinase inhibitors: *Med Res Rev* 7: 389-416. 1987.
- 148.- Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., et al.: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262: 5592-5595. 1987.

- 149.- Kuo M.L., Lin J.K., Huang T.S., Yang N.C.: Reversion of the transformed phenotypes on v-H-ras NIH3T3 cells by flavonoids through attenuating the content of phosphotyrosine. *Cancer Lett* 87: 91-97. 1994.
- 150.- McAbe M. Jr., Orrenius S.: Genistein induces apoptosis in immature human thymocytes by inhibiting topoisomerase-II. *Biochem Biophys Res Comm* 194: 944-950. 1993.
- 151.- Folkman J., Watson K., Ingber D., Hanahan D.: Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339: 58-61. 1998.
- 152.- Ho S.C., Bacon W.E., Harris T., Looker A., Maggi S.: Hip fractures rates in Hong Kong and the United States. *Am J Public Health*. 83: 694-697. 1993.
- 153.- Adami S., Bufalino L., Cervetti R., et al.: Ipriflavone prevents radial bone loss in postmenopausal women with low bone mass over two years. *Osteoporosis Int* 7: 119-125. 1997.

- 154.- Gambacciani M., Spinetti A., Cappagli B., et al.: Effects of ipriflavone administration on bone mass and metabolism in ovariectomized women: *J Endocrinol Invest* 16: 333-337. 1993.
- 155.- Olsson H., Landlin-Olsson M., Gullberg B.: Retrospective assessment of menstrual cycle length in patients with breast cancer, in patients with benign breast cancer and in women without breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 70: 17-20. 1983.
- 156.- Key T.J.A., Chen D.Y., Wang D.Y., Pike M.C., Boreham J.: Sex hormones in rural China and Britain. *Br J Cancer* 62: 631-636. 1990.
- 157.- Lock M.: Contested meanings of the menopause. *Lancet* 337: 1270-1272. 1991.