

# **Universidad de Murcia**

**Departamento de Dermatología, Estomatología,  
Radiología y Medicina Física**

Efectos saludables de flavonoides. Estudio  
experimental *in vitro* e *in vivo*

**D.<sup>a</sup> Nuria Álvarez Sánchez**

**2010**





D.<sup>a</sup> MARÍA PÍA LÓPEZ JORNET, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGÍA, ESTOMATOLOGÍA, RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA,

**CERTIFICA:**

Que el Consejo de Departamento, en su reunión ordinaria celebrada el día 11 de febrero de 2010, ha aprobado por unanimidad la Memoria de la Tesis Doctoral titulada "**Efectos saludables de flavonoides. Estudio experimental *in vitro* e *in vivo***" realizada por D.<sup>a</sup> Nuria Álvarez Sánchez, bajo la dirección de D. Vicente Vicente Ortega, Catedrático del Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica y por D. Miguel Alcaraz Baños, Profesor Titular del Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física, y que este Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia, a 26 de abril de 2010

Fdo.. María Pía López Jornet







D. **Vicente Vicente Ortega**, Catedrático del Área de Anatomía Patológica en el Departamento de Oftalmología, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica de la Universidad de Murcia,

**AUTORIZA:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**Efectos saludables de flavonoides. Estudio experimental *in vitro* e *in vivo***" realizada por D.<sup>a</sup> Nuria Álvarez Sánchez, bajo mi dirección y supervisión en la Cátedra de Anatomía Patológica, y que presenta para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 26 de abril de 2010

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized initials and a surname.

Fdo.: Vicente Vicente Ortega





UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D. **Miguel Alcaraz Baños**, Profesor Titular del Área de Radiología y Medicina Física en el Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física de la Universidad de Murcia,

**AUTORIZA:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**Efectos saludables de flavonoides. Estudio experimental *in vitro* e *in vivo***" realizada por D.<sup>a</sup> Nuria Álvarez Sánchez, bajo mi dirección y supervisión en la Cátedra de Anatomía Patológica, y que presenta para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 26 de abril de 2010

  
Fdo.: Miguel Alcaraz Baños





Este trabajo ha sido realizado gracias a la concesión de una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación (AP-2005-1671).



## **AGRADECIMIENTOS**

---



---

Esta tesis doctoral ha supuesto mi viaje iniciático como investigadora. Tuve la suerte de hacer una estancia en Países Bajos y de desarrollar una tesis de licenciatura, que me prepararon, en parte, para lo que se me avecinaba con la tesis. Aun así, estos cuatro años de tesis han sido un gran reto; poco a poco, a base de muchos tropiezos, los experimentos han ido avanzando, haciendo olvidar la frustración de los que no habían ido bien.

A lo largo de este viaje he recibido la ayuda de mucha gente, que me ha brindado sus conocimientos y que ha compartido la desilusión frente a un callejón sin salida y la alegría de un buen resultado. Ellos son los verdaderos responsables de que haya podido completar este estudio. No obstante, quiero destacar a las personas que, por su especial colaboración en este trabajo, merecen mi más profundo agradecimiento:

A mis directores, los doctores Vicente Vicente y Miguel Alcaraz, sin cuyos conocimientos, trabajo constante, paciencia, apoyo y enseñanzas hubiera sido imposible llevar a cabo esta tesis doctoral.

A la empresa Nutrafur S.A., por proporcionarnos amablemente la apigenina potásica. A los doctores Julián Castillo y Obdulio Benavente-García, de Nutrafur S.A., por brindarme sus vastos conocimientos en el campo de los polifenoles, siempre con una sonrisa; por su paciencia y por estar disponibles en cualquier momento para resolver mis dudas. Así como a doña Ana Marín, de esta empresa, por su valiosa colaboración en el análisis cromatográfico de las muestras.

A los doctores Antonia Bernabéu y José Muñoz y a doña Juana García, del Servicio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Murcia, por toda la ayuda que me han brindado en los trabajos *in vitro*, por su enorme

---

---

capacidad de trabajo, su paciencia y por el alegre y estimulante ambiente que han conseguido crear entre los usuarios y el equipo del Servicio.

A doña Carmen Lagares, a don Antonio Cano, a la doctora Nuria García y al resto del personal del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia, por su colaboración en el cuidado y manejo de los animales utilizados en este trabajo, así como por sus consejos para mejorar los experimentos con animales.

A la doctora María Dolores Alcázar y a don Régulo Cánovas, del Servicio de Radioprotección y Residuos de la Universidad de Murcia, por su apoyo técnico, su disposición y su amabilidad.

A las doctoras María Teresa Castells y Fara Saez, del Servicio de Análisis de Imagen de la Universidad de Murcia, por su colaboración, su consejo, su alegría y por todas las facilidades que me han dado para trabajar con ellas.

A doña María García, a la doctora Francisca Calderón, a doña Manuela Bernal y a los demás trabajadores del Servicio Universitario de Microscopía de la Universidad de Murcia, por su apoyo técnico en la realización de las microfotografías y ultramicrofotografías de este trabajo, y por su inestimable colaboración en el procesamiento de las muestras para microscopía electrónica.

Al doctor Manuel Canteras, por su valiosa colaboración en el análisis estadístico e interpretación de los datos obtenidos a lo largo de estos años.

A todos los compañeros que han pasado por la Cátedra: Víctor, Paco, Alberto, Lydia, Brad, Pepa y Cristina, por sus ánimos, sus consejos,

---

---

su compañía y su buen humor. Muchas gracias por hacerme sentir entre amigos. Y a Angélica, Encarni y Paula, estudiantes de Técnico Superior en Anatomía Patológica en prácticas que han estado colaborando con nosotros, por su apoyo técnico.

A Ana Belén, a David y a Hermógenes, los *chinos*, por su ayuda y su amistad.

A Myriam y Bárbara, por compartir mis penas y alegrías desde cualquier lugar del mundo.

A Elvira, por su hospitalidad, su cariñosa acogida y por su ayuda.

A mi abuela, por sentirse orgullosa de mí, pase lo que pase.

A mis padres, por su apoyo constante, su cariño y su paciencia; por haberme animado desde pequeña a preguntar “¿por qué?”; por impulsarme a hacer lo que me gusta... Por ser mis padres, en definitiva.

A Miguel Ángel, por acompañarme en este viaje desde el principio, desde 30; por su cariño, su paciencia, sus ánimos y por la alegría que me ha traído. Y, también, por inventar sus “macroflowers” y “mutaciones del bonobo” para hacerme reír en los momentos malos.

---



A los que no están



# ÍNDICE

---



---

<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>5</b>
Flavonoides	7
La apigenina	19
Efecto antioxidante de los flavonoides	21
Efecto de los flavonoides sobre distintas rutas bioquímicas	24
Flavonoides e inflamación	38
Flavonoides y cáncer	45
Flavonoides y radiaciones	64
<b>Objetivos</b>	<b>85</b>
<b>Material y Métodos</b>	<b>89</b>
<b>Material</b>	<b>91</b>
Estudios <i>in vitro</i>	93
Estudios <i>in vivo</i>	100
Agente: compuesto polifenólico	103
<b>Métodos</b>	<b>105</b>
Estudios <i>in vitro</i>	107
Estudios <i>in vivo</i>	122
<b>Resultados</b>	<b>135</b>
Efecto antiinflamatorio de la apigenina potásica	137
Efectos de la apigenina potásica sobre dos líneas celulares de próstata tumoral (TRAMP-C1) y no tumoral (PNT2) <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	147
Efecto de la apigenina potásica frente a radiaciones ionizantes y no ionizantes	191
<b>Discusión</b>	<b>253</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>307</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>311</b>
<b>Anexo I: Abreviaturas</b>	<b>373</b>

---



# **INTRODUCCIÓN**

---



Existen muchos estudios que demuestran los beneficios aportados por las dietas ricas en vegetales. Distintos autores han demostrado que la ingesta abundante de frutas y verduras reduce el riesgo de padecer desde enfermedades inflamatorias (Kim, 2004a; Kim, 2004b; Rahman, 2006) a varios tipos de cáncer (cáncer gástrico y de esófago (Sun, 2002), de próstata (Berkow, 2007; Gates, 2009; Wang, 2009), etc.). Aunque hay numerosas moléculas implicadas en estos efectos saludables, probablemente el grupo más importante sea el de los flavonoides (Chun, 2005).

Estos compuestos polifenólicos, de los cuales hay descritos más de 8000 (Benavente-García, 2008), son metabolitos secundarios de las plantas, con numerosas funciones dentro del reino vegetal, desde

protección frente a la radiación, a predadores o patógenos (Havsteen, 2002; Del Río, 2004; Ortuño, 2006; Stevenson, 2007), hasta el establecimiento de simbiosis con bacterias, insectos o animales (Havsteen, 2002). En mamíferos, estas moléculas tienen diversas acciones: son antioxidantes tanto directos (Heijnen, 2001; Benavente-García, 2008), como indirectos (Nielsen, 1999; Rahman, 2006; Stevenson, 2007); antiinflamatorios (Kim, 2004a; Kawai, 2007; García-Lafuente, 2009); antitumorales (Patel, 2007; Benavente-García, 2008), afectando a todas las etapas de la carcinogénesis; fotoprotectores (Svobodova, 2006; Yaar, 2007; Dinkova-Kostova, 2008; González, 2008; Nichols, 2010) y radioprotectores (Shimoi, 1996; Castillo, 2000; Benavente-García, 2002; Rithidech, 2005a; Alcaraz, 2006; Del Baño, 2006; Alcaraz, 2009; Benkovic, 2009a); protegen el sistema cardiovascular y nervioso (Benavente-García, 2008). Muchos de sus efectos son mediados por su capacidad de regular distintas enzimas o rutas de señalización; así, modulan el metabolismo del ácido araquidónico (Kim, 2004a; Yoon, 2005; Kawai, 2007), la cascada de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK), las rutas de la proteína quinasa (PK) C y de PKB/Akt, o el factor de transcripción factor nuclear (NF) - $\kappa$ B (Patel, 2007; Benavente-García, 2008; Crozier, 2009), etc.

La apigenina (4', 5, 7 trihidroxiflavona), flavonoide abundante en vegetales como el apio y perejil o la manzanilla (Harnly, 2006; McKay, 2006; Usda, 2007), reduce el estrés oxidativo (Patel, 2007), es sedante y ansiolítica (McKay, 2006), antimutagénica (Siddique, 2008; Siddique, 2009) y radioprotectora (Rithidech, 2005a). Tiene efectos antitumorigénicos y antitumorales (Rithidech, 2005a; Patel, 2007) y actividad antialérgica y antiinflamatoria (Yano, 2007) y regula distintas vías de señalización (Kim, 2006; Van Dross, 2007). Por todas estas características, elegimos un derivado hidrosoluble de la apigenina, la apigenina potásica, para el presente estudio.

## **ANTECEDENTES**

---

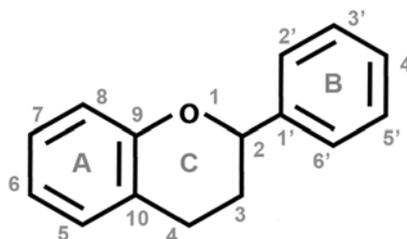


## **I. FLAVONOIDES**

Clásicamente, la medicina tradicional ha utilizado extractos de plantas en el tratamiento de diversas enfermedades, desde el cáncer a las enfermedades inflamatorias. Por otro lado, numerosos estudios indican la importancia de la ingesta de dietas ricas en productos vegetales en la prevención de numerosas patologías, entre ellas, el cáncer (García-Closas, 1999; Hillman, 2001; Gates, 2009), la diabetes tipo II (Scalbert, 2005) o las enfermedades cardiovasculares (Berkow, 2007; Benavente-García, 2008; Grassi, 2009), neurodegenerativas (Scalbert, 2005; Letenneur, 2007), inflamatorias crónicas y alérgicas (Kim, 2004a; Kim, 2004b; Rahman, 2006). Esto ha llevado a que, en las últimas décadas, se hayan realizado grandes esfuerzos para descubrir las moléculas

responsables de estas propiedades saludables de los vegetales, identificando numerosos compuestos, tales como los micronutrientes, la fibra o el licopeno (Berkow, 2007; Patel, 2007); sin embargo, entre estos agentes destaca el grupo de los flavonoides (Chun, 2005). Estos compuestos, al contrario que las vitaminas y otros micronutrientes, se consideran fitoquímicos, ya que no son esenciales para el bienestar a corto plazo, y son metabolizados en el organismo como si fueran xenobióticos (Crozier, 2009).

Los flavonoides son compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura básica benzo- $\gamma$ -pirona ( $C_6-C_3-C_6$ ) (Fig. 1) (Benavente-García, 2008; Crozier, 2009). Los flavonoides se clasifican en seis clases principales, según la conexión



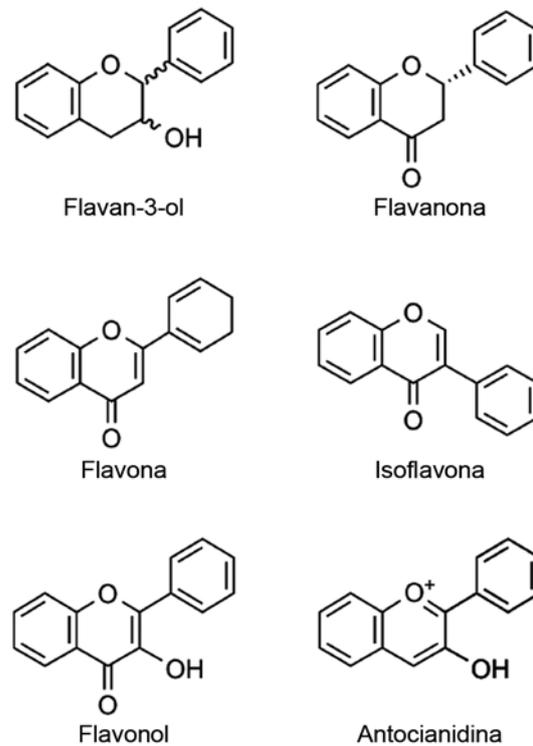
**Figura 1.** Estructura general de los flavonoides.

entre los anillos B y C, el estado de oxidación y los grupos funcionales del anillo C: flavanoles, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonoles y antocianidinas (Fig. 2; Tabla 1).

Muchos flavonoides se encuentran en la naturaleza en forma de glicósidos, lo que contribuye a que haya más de 8000 descritos (Benavente-García, 2008). Excepto las catequinas, el resto de flavonoides no aparecen en la forma aglicona (no glicosilada) en los vegetales; por ejemplo, los flavonoles y las flavonas de los alimentos generalmente son  $o$ - $\beta$ -glicósidos (Aherne, 2002; Crozier, 2009).

Subclase	Conexión anillo B-C	Insaturación del anillo C	Grupos funcionales del anillo C	Flavonoides más importantes	Alimentos ricos
Flavanoles, flavan-3-oles, catequinas	2	Ninguna	3-hidroxi  3-O-galato	(+)-Catequina (+)-Galocatequina (-)-Epicatequina (-)-Epigallocatequina  (-)-Epicatequina-3-galato (-)-Epigallocatequina-3-galato	Té, uvas rojas, vino tinto, chocolate, frutas (albaricoques)
Flavanonas	2	Ninguna	4-oxo	Hesperetina Naringenina Eriodictiol Sus 7-o-glucósidos	Frutos cítricos
Flavonas	2	C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub>	4-oxo	Apigenina Luteolina Baicaleína Sus 7-o-glucósidos	Perejil, apio
Isoflavonas	3	C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub>	4-oxo	Genisteína Daidzeína Gliciteína Biochanina A Formononetina	Semillas de soja, legumbres
Flavonoles	2	C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub>	3-hidroxi, 4-oxo	Kaempferol Miricetina Quercetina Isorhamnetina Sus 7-o-glucósidos	En casi todos los alimentos; en especial en cebollas, col rizada, puerro, brócoli, arándano
Antocianinas	2	C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> -C <sub>4</sub>	3-hidroxi	Cianidina Delfinidina Malvidina Pelargonidina Peonidina	Bayas rojas, azules y moradas

**Tabla 1.** Características químicas de las subclases de flavonoides, nombres de los flavonoides más importantes y fuentes alimentarias más ricas (según Ross (2002), Beecher (2003) y Manach (2004)).



**Figura 2.** Estructura general de las distintas familias de flavonoides (Crozier, 2009).

Los flavonoides son productos del metabolismo secundario de las plantas, y desempeñan numerosas funciones en los vegetales. Casi todos los flavonoides son pigmentos, con todos los colores del espectro, incluida la región ultravioleta (UV); esto, junto a sus propiedades electrónicas, los asocia con la atracción de insectos, animales y aves polinizadores, aunque también participan en la regulación de genes sensibles a la luz. No obstante, no tienen un papel conocido en la fotosíntesis (Havsteen, 2002).

Por otra parte, estos compuestos son importantes en la protección de las plantas frente a los predadores. Así, la polimerización de

polifenoles mediante la polifenol oxidasa en zonas dañadas sella los tejidos heridos e impide que los insectos se alimenten de esa área. Asimismo, los flavonoides, bien por su sabor amargo, bien por su capacidad de precipitar proteínas en el intestino y dificultar la digestión, evitan que los mamíferos y otros animales se alimenten de las plantas (Stevenson, 2007).

Además, desempeñan un importante y complejo papel en el metabolismo del nitrógeno en las plantas que establecen simbiosis con especies de *Rhizobium spp.* En este aspecto, regulan la expresión de proteínas necesarias en las células vegetales que forman los nódulos en los que se albergan las bacterias fijadoras de nitrógeno. También participan en la eliminación del oxígeno, cuyo nivel debe mantenerse bajo para que pueda fijarse el nitrógeno, y como mensajeros entre la planta y las bacterias fijadoras de nitrógeno (Havsteen, 2002). Igualmente, están implicados en el crecimiento y reproducción de las plantas y proporcionan resistencia a patógenos y a los daños provocados por la radiación UV (Havsteen, 2002; Ross, 2002; Del Río, 2004; Taylor, 2005).

La importancia de sus funciones biológicas en las plantas ha provocado que tengan un gran interés en la industria. Algunos flavonoides se pueden utilizar como repelentes o toxinas en la agricultura, o para obtener cultivos más resistentes mediante técnicas de mejora (Benavente-García, 1997; Ortuño, 2002; Ortuño, 2006). En el campo de la producción de alimentos, la capacidad de los flavonoides de proporcionar sabor dulce o amargo o de eliminar el amargor es ampliamente utilizada (Benavente-García, 1997).

## 1. CONSUMO DE FLAVONOIDES EN LA DIETA

Las frutas y verduras (manzanas, uvas, cebollas, legumbres), el chocolate negro y las bebidas como el café, el té (negro o verde) y el vino tinto son las principales fuentes de flavonoides en la dieta (Aherne, 2002; Beecher, 2003; Manach, 2004; Somerset, 2008; Crozier, 2009). Así, algunas frutas como las manzanas o las peras pueden contener de 2 a 4 g de polifenoles por cada kg de peso fresco (Crozier, 2009), y una copa de vino o una taza de café o té proporcionan hasta 100 mg de estas moléculas (Scalbert, 2005).

No obstante, los alimentos que proporcionan las mayores cantidades de estos compuestos pueden variar según el país: el té es la fuente fundamental de flavonoides en Japón; en Finlandia, lo son las frutas y verduras (Aherne, 2002), mientras que el té y los cítricos proporcionan la mayor proporción de flavonoides en EE UU (Chun, 2007) y en Australia (Johannot, 2006). Por otro lado, también pueden encontrarse variaciones dentro de un mismo país; así, mientras que en la dieta italiana la mayoría de flavonoides proceden del vino tinto (Hertog, 1995), en pueblos del norte del país provienen básicamente de frutas, ensaladas y sopas de verduras (Aherne, 2002).

Además, el contenido de flavonoides de los alimentos puede variar enormemente entre variedades o zonas del vegetal. Las concentraciones de quercetina son hasta 6 veces mayores en los tomates *cherry* que en otras variedades con una menor relación entre la piel y el volumen (Ross, 2002; Manach, 2004), mientras que la piel de ciertas variedades cultivadas (cultivares) de pera puede contener 1,2-2,5 g/kg frente a los 28-81 mg/kg presentes en la carne (Crozier, 2009). También la época del año puede afectar a los niveles de flavonoides en algunas plantas, pudiendo multiplicarse por 5-7 en verano; así como la exposición a la luz y la

temperatura, lo que lleva a que las plantas crecidas en España puedan contener 4-5 veces más flavonoles que las de Reino Unido. Por último, el grado de maduración de la planta y la forma de preparar los vegetales también afectan a la concentración de estos compuestos en los alimentos (Aherne, 2002; Bergquist, 2005).

En los años 70, Kuhnau (1976) calculó que la ingesta diaria de flavonoides en EEUU era de aproximadamente 1 g/día (16% de flavonoles, flavonas y flavanonas; 17% de antocianidinas; 20% de catequinas; 45% de biflavonas). Posteriormente se ha estimado que la ingesta media en Occidente de flavanoles, flavanonas, flavonoles e isoflavonas es de 100-150 mg/día, a lo que habría que sumar las antocianinas y proantocianidinas (Beecher, 2003; Manach, 2004). No obstante, diversos estudios en distintos países proponen valores muy diferentes: en EEUU se ha estimado que el consumo total de flavonoides es de, aproximadamente, 190 mg/día (Chun, 2007); en Países Bajos dos autores ofrecen valores muy dispares, entre 25 mg/día (Hertog, 1993) y 75 mg/día (Arts, 2001). En Finlandia y Japón los valores son más bajos, de  $24,2 \pm 26,7$  mg/día (Knekt, 2002) y de unos 63 mg/día (Arai, 2000), respectivamente; mientras que en Australia el consumo medio de estos compuestos llega a 454 mg/día (Johannot, 2006).

Estas grandes variaciones entre distintos estudios parecen deberse, en parte, a características metodológicas de los trabajos, puesto que muchos autores realizan la estimación a partir del contenido de 5 flavonoides principales, mientras que otros utilizan hasta 24 y, en parte, a los diferentes hábitos alimenticios. La ingesta de polifenoles es muy variable según los gustos y otras características personales: Chun *et al.* (2007) demostraron en un estudio con 8809 estadounidenses que el consumo de flavonoides en la dieta aumentaba con la edad y el nivel socioeconómico, y que era mayor en mujeres, en caucásicos y en

consumidores habituales de suplementos vitamínicos. Así, los valores pueden oscilar entre 6 y 987 mg/día en Alemania y entre 4 y 100 mg/día en Países Bajos (Manach, 2004).

Diversos factores culturales influyen en el tipo de flavonoides consumidos preferentemente. Así en Asia, donde la dieta es rica en soja, se consumen 25-40 mg/día de isoflavonas (Arai, 2000), frente a unos pocos miligramos en EEUU o Europa. En Finlandia, el flavonoide más consumido es la hesperetina, presente en cítricos, según Knekt *et al.* (2002). La ingesta de flavanoles varía de 18-31 mg/día en España a 5-1250 mg diarios en Italia (Manach, 2004).

## **2. PROPIEDADES SALUDABLES DE LOS FLAVONOIDES**

Diversos estudios epidemiológicos y caso-control han encontrado asociación entre el consumo total de flavonoides, de algunos subgrupos o de flavonoides individuales y el riesgo de sufrir distintas enfermedades crónicas. Probablemente sea la relación inversa entre el consumo de flavonoides y el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares la mejor establecida. Así, el consumo de flavonoides, especialmente de flavonoles, ha demostrado reducir el riesgo de mortalidad y morbilidad por este tipo de patologías (Grassi, 2009). Existen estudios que demuestran que la quercetina disminuye el riesgo de morir por isquemia cardiaca (Knekt, 2002) y que un consumo elevado de flavonoles y flavonas previene la muerte por enfermedades coronarias o el infarto de miocardio no fatal (Knekt, 1996; Hirvonen, 2001). Es probable que parte de estos efectos protectores se deban a las acciones de estas moléculas sobre los niveles de colesterol plasmáticos: Arai *et al.* (2000) han demostrado una correlación inversa entre el total de flavonoides o de quercetina en la dieta

y las concentraciones plasmáticas de colesterol y colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Otros autores han encontrado evidencias de los efectos protectores de la ingesta de flavonoides en la dieta frente al cáncer, aunque estos resultados son todavía controvertidos. García-Closas *et al.* (1999) demostraron una asociación inversa entre el consumo total de flavonoides, de quercetina o de kaempferol y el riesgo de padecer cáncer de estómago, mientras que, en otro estudio, la ingesta de catequinas se asoció con menor incidencia de cáncer rectal y del tracto digestivo alto (Arts, 2001). Las dietas ricas en quercetina o miricetina han demostrado proteger frente al cáncer de pulmón y de próstata, respectivamente, en hombres, y, en ese mismo estudio, se encontró una tendencia a un menor riesgo de cáncer de mama en mujeres con alta ingesta de quercetina (Knekt, 2002). Varios trabajos han encontrado que el consumo de isoflavonas previene el desarrollo de distintos cánceres, especialmente los relacionados con hormonas (Adlercreutz, 1995; Scalbert, 2005; Gates, 2009), mientras que los flavonoles y las flavonas, y, dentro de este grupo, la apigenina, protegen frente al cáncer de ovarios (Gates, 2007; Gates, 2009) y de mama (Patel, 2007). Sin embargo, otros estudios no encuentran ninguna relación entre el consumo de dietas ricas en estos compuestos y el cáncer (Wang, 2009).

Asimismo, estos compuestos parecen proteger frente a la degeneración neuronal: el consumo total de flavonoides se correlaciona con una menor pérdida de función cognitiva a lo largo del tiempo (Letenneur, 2007) y el de flavonoles y flavonas con menor incidencia de demencia (Commenges, 2000). Además, las personas con mayores ingestas de kaempferol, naringenina y hesperetina muestran una menor incidencia de accidentes cerebro-vasculares (Knekt, 2002).

Por último, el consumo de hesperetina, naringenina y quercetina ha demostrado un efecto protector frente al asma (Knekt, 2002), mientras que el de isoflavonas, bien mediante la dieta, bien mediante suplementos, previene los síntomas asociados a la menopausia (Arai, 2000) y a la osteoporosis, aumentando la densidad del hueso y mejorando los marcadores de resorción ósea en orina (Alekel, 2000; Morabito, 2002; Yamori, 2002).

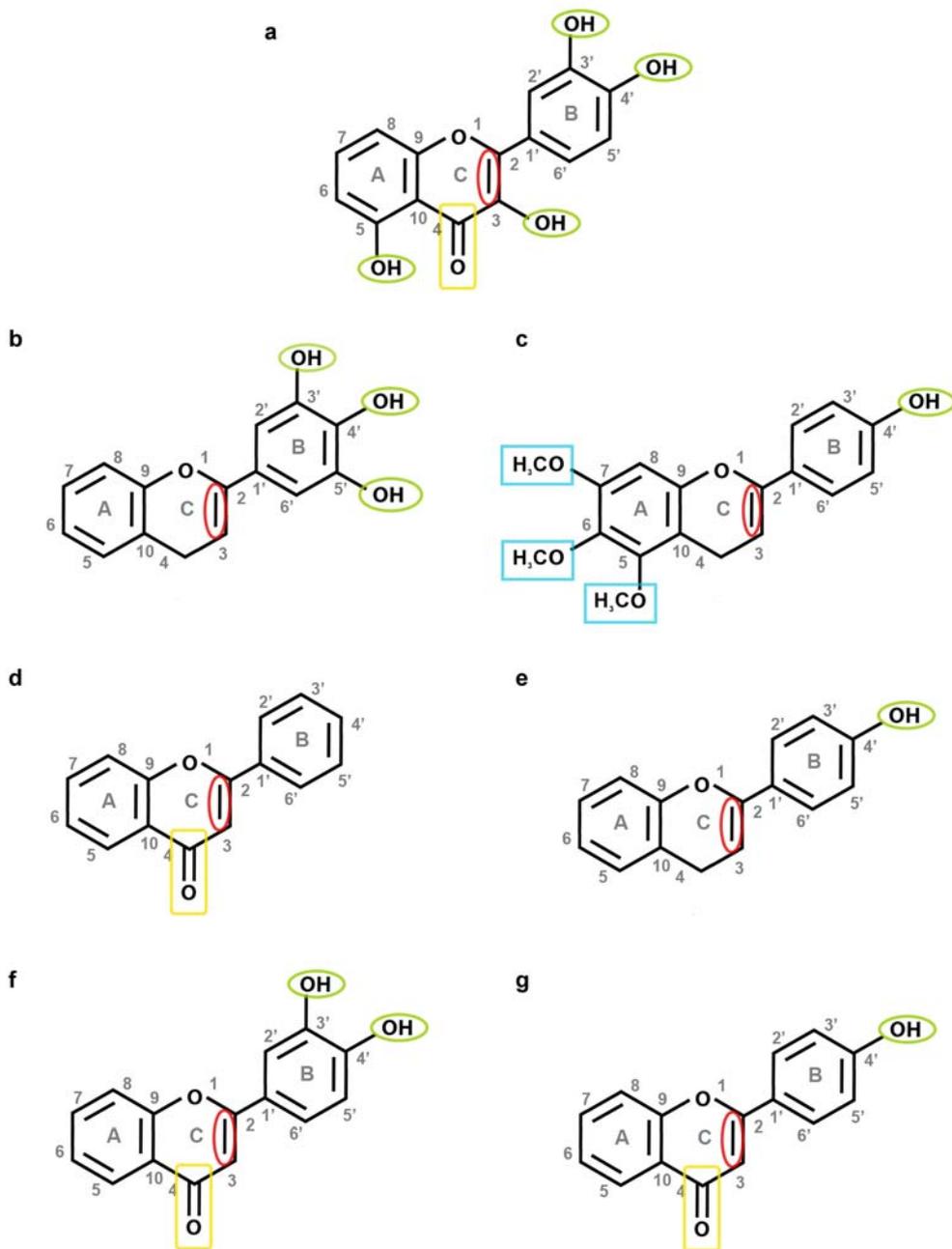
Además de estos estudios, más o menos controvertidos, sobre los efectos de los flavonoides de la dieta en la salud humana, existen numerosos trabajos experimentales para desentrañar, tanto *in vitro* como *in vivo*, los efectos de los flavonoides en cantidades próximas a las de la dieta o superiores. Estos estudios han demostrado que los flavonoides ejercen numerosos efectos biológicos: son eliminadores de radicales libres, antioxidantes, antimutagénicos, radio- y fotoprotectores, antiinflamatorios, antivirales; disminuyen los niveles plasmáticos de LDL, inhiben la agregación plaquetaria, reducen la proliferación celular, bloquean el ciclo celular, inducen apoptosis, disminuyen el estrés oxidativo, aumentan la eficacia de enzimas detoxificantes, estimulan el sistema inmune, y resultan poco tóxicos (Patel, 2007; Benavente-García, 2008; Alcaraz, 2009; Sánchez-Campillo, 2009).

Son las características de los flavonoides, como la presencia de ciertos sustituyentes, la conformación espacial o la lipofiliidad del compuesto, las que determinan en gran medida sus efectos biológicos (Heijnen, 2002). La actividad antioxidante de los flavonoides depende de la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 y de dos grupos hidroxilo en posición orto en el anillo B y otros dos en los carbonos 3 y 5 (Fig. 3a) (Benavente-García, 1997; Yang, 2001; Benavente-García, 2008; Crespo, 2008). El efecto antiproliferativo de los flavonoides frente a distintas líneas celulares tumorales aumenta si en la molécula hay un

doble enlace C2-C3 y un grupo hidroxilo en la posición 4', y es todavía mayor si, además, el compuesto es trihidroxilado (Fig. 3b), alcanzando el máximo cuando es metilado (Fig. 3c) (Rodríguez, 2002; Martínez, 2003; Benavente-García, 2008). Su capacidad antiangiogénica parece venir determinada por su actividad antioxidante, y depende del número de grupos hidroxilo presentes en el anillo B (Benavente-García, 2008).

La estructura molecular también determina la afinidad de los flavonoides por distintos receptores y enzimas: la unión al receptor de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) se ve aumentada por la presencia del doble enlace C2-C3 y de un grupo ceto en el carbono 4, así como por la conjugación de los anillos A, B y C a través de una estructura de tipo lactona (Fig. 3d) (Guerrero, 2005). Para la inhibición de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) son críticos el doble enlace C2-C3 y un grupo hidroxilo en posición 4' (Fig. 3e) (Benavente-García, 2008; Ha, 2008), mientras que la estructura planar y dos grupos pequeños en el anillo A o B son determinantes para la inhibición de quinasas (Benavente-García, 2008; Lee, 2008).

Una pequeña diferencia en la estructura puede provocar que un flavonoide sea capaz de inhibir la actividad de enzimas relacionadas: así, la presencia del doble enlace C2-C3, de un grupo ceto en la posición 4 y de un grupo catecol en los carbonos 3' y 4' en el anillo B permiten el bloqueo de las quinasas dependientes de ciclinas (cdk) 1 y 2 (Fig. 3f), lo que conlleva la parada del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>, mientras que una molécula con un solo grupo hidroxilo en posición 4' únicamente es capaz de inhibir la cdk2, causando la parada del ciclo celular en G<sub>2</sub>/M (Fig. 3g) (Benavente-García, 2008).



**Figura 3.** Relación de la estructura de los flavonoides con algunos de sus efectos biológicos: actividad antioxidante (a), antiproliferativa (b, c), afinidad por el receptor de tromboxano A<sub>2</sub> (d); inhibición de iNOS (e), de cdk 1 y 2 (f) y de cdk 1 (g). Rojo: enlace doble C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>; amarillo: grupo ceto; verde: grupo hidroxilo; azul: grupos metilo. Ver referencias en el texto.

## II. APIGENINA

La apigenina (4', 5, 7 trihidroxiflavona) es una flavona abundante en vegetales como el apio y perejil (Manach, 2004; Harnly, 2006; Usda, 2007) y en las flores de la manzanilla (*Matricaria chamomilla*) (McKay, 2006) y presente en numerosas plantas aromáticas como la menta, la mejorana, el orégano, el tomillo, la salvia o el romero (Justesen, 2001; Kulisic, 2007; Usda, 2007). También se encuentra en pequeñas cantidades en otros alimentos como las alcachofas, el vino tinto, la miel, las lechugas, el zumo de pomelo, los chiles, la cebolla roja, el nabo o el té verde (Usda, 2007).

Debido a su presencia en alimentos poco comunes en la dieta, la ingesta de apigenina es extraordinariamente variable. En Australia, el consumo de apigenina (0,45 mg/día) es mucho mayor que en EEUU (0,13 mg/día), probablemente por diferencias en el consumo de vegetales como la lechuga, el apio o el perejil (Johannot, 2006; Wang, 2009); sin embargo, Cao *et al.* (2010) calcularon que, en China, la ingesta media de apigenina es de 4,23 mg/día.

Durante siglos, la apigenina ha sido utilizada en la medicina tradicional y alternativa a través de plantas ricas en esta flavona. Así, la flor de la pasión se ha empleado para tratar el asma, el insomnio, la enfermedad de Parkinson, la neuralgia o el herpes zóster. La manzanilla, en distintas formulaciones, se ha usado para calmar la gastritis y la indigestión, o para reducir la inflamación cutánea y otros problemas dermatológicos (Patel, 2007).

La apigenina ha demostrado ser capaz de anular especies reactivas de oxígeno (ROS) (Kim, 2004b; Nagai, 2005; Patel, 2007); además de inhibir el estrés oxidativo (Jeyabal, 2005; Duarte-Almeida,

2006; Patel, 2007) y la oxidación de LDL (Kulisic, 2007). También es capaz de restaurar la depleción de antioxidantes endógenos (glutatión reducido, quinona reductasa y glutatión-S-transferasa) provocada por el tratamiento *in vivo* con benzo(a)pireno (Khan, 2006).

Este flavonoide, además, actúa como ansiolítico, sedante y antidepresivo (McKay, 2006), modificando los niveles de distintos neurotransmisores (serotonina, dopamina) alterados por el estrés leve crónico (Yi, 2008).

La apigenina tiene efectos antimutagénicos, ya que es capaz de reducir los daños en el DNA provocados por diversos compuestos genotóxicos tanto *in vitro* (Siddique, 2008), como *in vivo* (Khan, 2006; Patel, 2007; Siddique, 2009). Tiene efectos radioprotectores (Rithidech, 2005a) y puede presentar sinergia con quimioterápicos en algunas líneas tumorales (Watanabe, 2007). Es antitumorigénica tanto *in vitro*, reduciendo la tasa de transformación de fibroblastos NIH3T3, como *in vivo*, disminuyendo el número de papilomas benignos y de carcinomas escamosos inducidos por radiación UV (Birt, 1997).

Este compuesto ha demostrado actividad antialérgica (Yano, 2007) y antiinflamatoria (Gerritsen, 1995) por su actividad inmunomoduladora (Hougee, 2005; Kowalski, 2005; Comalada, 2006) y reguladora de distintas vías de señalización (Kim, 2006; Van Dross, 2007).

Este flavonoide interfiere con la proliferación (Wang, 2004; Way, 2004; Czyz, 2005; Liu, 2005; Torkin, 2005; Shukla, 2006; Chen, 2008; Li, 2009; Zhang, 2009), causa la parada del ciclo celular (Gupta, 2002; Shenouda, 2004; Wang, 2004; Shukla, 2004a; Shukla, 2006; Meeran, 2008a; Li, 2009; Zhang, 2009) y apoptosis (Shukla, 2006; Chen, 2007a; Chen, 2008; Li, 2009; Zhang, 2009), e inhibe la angiogénesis (Liu, 2005;

Fang, 2007), en distintas líneas tumorales. Además, la apigenina inhibe el proceso de metástasis (Hu, 2008; Lee, 2008).

### **III. EFECTO ANTIOXIDANTE DE LOS FLAVONOIDES Y DE LA APIGENINA**

En el organismo, las especies reactivas de oxígeno (ROS; radicales hidroxilo y peroxilo, oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno) y de nitrógeno (RNS; NO, NO<sub>2</sub>) son generadas constantemente. El anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el radical hidroxilo (·OH) y el peroxilo (R-OO·) se forman secuencialmente a partir del oxígeno, siendo necesaria la presencia de iones metálicos para la síntesis de radical hidroxilo (Benavente-García, 2002; Svobodova, 2006). Este mecanismo puede ser desencadenado por numerosos factores, entre ellos la radiación solar e ionizante, el *shock* térmico, la contaminación, etc. (Benavente-García, 2002; Svobodova, 2006; Straface, 2007; Bossi, 2008; Alcaraz, 2009; Huang, 2009).

Los ROS oxidan distintas biomoléculas, entre ellas el DNA, las proteínas o los lípidos de membrana (Benavente-García, 2002; Rithidech, 2005a; Mulero, 2006; Nishigori, 2006; Svobodova, 2006; Yaar, 2007; Alcaraz, 2009; Brzoska, 2009; Catalgol, 2009; Filip, 2009). Además, el daño oxidativo a las membranas celulares puede provocar la liberación de productos de degradación de metaloproteínas con hierro, como la ferritina, desde los lisosomas al citoplasma, aumentando los niveles de hierro y la generación de ROS en reacciones de tipo Fenton (Yu, 2003; Tenopoulou, 2005).

En condiciones normales, las especies reactivas son rápidamente inactivadas por antioxidantes (ácido ascórbico, tocoferol, ubiquinol,

glutación reducido) y enzimas (catalasa, superóxido dismutasa (SOD), glutación peroxidasa, glutación reductasa), que mantienen un equilibrio (Benavente-García, 2002; Svobodova, 2006; Yaar, 2007), pero este equilibrio puede verse desbordado por la síntesis masiva de radicales libres en respuesta a distintos estímulos.

Durante mucho tiempo, los efectos biológicos de los flavonoides se han relacionado con su actividad antioxidante. Los flavonoides son antioxidantes eficaces en un amplio rango de sistemas de oxidación química y, además de eliminar especies ROS (Benavente-García, 2002), pueden quelar los iones metálicos desencadenantes de su formación (Ross, 2002). Los flavonoides pueden eliminar diversos radicales libres de oxígeno, nitrógeno y cloro, como el radical superóxido o el hidroxilo, radicales peroxilo, el ácido hipocloroso y el peroxinitroso, así como disminuir la peroxidación de lípidos (Heijnen, 2001; Heijnen, 2002; Lai, 2002; García-Lafuente, 2009).

Parte de su actividad antioxidante puede deberse a la regeneración de las vitaminas C y E (Manach, 2004) o bien a la protección o el aumento de los antioxidantes endógenos (Khan, 2006; Rahman, 2006). Así, se ha demostrado que son capaces de inducir la expresión de NAD(P)H-quinona óxido-reductasa (NQO1) y de glutación-S-transferasas, ambas enzimas con actividad antioxidante (Stevenson, 2007). Las antocianidinas son capaces de activar la NQO1, además de la glutación-S-transferasa, la glutación reductasa y la glutación peroxidasa (Shih, 2007). La ingesta de una dieta rica en perejil (apigenina) aumenta la concentración de glutación reductasa y SOD en humanos (Nielsen, 1999), mientras que la luteolina incrementa los niveles de catalasa y SOD (Stevenson, 2007).

Además, algunos estudios han demostrado la capacidad de ciertos flavonoides (crisina, luteolina, kaempferol, quercetina, miricetina) de

inhibir la actividad de la xantina oxidasa, enzima productora de radicales libres de oxígeno, disminuyendo de esta forma el daño oxidativo (García-Lafuente, 2009).

Por otra parte, la capacidad antioxidante de los flavonoides podría influir directamente en la expresión y modulación de genes. Varios polifenoles (ácido gálico, ácido ferúlico, resveratrol, curcumina) han demostrado activar al factor de transcripción relacionado con NF-E2 p45 (Nrf) 2, permitiendo así la transcripción de genes inducidos por xenobióticos y antioxidantes, cuya expresión es un mecanismo muy importante de protección frente al estrés oxidativo (Crozier, 2009). También muchos flavonoides, entre ellos la apigenina, afectan al factor de transcripción redox-sensible factor nuclear (NF) - $\kappa$ B (Kim, 2004a; Rithidech, 2005a; Yoon, 2005; Comalada, 2006; Pergola, 2006; Crozier, 2009).

Aunque se ha detectado un aumento de la capacidad antioxidante del plasma tras la ingesta de alimentos ricos en polifenoles (Manach, 2004; Lotito, 2006a), algunos autores dudan de que las bajas concentraciones plasmáticas de los flavonoides, su rápida metabolización y que el metabolismo de estos compuestos genere típicamente 2 o 3 metabolitos (aunque, en el caso de los glicósidos de quercetina se puedan formar hasta 20 metabolitos) permitan que su contribución a la función antioxidante de plasma y tejidos sea muy importante (Yoon, 2005; Rahman, 2006; Crozier, 2009).

La actividad biológica de los flavonoides no se explica únicamente por sus propiedades antioxidantes, ya que, además, estos compuestos son capaces de modular la actividad de distintas enzimas y de varias cascadas de transducción de señales.

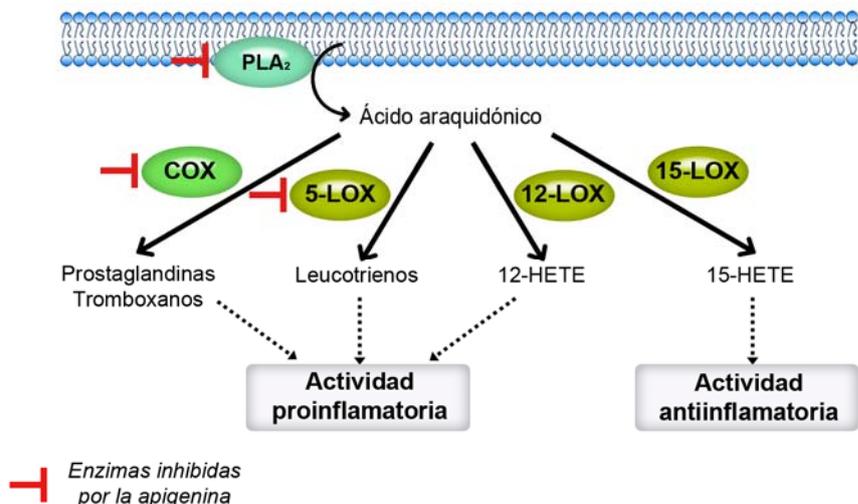
## **IV. EFECTO DE LOS FLAVONOIDES Y DE LA APIGENINA SOBRE DISTINTAS RUTAS BIOQUÍMICAS**

Muchas de las actividades biológicas de los flavonoides se deben a su capacidad de modificar la actividad de distintos sistemas enzimáticos, en parte por su interacción con las enzimas reguladoras a través de sus zonas de unión de nucleótidos (Benavente-García, 2008).

### **1. FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)**

La PLA<sub>2</sub> libera ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana (Fig. 4). Hay tres tipos de fosfolipasas: secretoras (sPLA<sub>2</sub>), citosólicas (cPLA<sub>2</sub>) e independientes de calcio (iPLA<sub>2</sub>). Esta familia está formada por, al menos, 10 isozimas con diferente expresión y distribución, algunas de las cuales están estrechamente asociadas con procesos alérgicos e inflamatorios (sPLA<sub>2</sub>-IIA) (Yoon, 2005).

Muchos flavonoides (kaempferol, miricetina, escutelarina, apigenina) y polifenoles (curcumina) son inhibidores de distintas isoformas de PLA<sub>2</sub>, incluso a concentraciones micromolares; la quercetina, por ejemplo, inhibe selectivamente la isozima sPLA<sub>2</sub>-IIA, que se sobreexpresa durante la inflamación (Kim, 2004a; Van Dross, 2005; Yoon, 2005; Kawai, 2007).



**Figura 4.** Inhibición del metabolismo del ácido araquidónico y las principales enzimas implicadas por la apigenina. COX: ciclooxigenasa; HETE: ácido hidroxieicosatetraenoico; LOX: lipooxigenasa; PLA<sub>2</sub>: fosfolipasa A<sub>2</sub>.

## 2. CICLOOXIGENASAS (COX)

Las COX son las enzimas responsables de convertir el ácido araquidónico en prostaglandinas y tromboxanos (Fig. 4), controlando la intensidad y duración del dolor, la aparición de fiebre y la tumefacción y el calor del área afectada. Existen dos isoformas: COX-1 y COX-2. COX-1 es constitutiva y se expresa en casi todos los tipos celulares, produciendo los tromboxanos agregantes sanguíneos y las prostaglandinas citoprotectoras; su inhibición (con antiinflamatorios no esteroideos (AINE), por ejemplo) puede provocar efectos secundarios tales como ulceración gástrica o fallo renal. COX-2 es la isoforma inducible generadora, en la mayoría de los casos, de grandes cantidades de prostaglandinas, y se expresa en células relacionadas con la inflamación (macrófagos, mastocitos, células endoteliales) activadas por citoquinas, factores de

crecimiento, promotores tumorales, mitógenos o agentes inductores de estrés (Kim, 2004a; O'Leary, 2004; Ghosh, 2007; Kawai, 2007) y también otros tipos celulares, como en células tumorales (Ghosh, 2007; Harris, 2007a; Harris, 2007b; Haverkamp, 2008) o en células de piel irradiadas con UV (Rundhaug, 2008).

Numerosos flavonoides han demostrado inhibir COX-2 tanto a nivel enzimático (quercetina, 3-galato de epigallocatequina (EGCG)) como transcripcional (luteolina, genisteína, kaempferol, procianidinas) (Kim, 2004a; O'Leary, 2004; Yoon, 2005; Meeran, 2008b; Nandakumar, 2008); dentro de este último grupo destaca la apigenina, un potente inhibidor de la expresión de COX-2 que no afecta a la de COX-1 (Van Dross, 2005; Van Dross, 2007; Ha, 2008).

### **3. LIPOOXIGENASAS (LOX)**

Las LOX son las enzimas productoras de hidroxil ácidos y leucotrienos (Fig. 4). Se han identificado tres isozimas: 15-LOX, que tiene efectos antiinflamatorios y anticarcinogénicos, y 5-LOX y 12-LOX, relacionadas con enfermedades alérgicas e inflamatorias y con el fotoenvejecimiento (Kim, 2004a; O'Leary, 2004; Yoon, 2005; Yoo, 2008). Además, se ha comprobado que un aumento en la expresión de 12-LOX en células tumorales causa un incremento en la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), clave en la angiogénesis (Benavente-García, 2008).

Diversos estudios han identificado potentes inhibidores de 5-LOX y 12-LOX en el grupo de los flavonoides. Flavonoles como el kaempferol, la quercetina o la morina, flavonas como la baicaleína y algunas

protoantocianidinas han demostrado ser potentes inhibidores de 5-LOX, mientras que otros como la quercetina o la baicaleína inhiben 12-LOX (Kim, 2004a; O'Leary, 2004; Yoon, 2005; Kawai, 2007; Benavente-García, 2008).

Más importante todavía resulta el descubrimiento de que algunos flavonoides, entre ellos la apigenina, inhiben tanto PLA<sub>2</sub>, como COX-2 y 5-LOX (Van Dross, 2005; Kim, 2006; Patel, 2007).

#### **4. ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (NOS)**

El óxido nítrico (NO) es un mediador celular muy importante sintetizado por la NOS a partir de L-arginina. Existen tres isoformas de NOS: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS); únicamente ésta última se expresa en respuesta a estímulos proinflamatorios (citoquinas, endotoxinas, ROS) en células como los macrófagos (Olszanecki, 2002; Kim, 2004a).

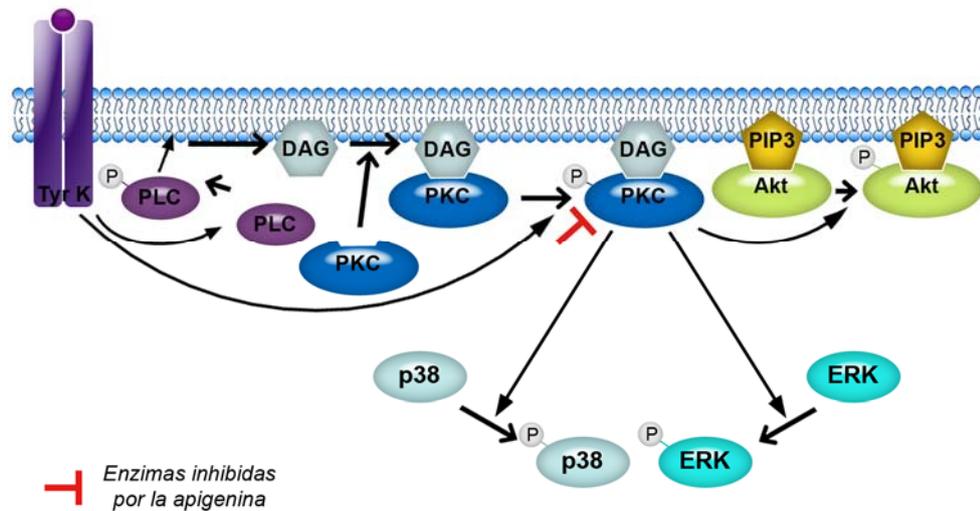
Son pocos los flavonoides que actúan sobre la actividad de iNOS (antocianidinas) (Pergola, 2006); sin embargo, muchos impiden la síntesis de NO mediante el bloqueo de la expresión de iNOS, destacando en este grupo la apigenina y el kaempferol (Liang, 1999; Olszanecki, 2002; Kim, 2004a; Comalada, 2006; Benavente-García, 2008; Ha, 2008; Meeran, 2008b).

## 5. RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

La expresión de la mayoría de las proteínas mencionadas hasta ahora está regulada por varias rutas de transducción de señales y factores de transcripción, que son las principales dianas de los flavonoides.

**Proteín quinasa C (PKC).** La PKC es una familia de Ser/Thr quinasas, que comprende 12 isoformas dependientes de calcio y fosfolípidos (Fig. 5), divididas en 3 grupos: clásicas ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$ ), dependientes de calcio y diacilglicerol (DAG); las nuevas ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ), que utilizan DAG como cofactor; y las atípicas ( $\zeta$ ,  $\iota$ ), cuyos cofactores no son todavía conocidos (Bossi, 2008). Estas quinasas están implicadas en numerosas actividades celulares: promoción tumoral, apoptosis, diferenciación celular, angiogénesis, inflamación (producción de interleuquinas (IL) -1 y -8, de interferón (IFN)...), regulación de las respuestas inmunes adquirida e innata, etc. (Havsteen, 2002; Adcock, 2006; Ali, 2009). La desregulación de esta familia de enzimas es muy común en diversos tumores, entre ellos los cánceres de mama y próstata (Ali, 2009), y también están relacionadas con la señalización inducida por radiación UV (Bossi, 2008).

Varios autores han descrito que algunos flavonoides, entre ellos la apigenina, actúan como inhibidores de PKC (Liang, 1999; Kim, 2004a; Rithidech, 2005a; Lotito, 2006b; Patel, 2007). Incluso se está evaluando el uso de la curcumina, un polifenol que actúa como un potente inhibidor de PKC, para el tratamiento del mieloma múltiple, el cáncer colorrectal y el de páncreas (Ali, 2009).



**Figura 5.** Regulación de la vía de PKC por la apigenina. *Akt*: Akt-proteín quinasa B; *DAG*: diacilglicerol; *ERK*: quinasa regulada por señales extracelulares; *PIP3*: fosfatidil inositol (3,4,5) trifosfato; *PKC*: proteín quinasa C; *PLC*: fosfolipasa C. (Liang, 1999; Rithidech, 2005a; Patel, 2007).

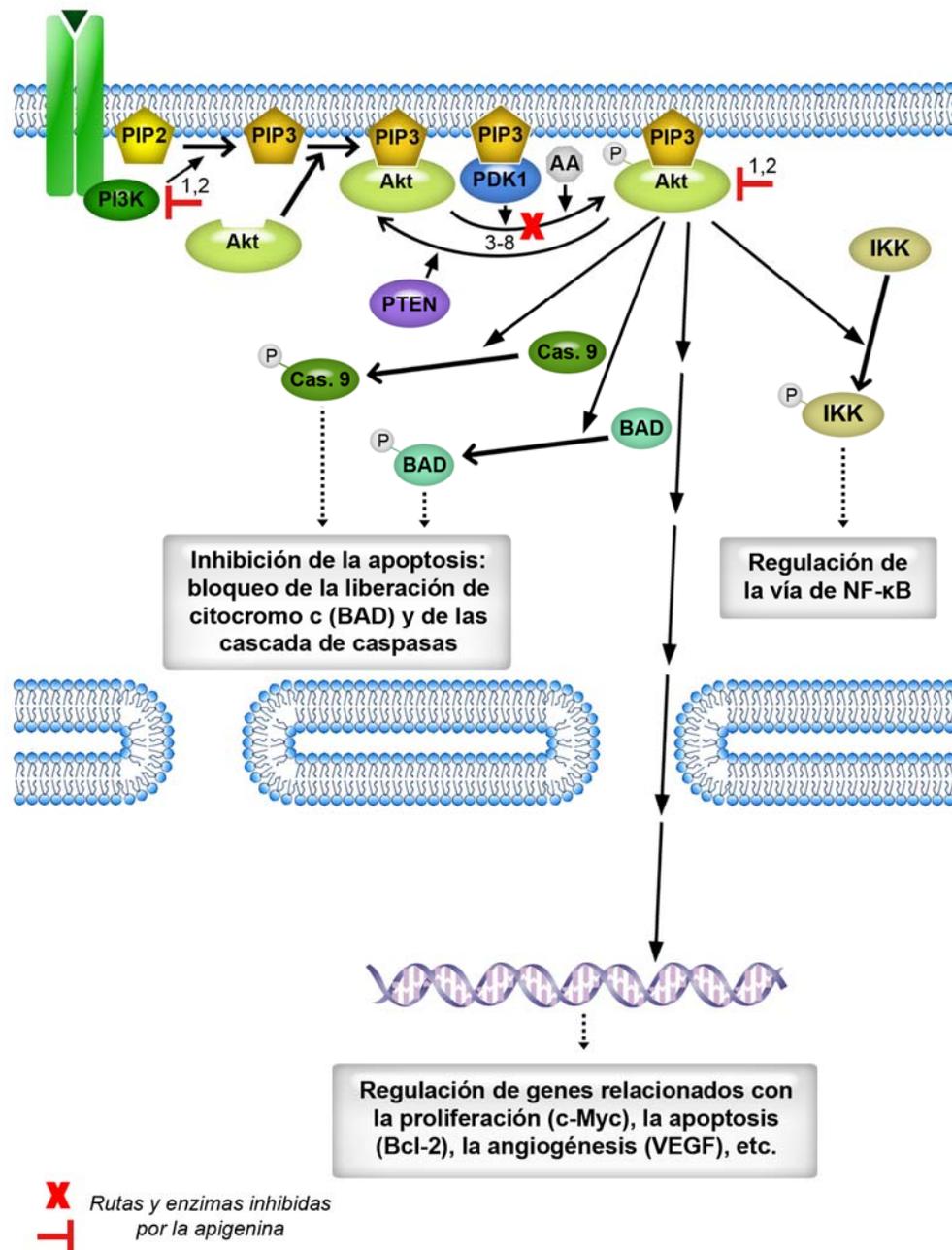
**Fosfoinositol quinasa (PI3K), Akt / proteín quinasa B (PKB), homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN).** Akt-1, -2 y -3 son isoformas de la familia de la PKB que forman parte de la vía de transducción de señales del fosfatidil inositol trifosfato ( $PIP_3$ ), implicada en el control del crecimiento y el ciclo celular, de la apoptosis, la migración, la invasión y la angiogénesis. PTEN es una enzima que provoca la defosforilación (inactivación) de Akt (Assinder, 2009). Esta cascada, además, está regulada por el ácido araquidónico, que aumenta la fosforilación de Akt e inactiva a PTEN (Assinder, 2009) (Fig. 6). Esta ruta de señalización se activa de forma aberrante en distintos tumores humanos, como en el carcinoma gástrico, ovárico y prostático o el cáncer de mama (Kaur, 2008; Assinder, 2009).

La apigenina, entre otros flavonoides (antocianidinas, etc.), ha demostrado inhibir distintas fases de esta vía (Kim, 2004c; Way, 2004; Shukla, 2006; Patel, 2007; Benavente-García, 2008; Kaur, 2008; Lee, 2008; Meeran, 2008a; Mirzoeva, 2008; Nandakumar, 2008; Li, 2009).

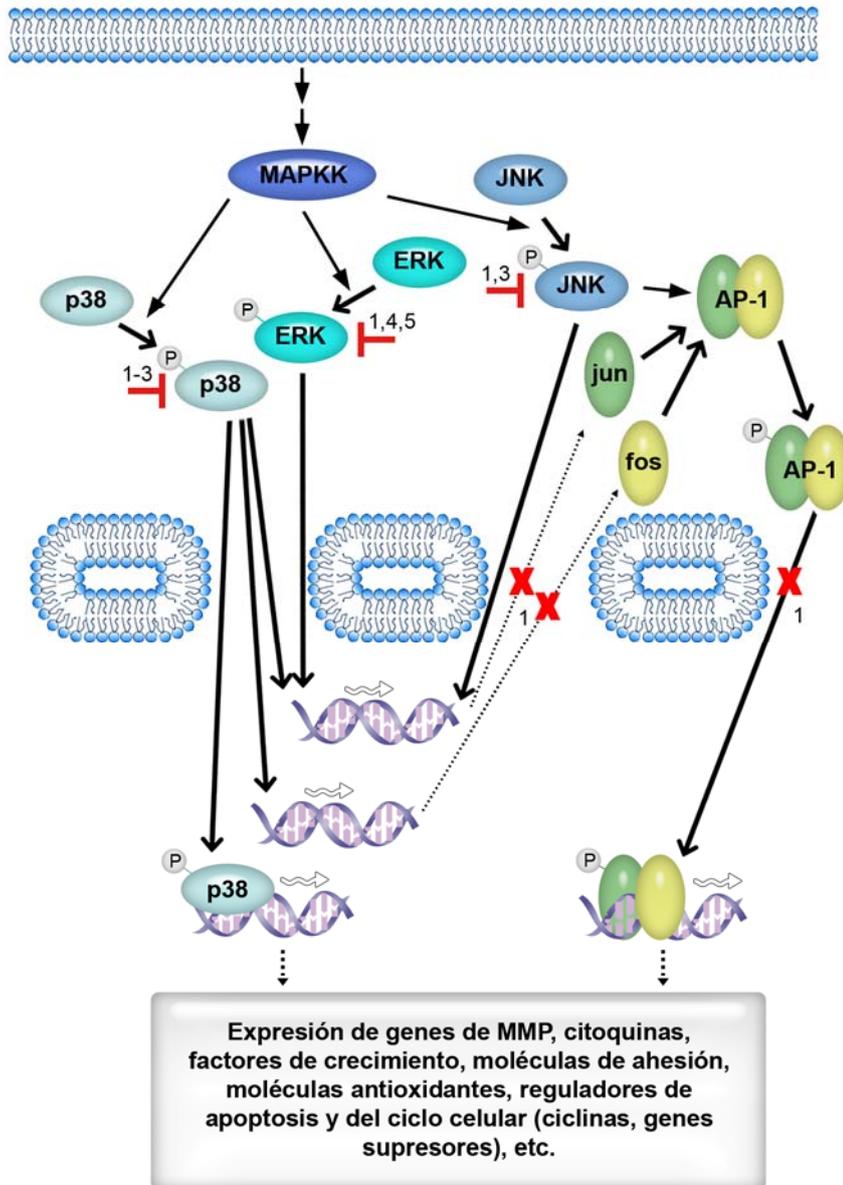
**Quinasas activadas por mitógenos (MAPK).** Una de las principales rutas de transducción de señales es la de las MAPK (Fig. 7), una familia de proteínas señalizadoras, cuyos miembros mejor caracterizados son: la proteína quinasa regulada por señales extracelulares (Erk), la quinasa N-terminal de c-Jun / proteína quinasa activada por estrés (JNK) y p38 MAPK. Esta cascada regula la expresión y actividad de la proteína activadora (AP) -1, un factor transcripcional redox-sensible que activa en el núcleo la transcripción de numerosos genes: metaloproteasas de matriz (MMP), factores de crecimiento, enzimas antioxidantes, moléculas de adhesión, citoquinas, etc., así como ciclinas, reguladores de la apoptosis y genes supresores (p53, p21/WAF1, p16) (Adcock, 2006; Dodeller, 2006; Mossman, 2006; Crozier, 2009). La expresión de AP-1 se ve aumentada durante las enfermedades inflamatorias (Sawatzky, 2006).

No obstante, además de regular la expresión génica a través de AP-1, algunas MAPK pueden ejercer de factores de transcripción por sí mismas. De esta forma, p38 induce la síntesis de diversos genes relacionados con la inflamación, entre ellos iNOS, IL-6 o el factor de necrosis tumoral (TNF) - $\alpha$  (García-Lafuente, 2009).

Numerosos flavonoides (quercetina, wogonina, EGCG, luteolina, apigenina, antocianidinas, catequinas) inhiben esta cascada o el factor de transcripción AP-1 (Kim, 2004a; Hirano, 2006; Huang, 2006; Pergola, 2006; Sawatzky, 2006; Lim, 2007; Nandakumar, 2008; Crozier, 2009).



**Figura 6.** Regulación de la vía de PI3K/Akt/PTEN por la apigenina. *Akt*: Akt-proteína quinasa B; *BAD*: promotor de muerte asociado con Bcl-2/Bcl<sub>xL</sub>; *Cas*: caspasa; *IKK*: quinasa de la proteína inhibidora de NF-κB; *NF-κB*: factor nuclear κB; *PDK1*: quinasa dependiente de fosfoinositol 1; *PI3K*: fosfoinositol quinasa; *PIP2*: fosfatidil inositol (4,5) bifosfato; *PIP3*: fosfatidil inositol (3,4,5) trifosfato; *PTEN*: homólogo de fosfatasa y tensina; *VEGF*: factor de crecimiento del endotelio vascular (1: (Shukla, 2006); 2: (Li, 2009); 3: (Kim, 2004c); 4: (Van Dross, 2005); 5: (Ruiz, 2006); 6: (Kaur, 2008); 7: (Lee, 2008); 8: (Mirzoeva, 2008)).



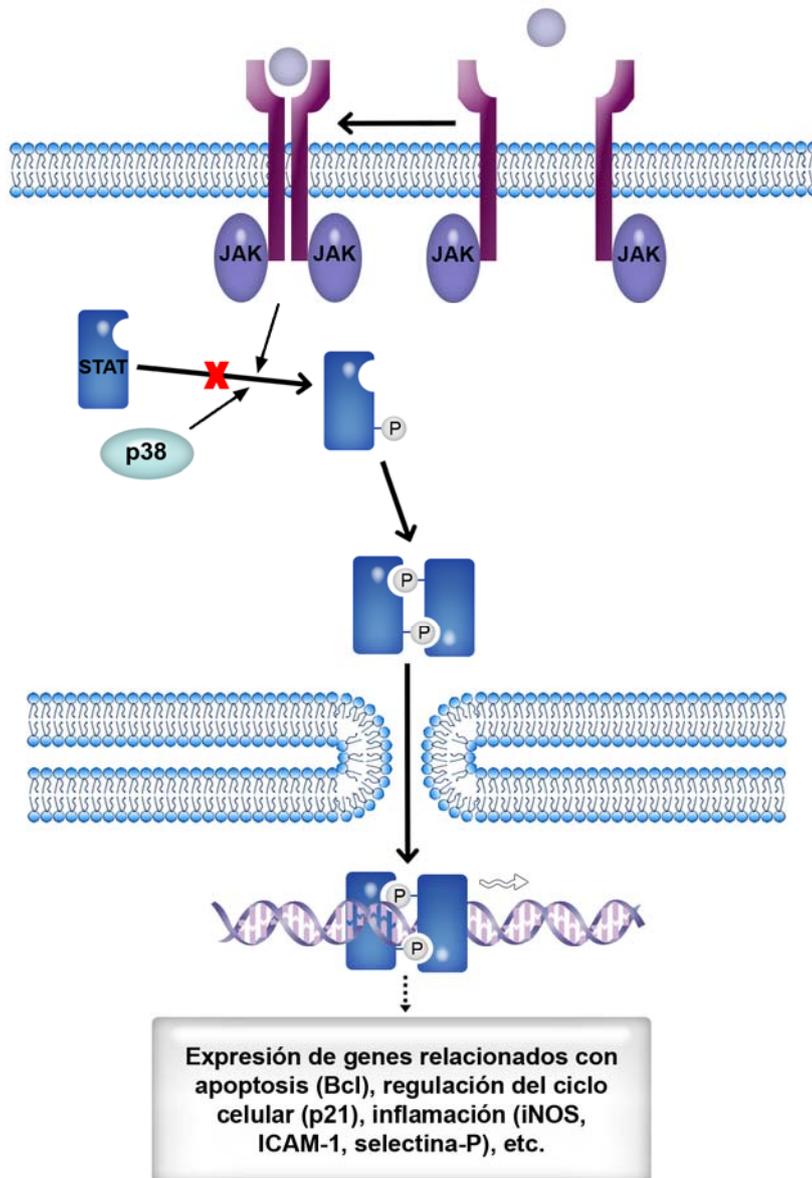
**X** Rutas y enzimas inhibidas por la apigenina  
**┘**

**Figura 7.** Vía de las MAPK afectada por la apigenina. *AP-1*: proteína activadora 1; *ERK*: quinasa regulada por señales extracelulares; *JNK*: quinasa N-terminal de c-jun; *MAPK*: proteína quinasa activada por mitógenos; *MAPKK*: quinasa de MAPK; *MMP*: metaloproteasas de matriz. (1: (Chen, 2004); 2: (O'Prey, 2003); 3: (Ha, 2008); 4: (Sawatzky, 2006); 5: (Patel, 2007)).

**Proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT).** Estas moléculas median la regulación de diversos genes en respuesta a citoquinas; su activación mediante las quinasas Janus (JAK) induce la expresión de la molécula de adhesión intercelular (ICAM) -1 o de selectina P (Adcock, 2006; Chen, 2007b) (Fig. 8). También modulan procesos celulares como la activación, degranulación, y producción de citoquinas de mastocitos (Chen, 2007b).

Varios flavonoides, entre ellos la taxifolina, el EGCG, la silimarina, la luteolina y la apigenina, han demostrado inhibir la fosforilación de STAT (Bito, 2002; Tedeschi, 2002; Matsuda, 2005; Giunta, 2006; Ansó, 2010).

**Factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B).** Este factor de transcripción es activado por radicales libres, estímulos inflamatorios, carcinógenos y promotores tumorales, endotoxinas y radiaciones  $\gamma$ , X y UV. Regula la transcripción de diversos genes, entre los que destacan citoquinas (IL-6, -8), COX-2, LOX, iNOS, moléculas de adhesión (ICAM-1), quimioquinas (TNF- $\alpha$ ), MMP, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II, factores de crecimiento, ciclinas, inhibidores de apoptosis o compuestos relacionados con la metástasis (Shukla, 2004b; Yoon, 2005; Adcock, 2006; Rahman, 2006; Crozier, 2009; García-Lafuente, 2009) (Fig. 9). Las alteraciones patológicas de la regulación del NF- $\kappa$ B están asociadas con enfermedades inflamatorias (asma, colitis ulcerosa), autoinmunes (artritis reumatoide) y neurodegenerativas, además de con el cáncer (Crozier, 2009).



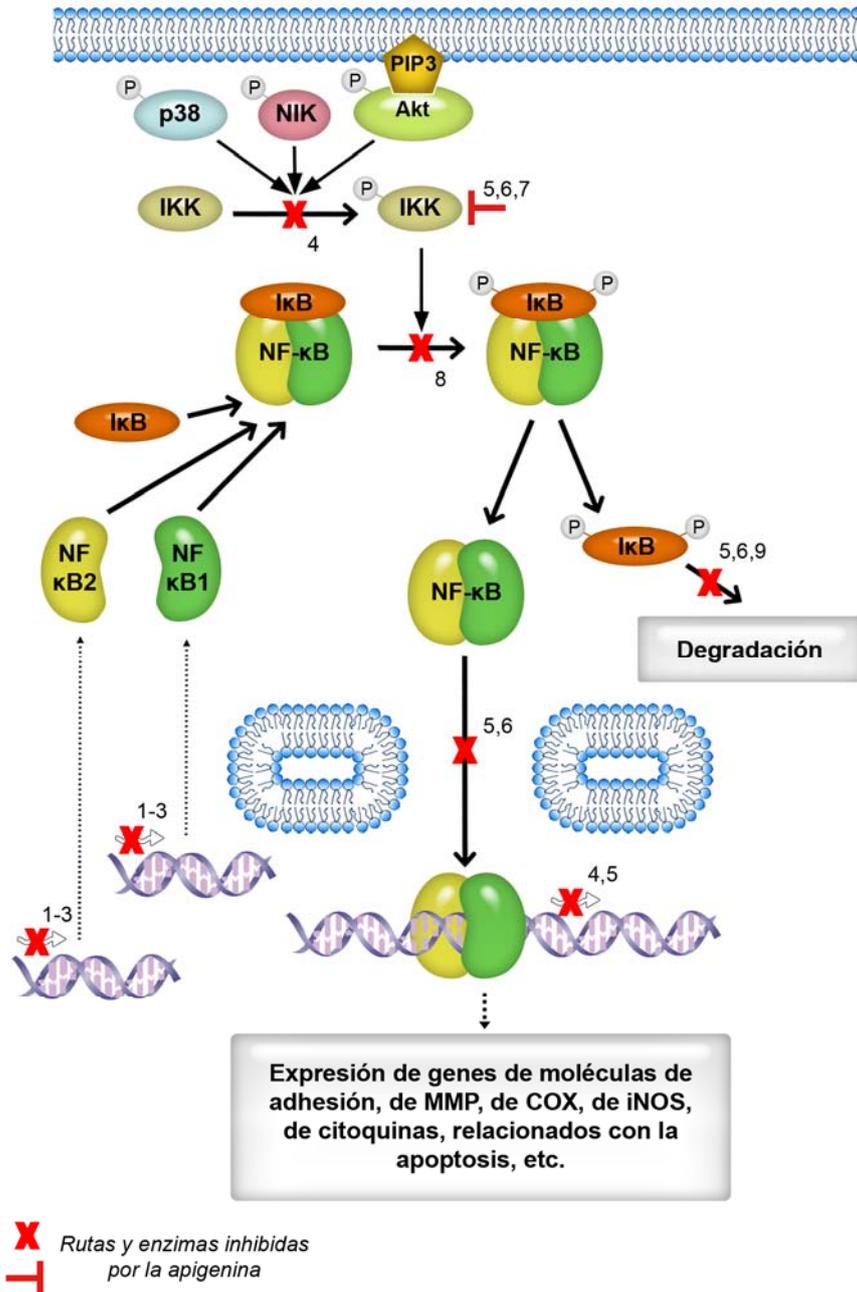
**X** Rutas inhibidas por la apigenina

**Figura 8.** Efecto de la apigenina sobre la regulación genética a través de STAT. *ICAM-1*: molécula de adhesión intercelular 1; *iNOS*: óxido nítrico sintasa inducible; *JAK*: quinasas Janus; *STAT*: proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción (Rezai-Zadeh, 2008; Ansó, 2010).

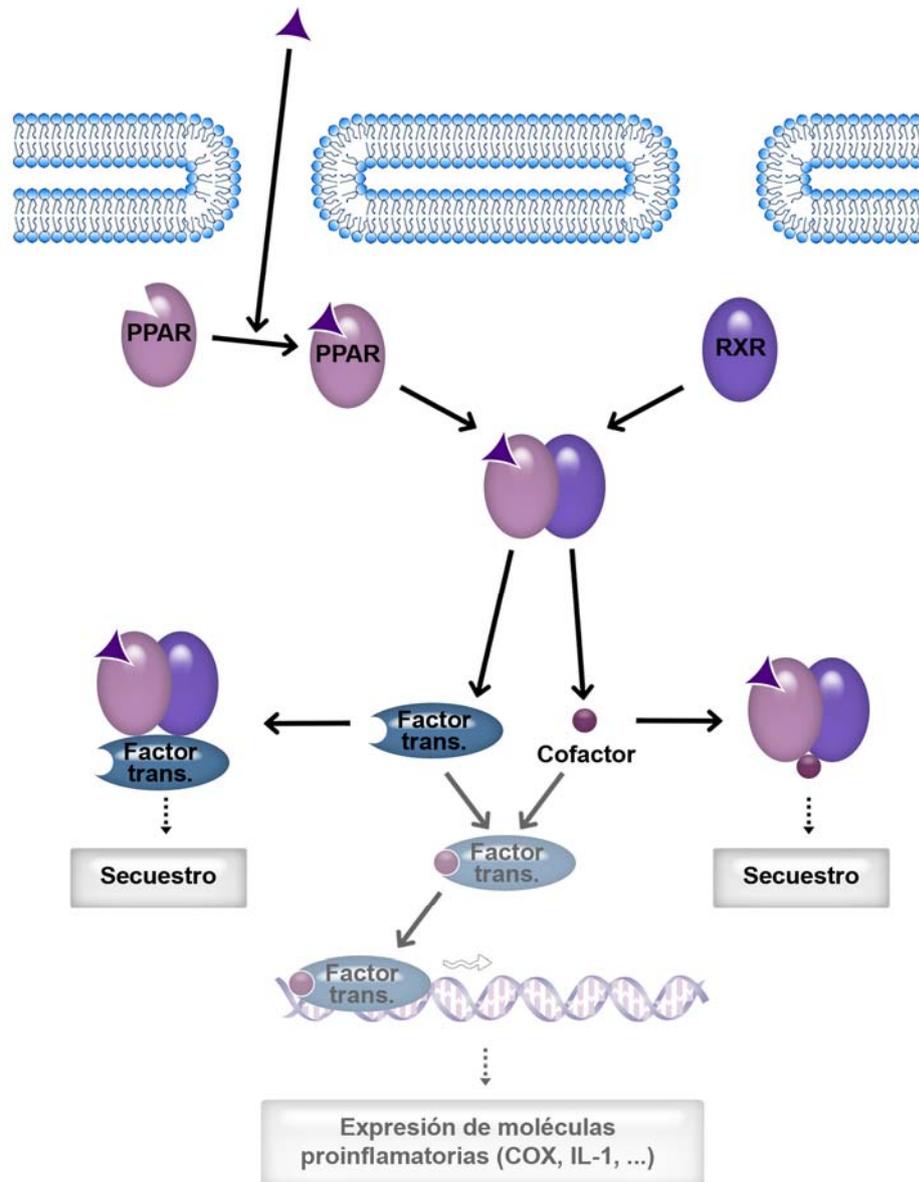
Numerosos flavonoides (EGCG, quercetina, genisteína, apigenina, luteolina, diosmetina, antocianidinas) inhiben distintos pasos en esta ruta de regulación (Kim, 2004a; Rithidech, 2005a; Yoon, 2005; Comalada, 2006; Pergola, 2006; Meeran, 2008b; Nandakumar, 2008; Crozier, 2009).

**Receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR).**

Son receptores hormonales nucleares activados por ligandos endógenos y exógenos, implicados en la modulación de la expresión de COX-2 y citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ). Existen tres isoformas: PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta/\beta$  y PPAR $\gamma$  (O'Leary, 2004; Yoon, 2005; von Knethen, 2007) (Fig. 10). Algunos AINE, como el ibuprofeno, así como varios flavonoides, entre ellos la apigenina o la crisina, son agonistas de PPAR $\gamma$  (O'Leary, 2004; Yano, 2006).



**Figura 9.** Regulación de la vía de NF-κB por flavonoides. COX: ciclooxigenasa; IKK: quinasa de IκB; IκB: proteína inhibidora de NF-κB; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; MMP: metaloproteasa de matriz; NIK: quinasa inductora de NF-κB; NF-κB: factor nuclear kappa B (1: (Gupta, 2002); 2: (Shukla, 2004b); 3: (Shukla, 2004a); 4: (Ruiz, 2006); 5: (Liang, 1999); 6: (Chen, 2004); 7: (Nicholas, 2007); 8: (Comalada, 2006); 9: (Chen, 2007b)).



**Figura 10.** Regulación de la transcripción de genes proinflamatorios a través de PPAR. Tras su activación mediante unión a un ligando (ibuprofeno, flavonoides), PPAR se une a RXR y secuestra cofactores de otros factores de transcripción o directamente los factores de transcripción (entre ellos, NF- $\kappa$ B y AP-1), impidiendo la transcripción de genes proinflamatorios. *Factor trans.*: factor de transcripción; *PPAR*: receptor activado por el proliferador de peroxisomas; *RXR*: receptor de retinoides X.

## V. FLAVONOIDES, APIGENINA E INFLAMACIÓN

La inflamación es un proceso patofisiológico caracterizado por el enrojecimiento, el edema, la fiebre, el dolor y la pérdida de función, mediante el cual las células y tejidos responden a daños traumáticos, infecciosos, tóxicos, alérgicos o autoinmunes. Los procesos inflamatorios son dirigidos por las células del sistema inmune a través de una compleja red de interacciones celulares y moleculares, compuesta por reacciones locales y la activación sistémica mediada por citoquinas y otras moléculas.

Ante un agente extraño, los macrófagos tisulares, los mastocitos y las células endoteliales responden liberando TNF e IL-1, que inducen la expresión en el endotelio de moléculas de adhesión (selectina E, molécula de adhesión vascular (VCAM) -1, ICAM-1) (Lotito, 2006b; Sawatzky, 2006). También secretan diversas quimioquinas (leucotrienos, IL-8, etc.) que activan vías de transducción de señales, entre ellas la vía de PKC (Kim, 2004a; Adcock, 2006), de PI3K / Akt, de STAT (Adcock, 2006; Chen, 2007b), de MAPK (Chen, 2004; Kim, 2004a; Adcock, 2006; Rahman, 2006) o de NF- $\kappa$ B (Yoon, 2005; Adcock, 2006; Rahman, 2006), provocando la activación funcional de los leucocitos sanguíneos. Los leucocitos activados abandonan los vasos y penetran en los tejidos donde liberan al medio enzimas lisosomales, ROS, productos del metabolismo del ácido araquidónico y otros mediadores de la inflamación.

Los radicales libres, tanto ROS como RNS, son un importante mecanismo de la respuesta inflamatoria, que participan, principalmente, en la eliminación de microorganismos. Los ROS se producen en el interior de los leucocitos, fundamentalmente de neutrófilos y macrófagos, como respuesta a la exposición a microorganismos o quimioquinas, o bien tras un estímulo fagocitario, y pueden ser liberados al medio extracelular. Son

generados por la activación de la NADPH oxidasa, responsable de la formación de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ); posteriormente, también se forman peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). Estos compuestos se pueden combinar con NO para formar RNS (Swindle, 2007; García-Lafuente, 2009). La liberación de radicales libres en pequeñas cantidades puede aumentar la expresión de distintas quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión, potenciando la reacción inflamatoria. Sin embargo, en grandes cantidades estas moléculas dañan el endotelio y otros tejidos (García-Lafuente, 2009).

El NO producido por las células endoteliales y los macrófagos es un potente vasodilatador, reduce la agregación plaquetaria y tiene acción microbicida (Olszanecki, 2002).

La activación de los leucocitos causa la puesta en marcha del metabolismo del ácido araquidónico, cuyos productos median, prácticamente, todos los pasos de la inflamación. Así, los tromboxanos y los leucotrienos están implicados en la agregación plaquetaria, la vasoconstricción y el aumento de la permeabilidad vascular, mientras que las prostaglandinas, además de participar en ambos procesos, potencian los efectos quimiotácticos de otros mediadores e intervienen en el dolor y la fiebre. Sin embargo, los productos del metabolismo no se limitan a influir únicamente sobre el endotelio: el ácido 5 hidroxieicosatetraenoico (5-HETE) y los leucotrienos son potentes quimiotácticos, y los productos de la 15-LOX contrarrestan la inflamación (Yoon, 2005; García-Lafuente, 2009).

Aunque los antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos son los fármacos usados actualmente para el tratamiento de la inflamación aguda, no resultan completamente efectivos para aliviar la crónica,

además de presentar efectos secundarios. Por ello, es necesario buscar fármacos antiinflamatorios más seguros.

Varios estudios han comprobado que las poblaciones con dietas ricas en polifenoles tienen una incidencia menor de enfermedades inflamatorias crónicas y alérgicas (Knekt, 2002; Kim, 2004a; Kim, 2004b; Rahman, 2006) e, incluso, se ha demostrado que las dietas ricas en vegetales o un consumo elevado en flavonoides se correlaciona con la reducción de distintos marcadores séricos de inflamación (Holt, 2009).

Los flavonoides y extractos de plantas que los contienen han demostrado tener efectos antiinflamatorios en varios modelos de inflamación aguda (García-Lafuente, 2009) y crónica (Kim, 2004a; Lim, 2006; García-Lafuente, 2009), y también resultan eficaces en diversos modelos animales de alergia e, incluso, en humanos, como en el tratamiento de la dermatitis atópica (Kawai, 2007). De hecho, 12 de los 40 fármacos antiinflamatorios aprobados entre 1983 y 1994 fueron productos derivados de polifenoles naturales (Yoon, 2005).

La actividad antiinflamatoria de los flavonoides se ha relacionado con sus efectos antioxidantes, debido a la importante síntesis de ROS durante los procesos inflamatorios; así, varios flavonoides han demostrado inhibir la síntesis de radicales libres en neutrófilos activados (Limasset, 1993; Jung, 2003). Sin embargo, los mecanismos de actuación de los flavonoides sobre la inflamación no se limitan a sus efectos antioxidantes, y son extremadamente complejos.

Varios estudios han demostrado que los flavonoides pueden actuar a través de la regulación de la actividad de células relacionadas con la inflamación, como linfocitos B y T, macrófagos, neutrófilos, basófilos o mastocitos (Middleton, 2000). Así, algunos (apigenina, luteolina y crisina)

disminuyen la actividad metabólica de las células mononucleares activadas de sangre periférica humana (Hougee, 2005) y hay flavonoles, flavonas e isoflavonas capaces de bloquear la respuesta proliferativa de macrófagos tratados con factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) (Comalada, 2006). La apigenina provoca la necrosis de macrófagos y monocitos en sangre periférica (Hougee, 2005), y reduce el número de células inflamatorias, en especial de eosinófilos, en modelos murinos de asma (Choi, 2009a; Li, 2010), alterando la respuesta inmune al perfil Th1 (Li, 2010), mientras que la narirutina disminuye el número de eosinófilos en sangre en un modelo de alergia en ratones (Funaguchi, 2007). La quercetina, la apigenina, la luteolina o el kaempferol inhiben la degranulación de los neutrófilos (Kanashiro, 2007; García-Lafuente, 2009). La rutina, por su parte, reduce la quimiotaxis de los neutrófilos en un modelo murino (Selloum, 2003).

Además, sus numerosos efectos sobre distintas enzimas y vías de transducción de señales son de gran importancia a la hora de estudiar la actividad antiinflamatoria de los flavonoides. Así, distintos flavonoides son capaces de inhibir una o varias de las reacciones principales del metabolismo del ácido araquidónico, implicado en prácticamente todas las etapas de la inflamación. La quercetina inhibe PLA<sub>2</sub> y LOX, mientras que la luteolina, la genisteína, el kaempferol, las antocianidinas, la morina o la crisina afectan a COX-2 (Kim, 2004a; O'Leary, 2004; Yoon, 2005; Meeran, 2008b; Nandakumar, 2008; García-Lafuente, 2009). La apigenina destaca como uno de los flavonoides antiinflamatorios más completos, al inhibir tanto PLA<sub>2</sub>, COX-2 y 5-LOX, como la expresión de iNOS (Liang, 1999; Olszanecki, 2002; Kim, 2004a; Van Dross, 2005; Comalada, 2006; Kim, 2006).

Por otro lado, muchos de estos compuestos, entre ellos la apigenina, inhiben gran parte de las principales vías de transducción de

señales relacionadas con la activación de las células inflamatorias (Liang, 1999; Bito, 2002; Tedeschi, 2002; Kim, 2004a; O'Leary, 2004; Rithidech, 2005a; Yoon, 2005; Comalada, 2006; Lotito, 2006b; Sawatzky, 2006; Yano, 2006; García-Lafuente, 2009; Huang, 2010).

Además, algunos polifenoles (curcumina, resveratrol) modulan la actividad de la histona deacetilasa (HDAC) y de la histona acetiltransferasa (HAT), enzimas que controlan la remodelación de las histonas; la activación de la HDAC y la inhibición de la HAT causa la disminución de la transcripción de genes proinflamatorios (Rahman, 2006).

Por otra parte, son numerosos los estudios que han demostrado que estos compuestos modulan la expresión de numerosos genes de citoquinas, moléculas de adhesión y otras proteínas proinflamatorias, como resumen las Tablas 2 y 3.

<b>Citoquinas</b>	IL-1 $\beta$	Apigenina [1-3], baicaleína [4], catequina [5], crisina [1], genisteína [4,6], luteolina [1], quercetina [5,6]
	IL-2	Apigenina [7], crisina [7]
	IL-4	Apigenina [7-10], crisina [7], fisetina [4,9], kaempferol [9], luteolina [9], narirutina [11], quercetina [9]
	IL-5	Apigenina [10], fisetina [4]
	IL-6	Apigenina [1,4,11,12,13], baicaleína, [4,9], crisina [1], genisteína [4,6], luteolina [1,6,9], quercetina [6,8]
	IL-8	Apigenina [3,4,12], EGCG [14]
	IL-10	Apigenina [15]
	IL-13	Apigenina [7,8], crisina [7], fisetina [4, 9], luteolina [9]
	IFN $\gamma$	Baicaleína [4]
	TNF- $\alpha$	Apigenina [1-3,13,15,16], baicaleína [4,9], catequina [5], crisina [1], diosmetina [15], eriodictiol [6], genisteína [4,6,15], hesperetina [6,15], kaempferol [15], luteolina [1,4,6,9], quercetina [4-6,9,15], rutina [4], wogonina [4]
<b>Ig</b>	IgE	Apigenina [7,8,10,17], narirutina [11]

**Tabla 2.** Flavonoides que inhiben distintas moléculas proinflamatorias. *EGCG*: epigallocatequina-3-galato; *IFN*: interferón; *IgE*: inmunoglobulina E; *IL*: interleuquina; *TNF*: factor de necrosis tumoral; (1: (Hougee, 2005); 2: (Kowalski, 2005); 3: (Nicholas, 2007); 4: (Kim, 2004a); 5: (Huang, 2006); 6: (García-Lafuente, 2009); 7: (Yano, 2007); 8: (Yano, 2006); 9: (Kawai, 2007); 10: (Choi, 2009a); 11: (Funaguchi, 2007); 12: (Gerritsen, 1995); 13: (Smolinski, 2003); 14: (Rahman, 2006); 15: (Comalada, 2006); 16: (Shanmugam, 2008); 17: (Li, 2010)).

<b>Moléculas de adhesión</b>	ICAM-1	Apigenina [1-4], crisina [3], diosmina [5], kaempferol [3], luteolina [6], quercetina [3,7], taxifolina [7]
	VCAM-1	Apigenina [1,3,4], crisina [3], diosmina [5], kaempferol [3], quercetina [3]
	PECAM-1	Catequina [8], quercetina [8]
	Selectina E	Apigenina [1,3,4], crisina [3], kaempferol [3], quercetina [3]
<b>Quimioquinas</b>	IP-10	Apigenina [9,10], catequina [8], genisteína [9], luteolina [9], quercetina [8]
	MCP-1	Apigenina [10], baicaleína [6], catequina [8] quercetina [8], wogonina [6]
	MIP-1	Baicaleína [6]
	MIP-2	Quercetina [6]
	RANTES	Apigenina [11], quercetina [6]
<b>Mediadores de inflamación</b>	Histamina	Baicaleína [12], luteolina [12], quercetina [12]

**Tabla 3.** Flavonoides que inhiben distintas moléculas proinflamatorias. *ICAM-1*: molécula de adhesión intercelular 1; *IP-10*: proteína inducible por IFN $\gamma$  10; *MCP-1*: proteína quimiotáctica de monocitos 1; *MIP*: proteína inflamatoria de macrófagos; *PECAM-1*: molécula de adhesión de plaquetas / células endoteliales 1; *VCAM-1*: molécula de adhesión vascular 1 (1: (Gerritsen, 1995); 2: (Chen, 2004); 3: (Lotito, 2006b); 4: (Lee, 2007); 5: (Smith, 2005); 6: (Kim, 2004a); 7: (Bito, 2002); 8: (Huang, 2006); 9: (Ruiz, 2006); 10: (Huang, 2010) 11: (Yano, 2006); 12: (Kawai, 2007)).

## VI. FLAVONOIDES, APIGENINA Y CÁNCER

El cáncer es la mayor carga sanitaria en EEUU y otros países desarrollados, causando aproximadamente 7 000 000 de muertes al año en todo el mundo; más de 11 000 000 de personas son diagnosticadas cada año de cáncer, calculándose que serán unos 16 000 000 en 2020. En 2009 en EEUU, se produjeron aproximadamente un millón y medio de nuevos casos de cáncer, sin contar los cánceres cutáneos (más de un millón de cánceres de piel no melanoma, y unos 53 000 casos de melanomas) ni los carcinomas *in situ*; en el mismo año, aproximadamente 562 000 estadounidenses murieron por cáncer, más de 1500 muertes diarias (Jemal, 2009). Se estima que, aproximadamente, uno de cada dos varones y una de cada tres mujeres estadounidenses sufrirán cáncer (Patel, 2007; Chen, 2008). Esta enfermedad supone un enorme gasto: se estima que el gasto en el cuidado de los enfermos de cáncer en EEUU en el año 2004 fue de 7210 millones de dólares (Yabroff, 2007).

Numerosos estudios epidemiológicos relacionan el consumo de frutas y verduras con una reducción del riesgo de padecer distintos tipos de cánceres en humanos, como el cáncer gástrico y de esófago (Sun, 2002), o el de próstata (Berkow, 2007; Gates, 2009; Wang, 2009). Ciertos estudios han demostrado que la ingesta total de flavonoides o de ciertos flavonoides o subgrupos concretos podría provocar la disminución del riesgo de padecer linfoma no Hodgkin o cáncer de pulmón, de mama, de ovario, de endometrio, gástrico o colorrectal (Berkow, 2007; Gates, 2009; Wang, 2009), o que, incluso, podrían reducir la tasa de recidiva del cáncer de colon en pacientes de alto riesgo (Hoensch, 2008).

El cáncer, entre otras patologías humanas, está relacionado con el daño oxidativo tisular (Chen, 2008). Este dato, junto a los estudios que indican ciertos efectos preventivos de los flavonoides ingeridos en la

dieta, ha provocado un auge en la investigación, tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales, de los efectos de estos compuestos vegetales a concentraciones terapéuticas o similares a las presentes en la dieta, sobre distintos tipos de cáncer.

Algunos flavonoides muestran la capacidad de inhibir la carcinogénesis (Shukla, 2004a; Rithidech, 2005a; Chen, 2007a). Estos compuestos pueden actuar sobre las distintas etapas de este proceso. Así, protegen al DNA del daño oxidativo, son capaces de inactivar carcinógenos, inhiben las enzimas responsables de convertir los procarcinógenos en moléculas activas, y activan los sistemas detoxificadores (Benavente-García, 2008).

Diversos estudios han demostrado que varios flavonoides, polifenoles y extractos de plantas ricos en estos compuestos, como son la apigenina, la rutina, la diosmina, los ácidos carnósico, rosmarínico, gálico o elágico, el carnosol, el hidroxitirosol o los extractos de té verde, de semilla de uva o de olivo, son capaces de proteger el DNA de distintas células del daño causado por radiaciones o compuestos genotóxicos, evitando, de esta forma, la formación de mutaciones que podrían fomentar el desarrollo de tumores (Castillo, 2001; Benavente-García, 2002; Rithidech, 2005a; Del Baño, 2006; Khan, 2006; Shukla, 2006; Patel, 2007; Siddique, 2008; Alcaraz, 2009; Sánchez-Campillo, 2009; Siddique, 2009). De hecho, van Hien *et al.* (2002), en un pequeño ensayo clínico con pacientes de cáncer de mama tratadas con radioterapia, demostraron que un extracto rico en el flavonoide vitexina (apigenina-8-C-glucósido) protegía la sangre periférica y los linfocitos frente al daño causado por la radiación, además de reducir los efectos secundarios del tratamiento, como la pérdida de peso.

Muchos flavonoides, como la diosmina, la quercetina, el kaempferol, la genisteína, la fisetina, las antocianidinas o la apigenina, regulan la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo de carcinógenos, como el sistema del citocromo P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1), o las enzimas detoxificadoras de fase II (UDP-glucuronil-transferasa, glutatión S-transferasa y quinona reductasa) (Scalbert, 2005; Khan, 2006; Moon, 2006; Patel, 2007; Shih, 2007; Stevenson, 2007; Ramos, 2008; Sergent, 2009; Kimura, 2010).

Por otro lado, distintos tipos de flavonoides, como la tangeretina, la nobiletina, la quercetina, la genisteína o la diosmina, han mostrado actividad antiproliferativa en líneas celulares de meningioma, de melanoma, de leucemia, de carcinoma de células escamosas y de cáncer de colon, de mama, de próstata o de pulmón, y, frecuentemente, las dosis activas se encontraban en el rango de las concentraciones presentes fisiológicamente en el organismo (Hillman, 2001; Rodríguez, 2002; Martínez, 2003; Yáñez, 2004; Mak, 2006; Benavente-García, 2008).

La apigenina, por su parte, ha demostrado inhibir la proliferación y viabilidad celular en un gran número de líneas celulares de cáncer: de mama, de próstata, de cuello de útero, de ovario, de pulmón, de tiroides, de estómago, de esófago, de colon, hepatocelular y neuroblastoma (Gupta, 2001; Lindenmeyer, 2001; Gupta, 2002; Shukla, 2004a; Shukla, 2004b; Mak, 2006; Shukla, 2006; Chen, 2007a; Patel, 2007; Czernik, 2008; Lee, 2008; Shukla, 2008; Li, 2009; Zhang, 2009).

En parte, los efectos de los flavonoides sobre la viabilidad celular se deben a su capacidad de inducir apoptosis. Las antocianidinas de la semilla de la uva, el EGCG, la genisteína, la silibilina, la luteolina, la quercetina o el kaempferol han demostrado inducir apoptosis en diversas líneas celulares tumorales (Hillman, 2001; Morrissey, 2005; Mak, 2006;

Chen, 2008; Meeran, 2008b; Nandakumar, 2008). La apigenina activa este proceso en distintas líneas celulares tumorales, entre ellas de cáncer de mama, de ovario, de cuello de útero, de próstata, de esófago, de estómago, de colon, de tiroides, y en células de leucemia y de neuroblastoma y de glioblastoma (Gupta, 2001; Gupta, 2002; Shukla, 2004a; Shukla, 2004b; Morrissey, 2005; Mak, 2006; Shukla, 2006; Chen, 2007a; Patel, 2007; Chen, 2008; Kaur, 2008; Choi, 2009b; Li, 2009; Zhang, 2009; Das, 2010).

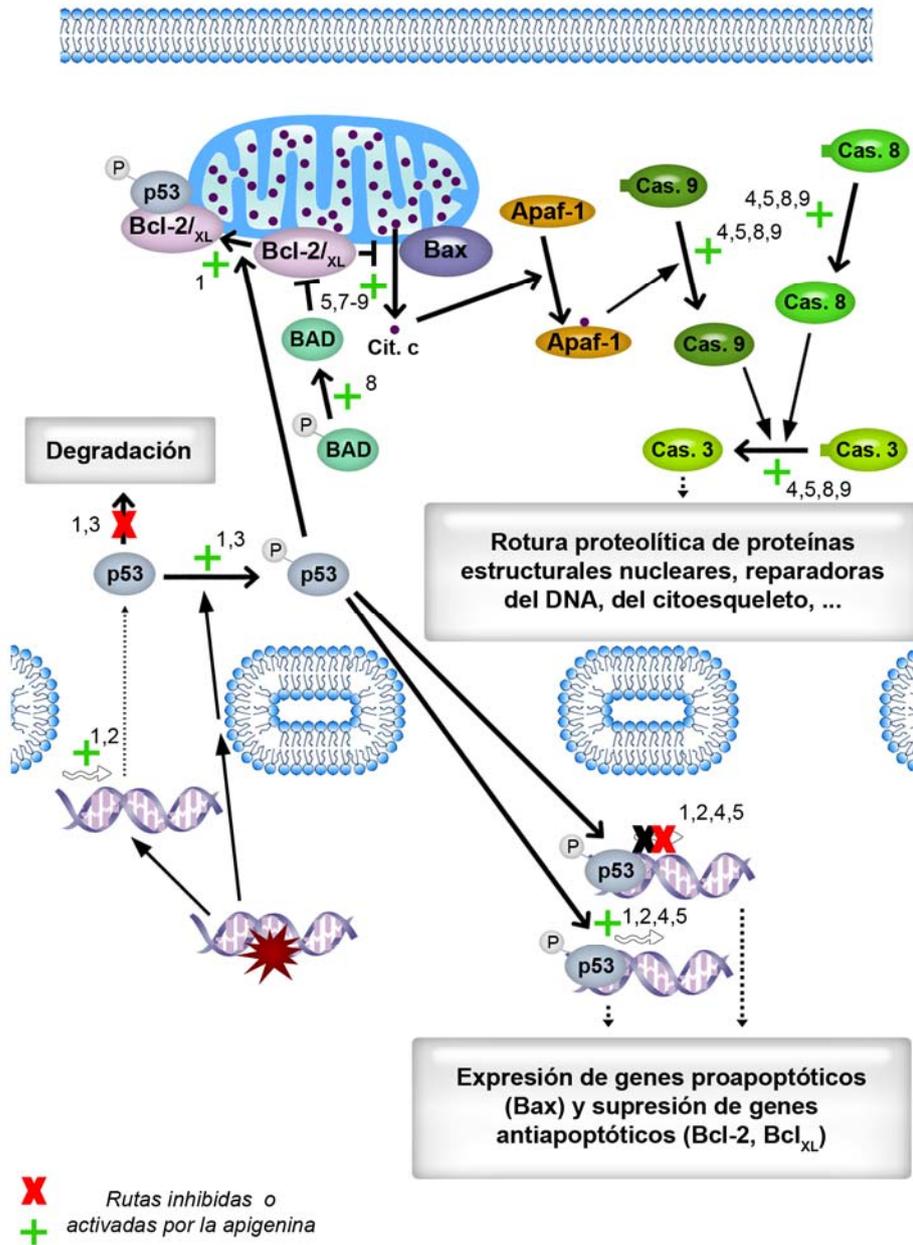
La actividad proapoptótica de los compuestos polifenólicos se debe a que alteran pasos de las vías clave de apoptosis. La proteína supresora de tumores p53 es la proteína que aparece alterada en el cáncer con mayor frecuencia; aproximadamente el 50% de los tumores tienen mutaciones en su gen que provocan la pérdida de su función, y la mayoría de cánceres tienen dañada la vía de señalización de p53. En los tumores, esta proteína provoca cambios en la transcripción de genes implicados en la regulación de la apoptosis (Bax, Bcl-2, DNA polimerasas, etc.), induciendo la muerte programada de la célula. Además, media otra ruta de apoptosis independiente de la regulación transcripcional, traslocándose a la mitocondria y causando la salida de citocromo c al citoplasma (Shukla, 2008). La apigenina es capaz de activar la vía de p53 (Choi, 2009b) y aumenta la expresión de p53 y su estabilidad, así como su entrada a la mitocondria (Fig. 11) (McVean, 2000; Gupta, 2002; Torkin, 2005; Shukla, 2008).

La apigenina modula la expresión de las proteínas reguladoras de la apoptosis Bax, Bcl-2 y Bcl<sub>XL</sub>, aumentando la de Bax (proapoptótica) y reduciendo la de Bcl-2 y Bcl<sub>XL</sub> (antiapoptóticas; Bcl-2 se sobreexpresa tanto en tumores sólidos como hematopoyéticos) (Fig. 11) (Gupta, 2002; Garg, 2005; Morrissey, 2005; Torkin, 2005; Shukla, 2006; Patel, 2007; Shukla, 2008; Das, 2010). Además, la apigenina inhibe la actividad similar

a quimotripsina del proteasoma (Chen, 2007a; Chen, 2008; Wu, 2010), lo que impide la degradación y, por tanto, provoca la acumulación de distintas proteínas, entre ellas Bax, promoviendo así también la apoptosis (Chen, 2007a; Patel, 2007). También es capaz de alterar esta ruta mediante la promoción de la defosforilación del promotor de muerte asociado con Bcl-2/Bcl<sub>XL</sub> (BAD), una proteína que, en su estado defosforilado, activa a Bax para inducir apoptosis (Fig. 11) (Kaur, 2008).

La apigenina, además, modula un paso posterior en esta vía de señalización. Las proteínas Bax y Bcl-2 regulan la salida de citocromo c de la mitocondria, que funciona como un activador de la cascada de las caspasas. Además, la salida de citocromo c desde la mitocondria está regulada por p53, a través de su unión a Bcl-2 y Bcl<sub>XL</sub>. Por tanto, el aumento de la relación Bax/Bcl-2 o de la síntesis y estabilidad de p53 aumentaría el flujo de citocromo c al citoplasma, donde se une al factor activador de proteasas de la apoptosis (Apaf) -1 que, a su vez, activa la caspasa 9, induciendo apoptosis (Shukla, 2004a). Se ha demostrado que la apigenina induce directamente la producción de esta molécula en la mitocondria (Choi, 2009b), y su liberación al citoplasma (Shukla, 2004b; Way, 2004; Morrissey, 2005; Way, 2005; Patel, 2007; Das, 2010), causando muerte celular programada (Fig. 11).

Este flavonoide regula la apoptosis, no solo a través de sus efectos sobre Bax/Bcl-2, sino también sobre otras moléculas. Así, son numerosos los estudios que demuestran que la apigenina activa la cascada de las caspasas, fundamentalmente, las caspasas 3, 7, 8 y 9 (Fig. 11) (Way, 2004; Morrissey, 2005; Torkin, 2005; Way, 2005; Mak, 2006; Shukla, 2006; Patel, 2007; Choi, 2009b; Das, 2010), una familia de proteasas responsables de la degradación de proteínas claves para el funcionamiento de la célula (proteínas del citoesqueleto, reparadoras de los daños del DNA, proteínas nucleares, etc.).



**Figura 11.** Efecto de la apigenina sobre la apoptosis. Los daños en el DNA causados por genotóxicos, radiaciones, etc., provocan la activación de la proteína supresora p53, que regula la transcripción de genes relacionados con el control de la apoptosis y la liberación de citocromo c mitocondrial. *Apaf-1*: factor activador de proteasas de la apoptosis 1; *BAD*: promotor de muerte asociado con Bcl-2/Bcl<sub>xL</sub>; *Cas*: caspasa. (1: (Gupta, 2002); 2: (Shukla, 2008); 3: (McVean, 2000); 4: (Shukla, 2006); 5: (Patel, 2007); 6: (Kaur, 2008); 7: (Shukla, 2004a); 8: (Choi, 2009c); 9: (Morrissey, 2005)).

Además, la apigenina inhibe la DNA topoisomerasa II, enzima implicada en la replicación del DNA, induciendo, también, apoptosis (Shukla, 2006; López-Lázaro, 2010). Otros flavonoides también inhiben esta enzima: la fisetina y la miricetina inhiben las DNA topoisomerasas I y II, mientras que la quercetina actúa únicamente sobre la II (López-Lázaro, 2010).

Por otro lado, es bien conocido el papel de muchos flavonoides como reguladores del ciclo celular en células tumorales. Así, compuestos como las antocianidinas, el EGCG, la genisteína, la silibilina o la silimarina son capaces de provocar la parada del ciclo celular en diversos puntos de control en numerosas líneas celulares (Hillman, 2001; Garg, 2005; Chen, 2008; Meeran, 2008a; Meeran, 2008b; Nandakumar, 2008). Algunos de estos compuestos, como el EGCG o la genisteína, son potentes bloqueadores de este proceso, incluso a concentraciones presentes en el plasma de consumidores de productos ricos en esos polifenoles, como el té verde o derivados de la soja, respectivamente (Hillman, 2001; Chen, 2008).

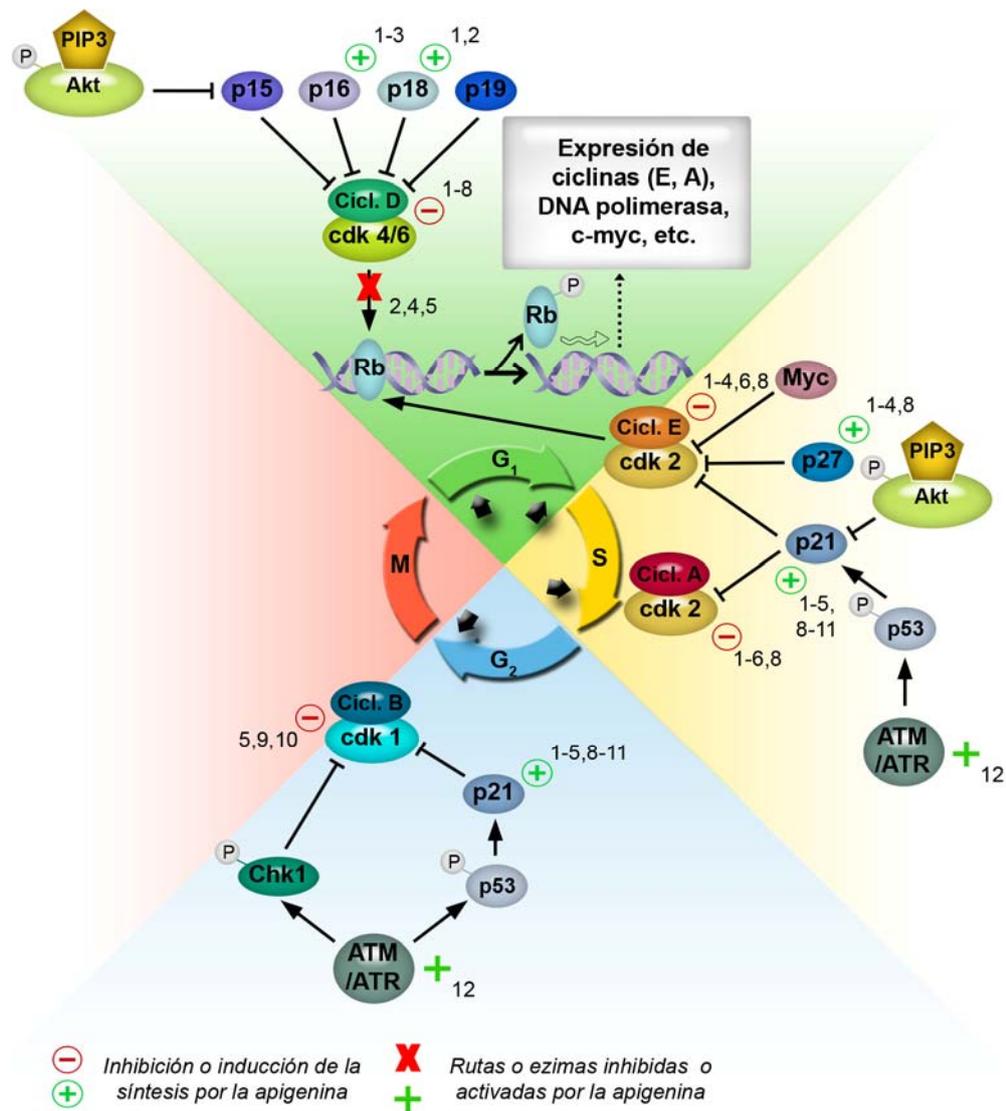
La apigenina ha demostrado regular el ciclo celular en distintas líneas celulares, entre ellas en células de cáncer de próstata y de cuello de útero, en las que provoca parada en las fases  $G_0$ - $G_1$  (Gupta, 2002; Shukla, 2004a; Shukla, 2006; Patel, 2007), y de carcinoma escamoso de esófago, de mama y de ovario, causando el bloqueo en las fases  $G_2$ /M (Choi, 2009c; Li, 2009; Zhang, 2009).

El ciclo celular es un proceso altamente regulado, con, al menos, un punto de control en cada una de las fases del ciclo: en  $G_1$  y en las transiciones  $G_1$ /S,  $G_2$ /M y, dentro de la fase M, en metafase/anafase. Estos puntos de control, además de bloquear la progresión del ciclo en respuesta a algún daño, inducen genes responsables de repararlo. La

primera fase de regulación del ciclo celular depende de las ciclinas, proteínas cuya expresión fluctúa a lo largo del ciclo, y que están mal reguladas en la mayoría de cánceres humanos. De la unión a estas moléculas depende la activación de unas quinasas específicas, llamadas cdk. Además, existen dos familias de inhibidores de las cdk (cdki): la familia Cip/WAF y la familia inhibidor de quinasa (INK) 4 (Meeran, 2008a).

La apigenina regula el ciclo celular a todos los niveles; actúa sobre las ciclinas, sobre las cdk y sobre los cdki (Fig. 12). Se ha demostrado que este flavonoide disminuye los niveles de varias ciclinas: A (activa en las fases S y G<sub>2</sub>), D1 y 2 (implicadas en la transición G<sub>1</sub>/S), E (activa durante las fases G<sub>1</sub> y S) y B1 (control del paso de G<sub>2</sub> a M) (Gupta, 2002; Shukla, 2004a; Shukla, 2006; Shukla, 2007a; Shukla, 2007b; Meeran, 2008a; Zhang, 2009). También es capaz de afectar a las cdk 1, 2, 4 y 6 (Gupta, 2002; Shukla, 2004a; Choi, 2009c) y de regular positivamente a los inhibidores de cdk, entre ellos p21 / WAF1 y p27 / KIP1, p16 / INK4a e p18 / INK4c (Gupta, 2002; Kobayashi, 2002; Shukla, 2004a; Shukla, 2006; Patel, 2007; Choi, 2009c; Zhang, 2009).

A los efectos de la apigenina sobre estas moléculas se suma, además, su capacidad de estabilizar la proteína supresora tumoral p53, responsable de la activación de p21 / WAF1 (McVean, 2000; Gupta, 2002; Shukla, 2006), y de inducir la defosforilación de Rb, evitando, así, la expresión de las ciclinas A y E, entre otras proteínas relacionadas con la progresión del ciclo celular (Fig. 12) (Gupta, 2002; Shukla, 2006).



**Figura 12.** Efecto de la apigenina sobre la regulación del ciclo celular. Las flechas negras indican puntos de control del ciclo celular. *Akt*: Akt-proteín quinasa B; *ATM / ATR*: quinasa mutada en ataxia telangiectasia / proteína relacionada con ataxia telangiectasia y Rad3; *cdk*: quinasa dependiente de ciclina; *Chk1*: quinasa de control 1; *Cicl.*: ciclina; *PIP3*: fosfatidil inositol (3,4,5) trifosfato; *Rb*: retinoblastoma. (1: (Shukla, 2004a); 2: (Shukla, 2006); 3: (Chen, 2008); 4: (Gupta, 2002); 5: (Patel, 2007); 6: (Shukla, 2007a); 7: (Shukla, 2007b); 8: (Meeran, 2008a); 9: (Choi, 2009c); 10: (Zhang, 2009); 11: (Kobayashi, 2002); 12: (O'Prey, 2003)).

Distintos estudios *in vitro* ha demostrado, además, que los flavonoides pueden alterar todas las fases del proceso de invasión, angiogénesis y metástasis. Así, los flavonoides presentes en cítricos modulan la secreción de MMP, la migración y la capacidad invasiva de células tumorales y su adhesión a distintos sustratos (Benavente-García, 2008). Estos flavonoides, y otros como la genisteína, regulan negativamente la angiogénesis (Hillman, 2001; Garg, 2005; Benavente-García, 2008).

Diversos autores han estudiado los efectos de la apigenina sobre la motilidad, invasión, angiogénesis y metástasis de células tumorales. Así, este compuesto provoca la inhibición de la migración de células de carcinoma de ovario, de mama, de próstata y de cuello de útero (Lindenmeyer, 2001; Patel, 2007; Czernik, 2008; Hu, 2008; Lee, 2008), además de inhibir los cambios del citoesqueleto relacionados con la movilidad celular (Lee, 2008). Además, este flavonoide es capaz de regular la adhesión de las células tumorales al sustrato (Lindenmeyer, 2001; Lee, 2008; Franzen, 2009) o, incluso, de inhibir la adhesión a las células endoteliales (Lee, 2008). Parece que la acción de la apigenina sobre la movilidad y adhesión celular está mediada por una disminución de los niveles de la quinasa de adhesión focal (FAK), una tirosín quinasa de las vías de señalización de las integrinas y otros factores de adhesión, implicada en la adhesión celular y la migración (Hu, 2008; Franzen, 2009). Al mismo tiempo, la apigenina modula la secreción de MMP, proteasas responsables de degradar la matriz extracelular, permitiendo la invasión de tejidos (Rundhaug, 2005), y de los inhibidores tisulares de MMP (TIMP) -1 y -2 y del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), que participan en la regulación de estas enzimas (Lindenmeyer, 2001; Kim, 2003; Benavente-García, 2008).

La apigenina también ha demostrado regular la angiogénesis en distintas líneas celulares (Kim, 2003; Liu, 2005; Shukla, 2006; Benavente-García, 2008; Mirzoeva, 2008). Así, Trochon *et al.* (2000) demostraron que la apigenina es capaz de inhibir la proliferación y migración de células endoteliales y la formación *in vitro* de capilares, debido a que causa en ellas la acumulación de p53 hiperfosforilada y la parada del ciclo celular. Por otro lado, también suprime la expresión de numerosos factores angiogénicos, entre ellos el factor inducible por hipoxia (HIF) -1 $\alpha$ , VEGF o la eritropoyetina (Liu, 2005; Shukla, 2006; Benavente-García, 2008; Mirzoeva, 2008), así como regula la actividad y expresión de MMP y sus activadores e inhibidores (Kim, 2003).

Aunque muchos estudios sobre los efectos anticarcinogénicos de los flavonoides se realizan *in vitro*, existen también numerosos estudios que emplean modelos animales en las distintas etapas de la carcinogénesis. Muchos estudios han evidenciado que los polifenoles o extractos vegetales ricos en ellos son capaces de inhibir la carcinogénesis. Así, la apigenina (Birt, 1997; Lepley, 1997) o el ácido rosmarínico (Osakabe, 2004; Sánchez-Campillo, 2009) actúan como agentes quimiopreventivos en modelos de carcinogénesis cutánea. La genisteína inhibe el crecimiento de tumores de piel, mama y próstata en ratones (Chen, 2008), y la diosmina y la hesperetina previenen el desarrollo de tumores orales y de colon, esófago y vejiga (Tanaka, 1997a; Tanaka, 1997b; Tanaka, 1997c; Yang, 1997; Tanaka, 2001; Browning, 2005) En un modelo de carcinogénesis oral en hámsters realizado recientemente en nuestro grupo la apigenina y, en especial, el diterpeno ácido carnósico, redujeron enormemente la incidencia, tamaño y agresividad de los tumores desarrollados, al mismo tiempo que provocaron un aumento del periodo de latencia en la presentación de los cánceres (Gómez García, 2009).

La apigenina ha mostrado efectos quimiopreventivos en varios modelos murinos de cáncer (de pulmón, de piel, de cuello de útero, de ovario, de próstata, leucemia...) (Shukla, 2006; Chen, 2007a; Li, 2009), reduciendo el tamaño de los tumores primarios. Igual que en los estudios sobre líneas celulares, se ha demostrado que, en estos modelos, es capaz de inducir apoptosis por la inhibición del proteasoma (Chen, 2007a; Chen, 2008), la regulación del equilibrio entre Bcl-2 y Bax (Chen, 2007a), y la activación de BAD y de la cascada de las caspasas (Kaur, 2008).

No obstante, probablemente la mayor importancia de estos modelos murinos radique en la posibilidad de estudiar el proceso de metástasis de forma más completa. Nuestro grupo ha demostrado la actividad antimetastásica de la diosmina, la rutina, la tangeretina, la apigenina y de extractos de semilla de uva solubles e insolubles en un modelo de metástasis pulmonar de melanoma. En este estudio, la diosmina, el flavonoide más eficaz de todos los ensayados, provocó la reducción del 61,4% en el número de nódulos metastáticos, mientras que la apigenina disminuyó este parámetro en un 32% respecto a los controles (Martínez Conesa, 2004; Martínez, 2005; Martínez Conesa, 2005; Álvarez Sánchez, 2008; Álvarez, 2009).

En sistemas *in vivo*, la apigenina es capaz de inhibir la movilidad de las células tumorales (inhibición de la expresión de FAK) (Hu, 2008), y de disminuir la angiogénesis (Shukla, 2008). Así, provoca una reducción en el número y tamaño de los nódulos metastáticos de carcinoma de ovario, de cáncer de mama y de melanoma (Benavente-García, 2008; Hu, 2008; Lee, 2008).

Las dianas moleculares de la apigenina en el desarrollo y progresión del cáncer incluyen distintas quinasas, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), cuya sobreexpresión se asocia

con fenotipos tumorales más agresivos y peor pronóstico (Garg, 2005); PI3K y Akt, cuya vía está mal regulada en el 30-40% de los tumores sólidos, o las MAPK (Shukla, 2006; Assinder, 2009; Li, 2009), aunque también las proteínas de choque térmico, HER2/neu, etc. (Way, 2004; Way, 2005; Patel, 2007).

Asimismo, su efecto sobre factores de transcripción, como NF-κB (Liang, 1999; Gupta, 2002; Chen, 2004; Shukla, 2004a; Shukla, 2004b; Comalada, 2006; Ruiz, 2006; Chen, 2007b; Nicholas, 2007) y STAT (Rezai-Zadeh, 2008), y sobre enzimas como COX-2 (Shukla, 2004b; Van Dross, 2005; Van Dross, 2007; Ha, 2008) y LOX (Van Dross, 2005; Kim, 2006; Patel, 2007), se encuentra, también, en la base de sus efectos antitumorales. Se ha demostrado que la activación constitutiva aberrante de NF-κB se produce en numerosos tumores, como la leucemia, el linfoma, el melanoma o los cánceres de próstata, de mama, de colon... Por otra parte, una proteína de la familia STAT, STAT-3, se encuentra activada de forma constitutiva en diversos tumores humanos (Garg, 2005).

COX-2, por su parte, está relacionada con fenotipos tumorales más agresivos y peor pronóstico, y parece implicada en el mantenimiento del crecimiento tumoral y la angiogénesis (Liu, 2000; Masferrer, 2000; Garg, 2005), mientras que la sobreexpresión de 12-LOX en células tumorales aumenta los niveles del factor proangiogénico VEGF (Nie, 2006).

Además de los efectos directos (antiproliferativos, proapoptóticos, reguladores del ciclo celular, antimetastásicos) de los flavonoides y los compuestos polifenólicos sobre el cáncer, estos compuestos son capaces de aumentar la eficacia de los tratamientos que se usan habitualmente en la clínica, al menos en estudios *in vitro* e *in vivo*. Los polifenoles del té verde son quimiosensibilizantes (doxorubicina, cisplatino, etc), la

genisteína, el resveratrol y la curcumina sensibilizan frente a la quimio- (cisplatino, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, etc.) y la radioterapia; mientras que la silimarina puede proteger tejidos sanos y sensibilizar a la quimioterapia a los tejidos tumorales (Garg, 2005). Asimismo, nuestro grupo demostró los efectos sinérgicos de la diosmina con el IFN- $\alpha$  en un modelo murino de metástasis pulmonar de melanoma; en este estudio, la combinación de diosmina e IFN- $\alpha$  produjo los mismos resultados que la administración de la citoquina aislada al doble de dosis (Álvarez Sánchez, 2008; Álvarez, 2009).

## **1. CÁNCER DE PRÓSTATA**

El cáncer de próstata representa un gran problema de salud pública, sobre todo en los países más industrializados, donde la incidencia es, de media, unas 6 veces mayor que en los países menos desarrollados (Baade, 2009). Es el segundo cáncer no cutáneo más diagnosticado en varones en el mundo (el primero en países desarrollados (25%)) y la segunda causa de muerte por cáncer en hombres (9%) (Berkow, 2007; Assinder, 2009; Jemal, 2009). En EEUU se produjeron más de 192 000 nuevos casos, de los cuales un 91% fueron en estadios locales o regionales, con una supervivencia a los cinco años próxima al 100%; y, al menos, 27 000 muertes en 2009 (Jemal, 2009). El estudio de Baade *et al.* (2009), que recoge datos de 2002, indica que la incidencia en España y a nivel mundial de este tumor fue de, aproximadamente, 13 300 y 679 000, respectivamente, mientras que la mortalidad fue mayor de 5500 en España y de 220 000 al considerar los datos mundiales.

La incidencia del cáncer de próstata aumenta con la edad, desde 0,2 casos por cada 100 000 habitantes para varones de 15 a 44 años, hasta 259,6 para mayores de 65 (Baade, 2009).

Al contrario que otras neoplasias, la incidencia del cáncer de próstata continua aumentando, aunque de forma más lenta (Jemal, 2008; Baade, 2009). Afortunadamente, la mortalidad causada por este tumor está descendiendo, al menos en los países desarrollados (Baade, 2009).

Los tratamientos más utilizados en el cáncer de próstata son la prostatectomía radical para los tumores confinados, y la castración quirúrgica o química para los metastáticos. No obstante, presentan numerosos problemas, como son la aparición de disfunción eréctil o la pérdida de orina en un alto número de pacientes operados de prostatectomía, y el desarrollo de insensibilidad a andrógenos en el caso de la castración (Assinder, 2009).

Debido a su largo periodo de latencia y a su alta incidencia, el cáncer de próstata es una buena diana para la quimioprevención, es decir, para el uso de compuestos de la dieta o sintéticos capaces de bloquear la formación de tumores o de retrasar su desarrollo (Gupta, 2001; Patel, 2007).

En esta enfermedad, la apigenina ha demostrado inhibir el crecimiento de líneas de cáncer de próstata (Shukla, 2004b; Mak, 2006; Shukla, 2006; Czernik, 2008; Shukla, 2008), incluso en mayor medida que el de tejidos normales (Gupta, 2001), y, además, induce apoptosis mediante algunos de los mecanismos ya descritos (Gupta, 2001; Gupta, 2002; Shenouda, 2004; Shukla, 2004a; Shukla, 2004b; Morrissey, 2005; Mak, 2006; Shukla, 2006; Kaur, 2008; Shukla, 2008). También provoca la parada del ciclo celular en las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, tanto *in vitro* (Gupta, 2001;

Gupta, 2002; Kobayashi, 2002; Shukla, 2004a; Shukla, 2005; Shukla, 2006; Shukla, 2007a; Shukla, 2007b), como en animales en los que se ha inducido el desarrollo de tumores de algunas de esas líneas celulares (Shukla, 2006) o en transgénicos que desarrollan espontáneamente cáncer de próstata (ratones con adenocarcinoma de próstata transgénico (TRAMP)) (Shukla, 2007b). Asimismo, la apigenina inhibe la migración de las células de próstata (Czernik, 2008; Franzen, 2009) y la producción *in vitro* de HIF-1 $\alpha$  y VEGF, dos factores proangiogénicos muy importantes (Mirzoeva, 2008).

En modelos *in vivo*, la apigenina provoca la disminución del tamaño y peso de los tumores y el aumento de la supervivencia, en parte por secuestro del factor de crecimiento similar a insulina (IGF) (Shukla, 2005; Shukla, 2006; Shukla, 2007b; Shukla, 2009).

Una de las principales vías de señalización de proliferación del cáncer de próstata depende del receptor de andrógenos (AR). Este receptor, que actúa como factor de transcripción, está implicado no solo en la regulación de la proliferación celular, sino también en la invasión y metástasis (Tomlins, 2006; Hara, 2008; Crawford, 2009). Aunque durante el desarrollo de la enfermedad el cáncer de próstata se vuelve refractario al tratamiento con andrógenos, el AR sigue teniendo un importante papel, a través de diversos mecanismos como el aumento de los niveles o de la sensibilidad del receptor, o mutaciones que provocan la activación constitutiva o la posibilidad de que sea activado por otras moléculas (Tomlins, 2006; Crawford, 2009). La expresión, estabilidad y actividad del AR son reguladas por proteínas del ciclo celular y quinasas de vías afectadas por factores de crecimiento (MAPK, PKB/Akt, PTEN, NF- $\kappa$ B) (Reddy, 2006; Balk, 2008; Assinder, 2009). Se ha demostrado que la apigenina provoca la inhibición de la expresión del AR (Gupta, 2002; Lin, 2007a), causando, así, una disminución en los niveles intracelulares y

secretados del antígeno prostático específico (PSA) (Gupta, 2002). Esta serín proteasa es el principal marcador sérico de la progresión del cáncer de próstata, y parece implicada en la activación de factores de crecimiento (Gupta, 2002).

La pérdida de expresión del gen de la glutatión-S-transferasa por hipermetilación es también habitual en los cánceres de próstata, produciéndose en más del 90% de los casos; la frecuencia del bloqueo de la síntesis de esta enzima crece desde las lesiones benignas de próstata hasta el cáncer. Probablemente, este hecho aumenta la sensibilidad del tejido al daño causado por radicales libres (Tomlins, 2006; Sciarra, 2007)

Por otro lado, se ha detectado un aumento de la expresión de iNOS en tejido de próstata con hiperplasia benigna en humanos, incremento que es todavía mayor en los carcinomas. El NO, además de ser una fuente de RNS, induce la expresión de COX-2 (Sciarra, 2007).

Esta enzima, COX-2, se encuentra sobreexpresada en el tejido epitelial prostático tanto en lesiones premalignas (hiperplasia benigna de próstata (BPH)) como malignas (neoplasia intraepitelial de alto grado (PIN); carcinoma de próstata), además de en otros tumores humanos (Kirschenbaum, 2000; Ghosh, 2007). El aumento de la expresión de COX-2 y el consiguiente incremento en la síntesis de prostaglandina (PG) E<sub>2</sub> inhiben la apoptosis y estimulan la angiogénesis (aumento de los niveles de VEGF), la metástasis y la inmunosupresión, además de regular vías de señalización como la de Akt (Liu, 2000; Ghosh, 2007; Harris, 2007a; Assinder, 2009). Se ha observado una menor incidencia de cáncer de próstata (reducción del 39-55%) entre varones que utilizan regularmente AINE (Ghosh, 2007; Harris, 2007a; Harris, 2007b), y el uso de inhibidores específicos de COX-2 inhibe el crecimiento, aumenta la apoptosis y disminuye la producción de VEGF en células tumorales de próstata (Liu,

2000; Harris, 2007b; Sciarra, 2007; Haverkamp, 2008). Algunos autores proponen que, en parte, los efectos antitumorales de la apigenina sobre el cáncer de próstata se deben a que regula estas dos enzimas, iNOS y COX-2 (Shukla, 2004b).

Uno de los principales reguladores de la expresión de las mencionadas enzimas es el factor NF- $\kappa$ B. Este factor de transcripción es un potente inhibidor de la apoptosis, y se encuentra sobreexpresado en numerosas neoplasias humanas, incluyendo el cáncer de próstata (Shukla, 2004b; Shukla, 2006). Shukla *et al.* (2004b) han demostrado la inhibición de NF- $\kappa$ B en células de cáncer de próstata tratadas con apigenina.

Por otro lado, la pérdida de función de PTEN es un evento prevalente en el cáncer de próstata (en más del 50% de los casos), tanto por pérdida de la región cromosómica, como por mutaciones puntuales o regulación epigenética, y causa la regulación positiva de la quinasa Akt (Corcoran, 2006; Tomlins, 2006; Assinder, 2009). Esto provoca la desregulación del ciclo celular y de la apoptosis en células de cáncer de próstata. Dentro de esta vía de señalización intracelular, se ha comprobado que un aumento en los niveles de Akt se correlaciona con un peor pronóstico en cáncer de próstata (Assinder, 2009). Kaur *et al.* (2008) han demostrado que la apigenina inhibe la activación de Akt en células tumorales de próstata.

Además, en muestras de cáncer de próstata se han detectado niveles aumentados de algunos receptores con actividad tirosín quinasa, como EGF-R (Corcoran, 2006), cuya actividad es inhibida por la apigenina (Shukla, 2006).

También algunas citoquinas actúan como factores de crecimiento del cáncer de próstata, o regulan la progresión del tumor. Así, la IL-1 promueve el crecimiento y la progresión de varios tumores sólidos, induciendo la metástasis en modelos de cáncer de próstata, además de acelerar la degradación de la proteína NKX3.1, que actúa como supresor tumoral en el tejido prostático (Haverkamp, 2008; Markowski, 2008). Los niveles elevados de IL-6, citoquina que regula genes del ciclo celular y la apoptosis, empeoran el pronóstico de esta patología; se detectan niveles elevados en pacientes con metástasis (Lin, 2007b; Haverkamp, 2008). La sobreexpresión de IL-17 ha sido relacionada con el crecimiento y la formación de tumores en modelos experimentales, debido, probablemente, a su actividad proangiogénica; su expresión llega a aumentar en un 58% en tejido maligno de próstata (Haverkamp, 2008). Por su parte, IL-12 y -23 parecen tener efectos antitumorales (Lin, 2007b), mientras que IL-8 promueve el crecimiento de células neoplásicas y de tumores sólidos, incluido el de próstata, y niveles aumentados de esta citoquina se correlacionan con metástasis y mayor puntuación de Gleason en cáncer de próstata (Haverkamp, 2008).

Los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  y del factor de crecimiento transformante (TGF) - $\beta$  se correlacionan con el desarrollo de tumores de próstata avanzados; además, e igual que IL-1, el TNF- $\alpha$  es capaz de reducir la estabilidad de NKX3.1 (Haverkamp, 2008; Markowski, 2008). La producción de grandes cantidades de proteína quimiotáctica de macrófagos (MCP) -1 aumenta la proliferación e invasividad del cáncer (Haverkamp, 2008). Muchas de estas moléculas con efectos protumorales (IL-1, -6, -8, TNF- $\alpha$ ) son inhibidas por la apigenina en modelos de inflamación (Gerritsen, 1995; Smolinski, 2003; Kim, 2004a; Hougee, 2005; Kowalski, 2005; Comalada, 2006; Funaguchi, 2007; Nicholas, 2007; Shanmugam, 2008).

## VII. FLAVONOIDES, APIGENINA Y RADIACIONES

### 1. FLAVONOIDES Y RADIACIONES IONIZANTES

Debido al auge de la utilización de radiaciones ionizantes para distintos fines, tales como el tratamiento del cáncer, el diagnóstico médico, aplicaciones industriales, etc., cada vez más personas están expuestas a ellas. Por ello, es de gran importancia la obtención de compuestos que permitan proteger a los tejidos sanos de los daños provocados por la radiación ionizante; estos compuestos, no indicados en el caso de pacientes con tumores, puesto que también protegerían a las células tumorales, son de gran interés para el personal médico o de industrias, aviadores, etc. sometidos a radiación por su trabajo (Lawenda, 2008; Alcaraz, 2009)

Aunque se han probado numerosas moléculas para evitar los daños causados por la radiación (compuestos con grupos sulfidriilo, como la cisteína o la amifostina, vitaminas antioxidantes, IFN- $\gamma$ ), su alta toxicidad a dosis radioprotectoras ha impedido su uso (Bogo, 1985; Nair, 2001; Song, 2006; Alcaraz, 2009). Así, los radioprotectores con grupos tiol, como la amifostina, provocan hipotensión, náusea, vómitos y alergia, lo que limita su uso en la práctica clínica (Hosseinimehr, 2003; Hosseinimehr, 2006).

Debido a su baja toxicidad y a sus propiedades antioxidantes, los flavonoides han despertado el interés por sus posibles efectos radioprotectores. Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que estos compuestos son capaces de reducir los daños genéticos

causados por la radiación ionizante en células muy sensibles, como son las células hematopoyéticas o los linfocitos.

El té rojo rooibos (Shimoi, 1996) o negro (Parshad, 1998), una mezcla de catequinas y ácido cafeico a concentraciones similares a las presentes en el vino, además de otros componentes de dicha bebida (etanol, glicerol, etc.) (Greenrod, 2003); extractos de cítricos (Hosseinimehr, 2003) o de bayas de espinos albar (rico en ácido clorogénico y epicatequina) (Hosseinimehr, 2007) actúan como radioprotectores. Un extracto de soja, rico en isoflavonas, disminuye los daños causados por la radiación ionizante en ratones: acelera la recuperación de los niveles de leucocitos circulantes y de reticulocitos, aumenta los niveles y la actividad de las defensas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa) y reduce los niveles de malonaldehído, un marcador de peroxidación lipídica, hepáticos, así como los daños tisulares en el hígado (Song, 2006). Nuestro grupo ha demostrado la actividad radioprotectora de extractos de olivo, de semilla de uva y de té verde (Castillo, 2000; Castillo, 2001; Benavente-García, 2002; Del Baño, 2006; Alcaraz, 2009).

La luteolina y la quercetina, entre otros flavonoides, disminuyen la genotoxicidad de la radiación *in vivo* (Shimoi, 1994; Shimoi, 1996). La orientina y la vicenina reducen las anomalías cromosómicas *in vitro* (Vrinda, 2001) e *in vivo* (Uma Devi, 2004) y previenen la muerte por daños en la médula ósea o en el sistema digestivo (Devi, 1999). La quercetina, la naringina y la crisina disminuyen el daño reparable al DNA, así como las lesiones no reparables, causados por la radiación ionizante tanto *in vitro* (Benkovic, 2008a; Benkovic, 2009a), como *in vivo* (Benkovic, 2008b; Benkovic, 2008c; Benkovic, 2009b), además de retrasar la muerte de los animales tratados con los flavonoides e irradiados y de reducir los síntomas asociados a la radiación (Orsolic, 2007; Benkovic, 2008c;

Benkovic, 2008b). Por otro lado, la genisteína ha demostrado estimular la hematopoyesis y aumentar la supervivencia de ratones irradiados (Zhou, 2005), mientras que la hesperidina disminuye los daños causados al DNA en células de médula ósea y las protege frente a la disminución de la proliferación celular causada por la radiación (Hosseinimehr, 2006). Los estudios de nuestro grupo demuestran que la rutina y la diosmina (Castillo, 2000; Benavente-García, 2002) y polifenoles como los ácidos carnósico, rosmarínico, gálico y elágico, el carnosol o el hidroxitirosol (Alcaraz, 2006; Del Baño, 2006; Alcaraz, 2009), tienen actividad radioprotectora.

Por su parte, Rithidech *et al.* (2005a) demostraron que la apigenina tiene actividad protectora frente a los daños genotóxicos provocados por la radiación ionizante en linfocitos.

Los efectos biológicos de la radiación son provocados por la acumulación de energía en las células irradiadas, provocando la formación de radicales libres de oxígeno. El anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y el peroxilo ( $R-OO^{\cdot}$ ) se forman secuencialmente a partir del oxígeno (Benavente-García, 2002) y, si no son rápidamente inactivados, oxidan distintas moléculas (Benavente-García, 2002; Rithidech, 2005a; Alcaraz, 2009). La radiación ionizante genera grandes cantidades de radical hidroxilo, muy reactivo y el más citotóxico, que, rápidamente, provoca la peroxidación de los lípidos de la zona (Alcaraz, 2009). A pesar de que, durante la vida de la célula, se generan grandes cantidades de estos mismos radicales en las distintas reacciones celulares, los ROS formados por el depósito de energía de la radiación ionizante se diferencian de los endógenos en su frecuencia de aparición y su localización (Alcaraz, 2009).

Dado que en condiciones normales la célula está expuesta a radicales, dispone de sistemas antioxidantes endógenos y enzimas capaces de reparar los daños. Sin embargo, en caso de la generación masiva de ROS, como ocurre a causa de la radiación ionizante, estos sistemas se saturan y el estrés oxidativo puede causar citotoxicidad radioinducida (daños cromosómicos y mutaciones) o, incluso, la muerte de la célula (Rithidech, 2005a). Por ello, probablemente la actividad antioxidante de los flavonoides esté en la base de su capacidad radioprotectora, puesto que ayudarían a los sistemas endógenos a capturar los ROS formados por la radiación (Devi, 1999; Castillo, 2000; Uma Devi, 2000; Castillo, 2001; Benavente-García, 2002; Del Baño, 2006; Alcaraz, 2009).

Aunque distintos flavonoides y polifenoles, e, incluso, extractos o mezclas complejas ricos en estos compuestos han demostrado ampliamente que son capaces de proteger frente a los daños causados por la radiación ionizante, existen estudios con resultados totalmente opuestos. En estos estudios, se utilizan líneas celulares tumorales a las que se les aplican los flavonoides y la radiación de forma aislada y combinados, demostrando que dichos compuestos pueden causar un aumento en la sensibilidad de las células a la radiación.

Así, la genisteína ha demostrado que establece sinergia con la radiación en células de cáncer de próstata y en dos líneas celulares de cáncer de cuello de útero. En el primer caso, aumentó la inhibición de la síntesis de DNA y el crecimiento celular (Hillman, 2001). Los efectos radiosensibilizantes sobre el cáncer de cuello de útero se debieron a la disminución de la viabilidad, el bloqueo del ciclo celular en G<sub>2</sub>/M (regulación positiva de p53 y p21) y en aumento de la apoptosis (liberación de citocromo c, regulación positiva de Bax y negativa de Bcl-2, activación de caspasas, aumento de la producción de ROS), además de a

la inhibición completa de la expresión de COX-2 inducida por la radiación de forma aislada (Zhang, 2006; Shin, 2008).

La apigenina, por su parte, ha demostrado actuar como radiosensibilizante en células de hepatoma (van Rijn, 1997; Shin, 2008) y de carcinoma escamoso de pulmón. En este tumor, Watanabe *et al.* (2007) demostraron que la combinación de la apigenina con radiación ionizante aumentó la apoptosis y la expresión de p21 / WAF1, induciendo, así, la parada del ciclo celular.

La radiación ionizante, incluso a dosis bajas, es capaz de aumentar la actividad y la unión al DNA de NF- $\kappa$ B en células hematopoyéticas y en distintas líneas tumorales (leucemia, cáncer de cabeza y cuello, de mama, de colon, de próstata, etc.) (Garg, 2005; Kim, 2005a; Rithidech, 2005b; Brzoska, 2009). Este factor de crecimiento causa el incremento de la expresión de moléculas antiapoptóticas (Bcl-2), promoviendo parcialmente la resistencia a los efectos tóxicos de la radiación (Kim, 2005a; Watanabe, 2007). El tratamiento de células de cáncer de próstata con un inhibidor del proteasoma bloqueó la degradación de I $\kappa$ B y, por tanto, la actividad de NF- $\kappa$ B, sensibilizándolas a la radiación (Kim, 2005a).

El mecanismo de acción de este proceso parece ser multifactorial. Por un lado, las roturas que la radiación causa en el DNA disparan varias vías de señalización que convergen en la activación de NF- $\kappa$ B; una de ellas está mediada por la quinasa mutada en ataxia telangiectasia (ATM), un activador de NF- $\kappa$ B que, además, regula la actividad de proteínas reparadoras del DNA e implicadas en el ciclo celular (Bakkenist, 2003; Brzoska, 2009). La activación de ATM puede generar señales a favor de la supervivencia o a favor de la apoptosis, según la intensidad del daño genotóxico o los perfiles de expresión génica de la célula (Brzoska, 2009).

Por otro lado, los ROS formados por radiación la ionizante oxidan los centros catalíticos de las fosfatasa celulares, modificando, así, el equilibrio entre formas de receptores de membrana y quinasas citosólicas fosforiladas/defosforiladas (Kamata, 2005), lo que inicia cascadas de señalización hacia el núcleo. Una de las más importantes, que implica la activación de quinasas como algunas MAPK o la quinasa inductora de NF- $\kappa$ B (NIK), provoca la activación de ese factor de transcripción (Brzoska, 2009). Otra vía implica la translocación al núcleo, inducida por ROS, de ciertas proteínas, entre ellas IKK, que forman complejos con ATM (Wu, 2005; Wu, 2006; Wu, 2007); el complejo ATM-IKK vuelve al citoplasma, donde activa a NF- $\kappa$ B. Asimismo, en ocasiones se generan cantidades de ROS suficientes como para que activen directamente a NF- $\kappa$ B (Brzoska, 2009).

Los radicales, además de su importancia como causantes de daños celulares, han sido propuestos como activadores de distintas moléculas, como las caspasas, las MAPK y AP-1 (Brzoska, 2009).

Debido a sus efectos sobre las cascadas de señalización mencionadas, la radiación ionizante causa la expresión de COX-2 y la consiguiente síntesis de PGE<sub>2</sub>, lo que se ha relacionado con un aumento de la radiorresistencia (Tessner, 2004).

Dado que la activación de NF- $\kappa$ B parece tener un importante papel en el desarrollo de resistencia a la radiación, además de a otros genotóxicos, posiblemente la capacidad de la apigenina y otros flavonoides de inhibir su actividad (Kim, 2004a; Rithidech, 2005a; Yoon, 2005; Comalada, 2006; Pergola, 2006; Meeran, 2008b; Nandakumar, 2008; Crozier, 2009) podría estar en la base de que induzcan radiosensibilización en ciertos estudios. Además, y aunque los polifenoles

tienen actividad antioxidante, en ciertas condiciones experimentales pueden actuar como prooxidantes (Loo, 2003).

## **2. FLAVONOIDES Y RADIACIONES NO IONIZANTES: RADIACIÓN UV Y FOTOENVEJECIMIENTO**

Durante el pasado siglo, las poblaciones blancas occidentales comenzaron a apreciar el bronceado como signo de belleza e, incluso, de salud. Esto ha provocado un cambio dramático en los hábitos de exposición al sol, provocando un gran aumento en la incidencia de cánceres cutáneos y, en menor medida, en la mortalidad (de Gruijl, 2008). Así, durante el año 2009 en EEUU, se diagnosticaron más de un millón de nuevos casos de cáncer cutáneo no melanoma y en torno a 53 000 casos de melanoma (Jemal, 2009).

Este incremento de la incidencia de los cánceres cutáneos, cuyo tratamiento supone un coste anual de unos 2900 millones de dólares en EEUU (Sharma, 2010), así como el interés de la sociedad de luchar contra el envejecimiento cutáneo, un mercado que mueve unos 10 000 millones de dólares (Yaar, 2007), ha estimulado la investigación sobre ambos fenómenos.

Ya en 1894 se estableció la relación entre la exposición solar y el cáncer de piel y, desde entonces, se ha identificado la radiación UV como el principal factor etiológico de los carcinomas cutáneos, responsable del 90% de estos tumores (Filip, 2009), además de provocar, aproximadamente, tres millones de casos de cataratas al año en todo el mundo (González, 2008). La radiación UV es un carcinógeno completo

que causa eritema, edema, quemaduras, engrosamiento de la piel y aumento de la pigmentación tras exposiciones agudas, e inmunosupresión, envejecimiento prematuro y carcinomas si la exposición es crónica (Filip, 2009; Nichols, 2010).

La radiación UVA supone alrededor del 95% de la radiación UV solar que alcanza la superficie terrestre. Es capaz de penetrar profundamente en la dermis y es más efectiva que la UVB provocando bronceado; daña los vasos sanguíneos dérmicos, provoca hiperplasia epitelial y engrosamiento del estrato córneo, depleción de las células de Langerhans y sus efectos son mediados, principalmente, por los ROS (Svobodova, 2006; Yaar, 2007). Debido a su capacidad de penetrar profundamente en la dermis, la radiación UVA parece ser la mayor responsable del fotoenvejecimiento.

La radiación UVB (4-5% de la radiación UV que atraviesa la atmósfera) es mucho más genotóxica que la UVA y produce más quemaduras; actúa, principalmente, sobre la epidermis, dañando directamente el DNA y las proteínas, aumentando la producción de ROS, reduciendo los niveles de antioxidantes endógenos, e induciendo inmunosupresión e inflamación (Svobodova, 2006; Yaar, 2007). Mientras que la luz UVA se relaciona con el 67% de los melanomas, la UVB se considera responsable de los daños genéticos que provocan el desarrollo de carcinomas de células basales (BCC) y de células escamosas (SCC) (Svobodova, 2006).

La fotoprotección y la quimiopreención, por tanto, están cobrando mucha importancia como elementos profilácticos y terapéuticos esenciales en la lucha contra el fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis (González, 2008; Filip, 2009). Es por ello que existe un gran interés en el desarrollo y comercialización de nuevos compuestos fotoprotectores.

Recientemente se han comercializado fotoprotectores orales que contienen distintos principios activos, principalmente antioxidantes, que pueden regenerar la capacidad antioxidante del organismo, perdida por la exposición solar. Estos compuestos incluyen el licopeno, mezclas de vitaminas antioxidantes, extractos vegetales ricos en polifenoles (extractos de *Polypodium leucotomos* o de té verde) y de flavonoides, como la genisteína, que combinan la acción antioxidante con la antiinflamatoria (González, 2008). Un ensayo de intervención con una bebida de cacao rica en flavonoles disminuyó la sensibilidad a la radiación UV, medida a través de la aparición de edema (Heinrich, 2006), mientras que la aplicación tópica de genisteína a humanos redujo el eritema causado por la exposición a luz UV (Wei, 2003). En humanos, los polifenoles del té verde reducen el edema y la infiltración leucocitaria inducidos por la radiación UV (Nichols, 2010).

Además, dado que es bien conocido que la administración tópica de antioxidantes (formulaciones con vitamina C o E, o con  $\beta$ -caroteno) tiene efecto protector frente a la radiación UV (Pinnell, 2003), se está investigando el uso de polifenoles (polifenoles del té verde, resveratrol, curcumina, genisteína, silimarina, quercetina, apigenina, etc.) como fotoprotectores tópicos (Yaar, 2007; González, 2008). Numerosos compuestos vegetales han demostrado proteger frente a los daños causados por UVB, entre ellos el resveratrol, los ácidos cafeico y ferúlico, la apigenina, la genisteína, la quercetina, el EGCG, la epicatequina, la silibina, y la silimarina (extracto de *Silybum marianum*) y extractos de *Ginkgo biloba*, *Polypodium leucotomos* o *Prunella vulgaris*. Sin embargo, solamente unos pocos (ácido carnósico, quercetina, epicatequina, EGCG, silimarina, extractos de *P. leucotomos* o *P. vulgaris*) protegen frente a UVA (Svobodova, 2006).

En modelos animales, muchos polifenoles o extractos ricos en ellos han demostrado efecto antifotocarcinogénico. Así, el extracto de semilla de uva, la silibinina, la silimarina, los polifenoles del té verde, el EGCG, la genisteína y la apigenina reducen el desarrollo de tumores inducidos por UVB (Birt, 1997; Lepley, 1997; Tong, 2007; Dinkova-Kostova, 2008; Filip, 2009; Meeran, 2009; Nichols, 2010; Sharma, 2010). La apigenina, además aumenta la supervivencia sin tumores (Birt, 1997).

La absorción de fotones de luz UV por los cromóforos cutáneos puede provocar reacciones fotoinducidas, típicas en el DNA o, si es recogida por un sensibilizante, la generación de radicales y ROS (Svobodova, 2006). Son muchas las biomoléculas capaces de absorber UV: ácidos nucleicos, aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, cisteína), NAD(P)H, grupos hemo, quinonas, porfirinas, eumelanina, etc. (Svobodova, 2006; González, 2008). Sin embargo, son los ácidos nucleicos los cromóforos críticos en la respuesta biológica de la piel a la radiación UV; afortunadamente, están en parte protegidos por la presencia de aminoácidos aromáticos en el estrato córneo (Svobodova, 2006).

La captación de luz UVB por los ácidos nucleicos provoca la formación de fotoproductos diméricos entre pirimidinas adyacentes en la misma hebra del DNA; se forman dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) y, con menor frecuencia, fotoproductos de 6-4 pirimidona (6-4PP), que pueden ser reparados por enzimas específicas (Svobodova, 2006; de Gruijl, 2008; González, 2008; Rundhaug, 2008; Filip, 2009). Su reparación incorrecta, más frecuente en el caso de los CPD, causa mutaciones características (Svobodova, 2006; de Gruijl, 2008); el gen de p53 contiene este tipo de mutaciones en la mayoría de SCC humanos y murinos (Rebel, 2001; Melnikova, 2005; de Gruijl, 2008; Rundhaug, 2008).

Estudios en modelos murinos han determinado la importancia de los CPD en el desarrollo de carcinomas cutáneos inducidos por UVB (Jans, 2005).

Las estructuras anormales inducidas por la radiación UV en el DNA son detectadas por proteínas sensores que estimulan la actividad de enzimas reparadoras y activan a quinasas transductoras como la proteína relacionada con ataxia telangiectasia y Rad3 (ATR) y ATM, que tienen como sustratos a p53 o a la quinasa de control (Chk) -1. La fosforilación de esta última enzima causa su paso desde el núcleo al citoplasma, donde bloquea las cdk1 y 2, deteniendo la replicación del DNA (Nakanishi, 2009).

Este tipo de daños directos de la radiación UV también afectan al RNA, causando el bloqueo de la transcripción (Svobodova, 2006).

Además, la irradiación con luz UV hace la cromatina más accesible, facilitando la rotura de las hebras del DNA y el acceso de proteínas capaces de unirse a él (Nakanishi, 2009).

Se ha descrito que los polifenoles del té verde, el EGCG, la silibinina o la baicaleína disminuyen la formación de CPD y aumentan su reparación (Dinkova-Kostova, 2008; Filip, 2009; Meeran, 2009; Zhou, 2009; Nichols, 2010).

La exposición a radiación UV, bien sea UVA o UVB, provoca la rápida formación de ROS y RNS (Nishigori, 2006; Svobodova, 2006; Straface, 2007; Bossi, 2008; Rundhaug, 2008; Huang, 2009). Así, Straface *et al.* (2007) han demostrado que, pasados 30 minutos de irradiar fibroblastos con una única dosis de UVB, se detecta un aumento en el contenido de anión superóxido, mientras que otros estudios indican

que los niveles de ROS pueden llegar a multiplicarse por 7 tras la exposición a UVA (Bossi, 2008).

La baicaleína, la silimarina, la miricetina, la genisteína y el EGCG han demostrado proteger frente al daño oxidativo causado por la radiación UV tanto *in vitro* como *in vivo*, reduciendo la generación de distintos tipos de ROS (Wei, 1996; Wei, 1998; Wei, 2002; Wei, 2003; Huang, 2009; Zhou, 2009; Nichols, 2010).

Aunque la piel contiene antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que reducen los radicales a moléculas menos reactivas (Benavente-García, 2002; Svobodova, 2006; Yaar, 2007), estos sistemas endógenos se ven sobrepasados por la producción masiva de especies reactivas. Además, la radiación UV provoca la depleción de la red endógena de antioxidantes; así, tras la exposición a UV se detecta la disminución de la actividad de la catalasa, la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa, y la SOD, así como la reducción de los niveles de glutatión, de ubiquinona y de  $\alpha$ -tocoferol (Shindo, 1994; Svobodova, 2006; Bossi, 2008).

La apigenina y otros flavonoides han demostrado aumentar o proteger la red de antioxidantes endógenos, lo que reduciría los daños causados por la radiación UV (Manach, 2004; Khan, 2006; Rahman, 2006).

El exceso de radicales libres provoca una cascada de eventos que conlleva el deterioro progresivo de la estructura y función celulares, al oxidar distintas biomoléculas celulares. Una de las principales dianas es, de nuevo, el DNA; los ROS provocan rotura de hebras del DNA, entrecruzamientos de las proteínas asociadas, y la oxidación de las bases del DNA, fundamentalmente de la guanina, que da como resultado la formación de 8-oxo-7,8-dihidroxi-2'-deoxiguanina (8-oxo-dG), causante de

mutaciones (Wilgus, 2003a; Svobodova, 2006; de Gruijl, 2008; Rundhaug, 2008). Estos daños inducen la expresión de p53 y de p21, a través de las quinasas ATM, ATR, p38 y otras MAPK, en las 8-12 horas posteriores a la exposición; se detiene el ciclo celular para intentar reparar los daños genéticos y, si no es posible, la célula entra en apoptosis (Svobodova, 2006; Rundhaug, 2008). Sin embargo, las mutaciones o la pérdida del gen de p53, muy frecuentemente causadas por la radiación UV, eliminan este punto de control, aumentando la susceptibilidad de la piel a la fotocarcinogénesis (de Gruijl, 2008).

La administración de polifenoles del té verde o de silibinina regula la expresión de p53 y p21, provocando la parada del ciclo celular (Dinkova-Kostova, 2008; Filip, 2009; Nichols, 2010). La apigenina provoca parada del ciclo celular, en G<sub>2</sub>/M en queratinocitos y en G<sub>1</sub> en fibroblastos, por inhibición de cdk, acumulación de p53 y aumento de p21/WAF-1 (Lepley, 1997; McVean, 2000; Patel, 2007), además de inducir la liberación de citocromo c al citoplasma y la translocación de Bax a la mitocondria, activando, así, la apoptosis en respuesta a la radiación UVB (Abu-Yousif, 2008).

También el DNA mitocondrial sufre daños oxidativos; además, debido a la menor eficacia de los sistemas reparadores del orgánulo, acumula más mutaciones que el nuclear (Svobodova, 2006). Así, en la piel expuesta a la luz solar, se detecta con mayor frecuencia la delección de una zona del DNA mitocondrial que contiene regiones codificantes de varios elementos de la cadena respiratoria. Este daño, además de afectar a la función mitocondrial, puede causar la acumulación de más ROS (Yaar, 2007).

Los ROS formados por la radiación UV, además, son capaces de atacar a las membranas celulares formando radicales lipoperoxilo y

lipohidroperóxido, que también son especies reactivas y tienen una vida media mucho mayor (Nishigori, 2006; Svobodova, 2006; Bossi, 2008; Filip, 2009; Rhodes, 2009). La exposición aguda a UV de fibroblastos aumenta hasta 6 veces los niveles normales de peroxidación lipídica (Bossi, 2008), mientras que Mulero *et al.* (2006), en un trabajo con ratas, describieron el incremento de marcadores de peroxidación lipídica tanto en plasma como en la epidermis.

El EGCG y la miricetina inhiben la peroxidación lipídica inducida por UV (Huang, 2009; Nichols, 2010).

Por otro lado, los ROS pueden causar distintas modificaciones oxidativas en las proteínas: formación de derivados carbonilo, entrecruzamientos de tirosinas, interconversión y oxidación de aminoácidos, aductos, rotura de enlaces peptídicos, etc. La cisteína, la metionina, la tirosina, la prolina y la arginina son los aminoácidos más susceptibles a la oxidación (Svobodova, 2006; Yaar, 2007). La oxidación de proteínas puede ocasionar cambios en la actividad de las enzimas y pérdida de función o cambios en la degradación en proteínas estructurales.

La aplicación tópica de algunos polifenoles o extractos vegetales (extracto de semilla de uva, polifenoles del té verde, EGCG) inhibe la oxidación de proteínas (Nichols, 2010).

Los radicales formados por la radiación UV oxidan los centros catalíticos de las fosfatasas celulares, entre ellas PTEN, alterando el equilibrio entre formas fosforiladas/defosforiladas de receptores y quinasas celulares (Yaar, 2007; Rundhaug, 2008; Brzoska, 2009). Esto causa la activación de los receptores de IL-1, TNF- $\alpha$ , insulina, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) y EGF (Yaar, 2007); de las quinasas

MAPK, PI3K / Akt (Mahns, 2004; Bachelor, 2005; Kim, 2005b; Svobodova, 2006; Rundhaug, 2008; Brzoska, 2009; Huang, 2009), así como de los factores de transcripción AP-1 y NF- $\kappa$ B (Reelfs, 2004; O'Dea, 2008; Brzoska, 2009). AP-1, que es activado, además, por la liberación de ceramidas de las membranas oxidadas, aumenta la proliferación de queratinocitos, causando la hiperplasia epitelial típica del fotoenvejecimiento, e inhibe la síntesis de procolágeno de tipo I y III (Yaar, 2007). La activación de NF- $\kappa$ B es mediada, además, por ATM, PKC, p38 y por el radical superóxido y los peroxinitritos generados tras la irradiación, y participa en el aumento de la angiogénesis y de los infiltrados inflamatorios (Yaar, 2007; Brzoska, 2009).

Numerosos estudios han demostrado el papel de varios polifenoles y extractos vegetales ricos en estos compuestos en el bloqueo de la activación de vías de señalización inducida por la radiación UV. Así, los polifenoles del té verde y el EGCG bloquean la activación de MAPK, NF- $\kappa$ B y AP-1, mientras que este último inhibe, también, la actividad de PI3K y Akt (Filip, 2009; Nichols, 2010). La miricetina, por su parte, suprime la activación inducida por UV de PI3K, Akt y JNK (Huang, 2009; Jung, 2009). La genisteína, además, bloquea el aumento de la expresión de JNK y la activación de STAT (Yaar, 2007; Dinkova-Kostova, 2008) y, junto a la quercetina, el kaempferol, la wogonina y la apigenina inhibe a AP-1 (Lim, 2007; Dinkova-Kostova, 2008). La silibinina inhibe la activación de NF- $\kappa$ B y de STAT (Dinkova-Kostova, 2008).

Además, hay varias isoformas de PKC implicadas en vías de señalización activadas por radiación UV: PKC $\epsilon$  actúa como sensibilizador y participa en el desarrollo de SCC (Wheeler, 2004; Aziz, 2007); la sobreexpresión de PKC atípicas protege frente a los daños causados por la radiación UV, induciendo apoptosis en las células dañadas; mientras

que PKC $\alpha$  y  $\zeta$  inhiben la muerte inducida por UV y la inactivación de PKC $\delta$  provoca un aumento de la síntesis de ROS (Bossi, 2008).

Por otro lado, acumulación de proteínas oxidadas causa la inhibición de la actividad del proteasoma (Yaar, 2007; Catalgol, 2009), lo que, por un lado, aumenta los niveles de MMP-1 y disminuye los de TIMP-1, y por otro, aumenta la activación de JNK y AP-1 (Catalgol, 2009).

Aunque el fotoenvejecimiento afecta a toda la piel (los vasos sanguíneos se dilatan y se vuelven tortuosos; aumenta el infiltrado inflamatorio; los queratinocitos pierden la polaridad y se vuelven irregulares y los melanocitos son menos frecuentes y anormales), probablemente la elastosis sea uno de los fenómenos asociados al fotoenvejecimiento más característicos. Histológicamente, la dermis muestra acúmulos desorganizados de elastina, aumento de los glicosaminoglicanos y proteoglicanos y degradación del colágeno (Svobodova, 2006; Yaar, 2007). Esta alteración depende de la síntesis de componentes estructurales dérmicos, y de su degradación mediante las MMP, reguladas por TIMP.

En la piel expuesta a la radiación, disminuye la síntesis de procolágeno de tipo I y III (Svobodova, 2006; Yaar, 2007) y de ácido hialurónico (Dai, 2007) y aumenta la de elastina (Svobodova, 2006). Estos cambios son debidos, en parte, a la inducción de la liberación de MMP, endopeptidasas dependientes de cinc encargadas de la degradación de los componentes de la matriz extracelular, por las células dérmicas (fibroblastos, queratinocitos, macrófagos, células endoteliales, mastocitos y eosinófilos) en respuesta a la exposición a UVA (MMP-1, -2, -3, -9) o UVB (MMP-1, -3, -9), o a ROS, citoquinas inflamatorias o MAPK (Svobodova, 2006; Yaar, 2007; Catalgol, 2009). Asimismo, la radiación UV atrae a la piel a neutrófilos, los cuales liberan al medio MMP-8 (Yaar,

2007); algunos autores sugieren que la principal fuente de MMP secretadas por el estímulo de la radiación UV son los neutrófilos que infiltran la dermis (Rijken, 2005). La radiación UV también afecta a la síntesis de los reguladores de las MMP, disminuyendo los niveles de TIMP-1 (Catalgol, 2009). Por otro lado, la degradación del colágeno causada por la luz UV no es completa y los productos formados, además, regulan negativamente la síntesis de colágeno (Yaar, 2007).

Además, la radiación UV causa la regulación negativa de las sintasas de ácido hialurónico (Dai, 2007).

El tratamiento con polifenoles del té verde, EGCG, genisteína, miricetina, luteolina, crisina, quercetina, kaempferol, wogonina o apigenina reduce la síntesis y secreción de distintas MMP inducidas por radiación UV (Lim, 2007; Sim, 2007; Yaar, 2007; Dinkova-Kostova, 2008; Filip, 2009; Jung, 2009; Nichols, 2010). La quercetina, la genisteína el kaempferol, la luteolina, la crisina, la miricetina, la wogonina y la apigenina, además, inhiben la actividad MMP-1 (Kim, 2003; Lim, 2007; Sim, 2007), mientras que la apigenina también ha demostrado inhibir la MMP-9 (Choi, 2009a). Además, la genisteína y la apigenina regulan la síntesis de TIMP y de uPA (Kim, 2003), mientras que el EGCG y los polifenoles del té verde aumentan la expresión de TIMP (Dinkova-Kostova, 2008).

La radiación UVA y UVB induce la expresión o activa a las enzimas del metabolismo del ácido araquidónico. Rhodes *et al.* (2009) han demostrado que, tras la exposición de piel humana a radiación UV, se produce una activación secuencial del metabolismo del ácido araquidónico. Así, a las 24 horas de la exposición, aumenta la expresión de COX-2, que sintetiza prostaglandinas vasodilatadores (E y F) en las 24-48 primeras horas, asociado al eritema. Posteriormente, hasta las 72

horas, se elevan los niveles de 12-LOX y sus metabolitos, 8-, 11-, 12-HETE, potentes quimioquinas que atraen a neutrófilos y linfocitos y, a partir de las 72 horas, 15-LOX produce un pico de 15-HETE, antiinflamatorio.

La peroxidación lipídica ha demostrado activar la PLA<sub>2</sub> (Bachelor, 2004). Los daños a las membranas, así como la activación de quinasas de señalización (Mahns, 2004; Bachelor, 2005; Kim, 2005a; Rundhaug, 2008; Brzoska, 2009) aumentan la expresión de COX-2 (Mahns, 2004; Afaq, 2005; Bachelor, 2005; Kim, 2005b; Svobodova, 2006; Yaar, 2007). Este aumento se detecta en las lesiones premalignas (queratosis actínicas) y malignas (SCC, BCC) tanto en animales como en humanos (Athar, 2001; An, 2002; Harris, 2007b; Rundhaug, 2008), así como tras una exposición aguda a UV, sobre todo en la capa basal, causando un aumento de la proliferación y apoptosis de los queratinocitos (An, 2002; Tripp, 2003; Rundhaug, 2008). Distintos estudios con ratones transgénicos o con inhibidores específicos de COX-2 han resaltado la importancia de COX-2 tanto en el desarrollo de tumores inducidos por UV (Wilgus, 2003a; Wilgus, 2003b; Butler, 2005; Fischer, 2007), como en la inflamación mediada por UV (Wilgus, 2002; Wilgus, 2003a).

La silimarina, la baicaleína, el extracto de semilla de uva y los polifenoles del té verde reducen el edema y la infiltración leucocitaria (Zhou, 2009; Nichols, 2010; Sharma, 2010). La administración oral de polifenoles del té verde o de semilla de uva reduce los niveles de marcadores de inflamación (COX-2, PGE<sub>2</sub>) y de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 y -6) (Meeran, 2009; Nichols, 2010; Sharma, 2010). La genisteína, la silimarina, el EGCG y la apigenina inhiben la inducción de la expresión de COX-2 por radiación UV (Tong, 2007; Van Dross, 2007; Dinkova-Kostova, 2008; Filip, 2009; Nichols, 2010).

Además, la irradiación con luz UV aumenta la expresión de 15-LOX, cuyos metabolitos inhiben la proliferación celular y la síntesis de 12-LOX, de ciclinas y de cdk, y activan la apoptosis. Las dos isozimas de 15-LOX tienen importante actividad anticarcinogénica a través del metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (Yoo, 2008).

La radiación UV también aumenta la expresión de iNOS, cuyo producto, el NO, participa en la iniciación de la melanogénesis, el eritema y la inmunosupresión (Cals-Grierson, 2004; Svobodova, 2006).

La silimarina inhibe la inducción de la expresión de iNOS causada por radiación UV (Nichols, 2010).

La ornitina decarboxilasa (ODC), enzima limitante en la síntesis de poliaminas, tiene un importante papel en la regulación de la proliferación celular y es un marcador de promoción tumoral. La exposición aguda o crónica a UVB aumenta la expresión y la actividad de esta enzima (Afaq, 2005; Svobodova, 2006; Yaar, 2007; de Grujil, 2008).

Dos flavonoides, la silimarina y la apigenina, han demostrado inhibir la inducción de la enzima ODC por UV (Birt, 1997; Nichols, 2010).

Los queratinocitos, los melanocitos y las células de Langerhans en la epidermis, y los fibroblastos, las células endoteliales y del músculo liso, los mastocitos y otras células inflamatorias presentes en la dermis pueden producir citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento cuando son estimuladas o activadas por UVA o UVB. Estas moléculas están implicadas en la regulación de numerosos procesos del fotoenvejecimiento, desde los cambios en las células o en la matriz extracelular a la inmunosupresión (Tabla 4) (Kondo, 2000).

El extracto de semilla de uva, la silibinina, los polifenoles del té verde y el EGCG inhiben la inmunosupresión inducida por radiación UVB, a través del aumento de IL-12 y la disminución de IL-10 (Dinkova-Kostova, 2008; Nandakumar, 2008; Filip, 2009).

Por otro lado, la miricetina inhibe la angiogénesis producida por dosis repetidas de UV-B; este compuesto, además de los polifenoles del té verde y el EGCG suprimen la inducción de VEGF (Dinkova-Kostova, 2008; Jung, 2009). La silibinina inhibe la expresión causada por UV de los factores proangiogénicos HIF-1 $\alpha$  y VEGF (Dinkova-Kostova, 2008).

<b>Epidermis</b>	Desregulación del crecimiento de queratinocitos	IL-1*, -6*, -8; GM-CSF, TGF- $\alpha$ , NGF (producidos por queratinocitos) KGF, EGF, HGF (producidos por fibroblastos y otras células dérmicas)
	Anomalías en la pigmentación	bFGF, HGF (aumento de la actividad de melanocitos) IL-1*, -6*; TGF- $\beta$ *, TNF- $\alpha$ *, IFN- $\beta$ (disminución de la actividad de los melanocitos)
	Depleción de células de Langerhans	IL-1*, -6*; TNF- $\alpha$ *, MCP-1, GM-CSF
<b>Dermis</b>	Control del crecimiento y diferenciación de fibroblastos	IL-1*, -6*; TGF- $\alpha$ , - $\beta$ *; TNF- $\alpha$ *, PDGF, FGF
	Inducción de la síntesis de componentes de la matriz extracelular	IL-1, -4; TGF- $\beta$ *, PDGF, IGF-1
	Regulación de MMP	IL-1*, -6*; TGF- $\beta$ *, TNF- $\alpha$ *, PDGF, bFGF, EGF, GM-CSF (activación / inducción de síntesis de MMP) IL-4, IFN- $\gamma$ (inhibición de MMP) IL-1*, EGF, bFGF (aumento de la síntesis de TIMP)
	Infiltración dérmica de células inflamatorias	IL-1*, -6*, TNF- $\beta$ (atracción de neutrófilos)
<b>Organismo</b>	Inmunosupresión	IL-4, -10 (regulación positiva) IL-12 (regulación negativa)

**Tabla 4.** Implicación de las citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento en las alteraciones producidas durante el fotoenvejecimiento. *bFGF*: factor de crecimiento de fibroblastos básico; *EGF*: factor de crecimiento epidérmico; *FGF*: factor de crecimiento de fibroblastos; *GM-CSF*: factor estimulante de colonias de granulocitos / macrófagos; *HGF*: factor de crecimiento de hepatocitos; *IFN*: interferón; *IGF*: factor de crecimiento similar a insulina; *IL*: interleuquina; *KGF*: factor de crecimiento de queratinocitos; *MCP*: proteína quimiotáctica de monocitos; *MMP*: metaloproteasas de matriz; *NGF*: factor de crecimiento nervioso; *PDGF*: factor de crecimiento derivado de plaquetas; *TGF*: factor de crecimiento transformante; *TIMP*: inhibidor tisular de MMP; *TNF*: factor de necrosis tumoral. Asteriscos: regulación por radiación UV (Kondo, 2000; Kim, 2005b; Svobodova, 2006; Gambichler, 2007; Yaar, 2007; Dinkova-Kostova, 2008).

## **OBJETIVOS**

---



1. Evaluar la posible actividad antiinflamatoria de un un derivado soluble en agua de la flavona apigenina, apigenina potásica, en un modelo de inflamación aguda en ratones inducido por la inyección de carragenato.
  
2. Estudiar los efectos de la apigenina potásica:
  - a) *in vitro*, sobre la viabilidad, apoptosis, ciclo celular y migración de la línea celular de cáncer de próstata TRAMP-C1, en comparación con la línea celular de próstata no transformada PNT2;
  
  - b) *in vivo*, sobre la supervivencia de los animales en un modelo murino de carcinoma de próstata trasplantable.
  
3. Analizar el posible efecto protector de la apigenina potásica frente a:
  - a) la radiación ionizante (radiación  $\gamma$  y X), *in vitro*, en linfocitos humanos y en dos líneas celulares (TRAMP-C1 y PNT2);
  
  - b) la radiación no ionizante, *in vivo*, en un modelo murino de fotoenvejecimiento inducido por radiación UV, así como su biodistribución plasmática y tisular.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**

---



**MATERIAL**

---



## **I. ESTUDIOS *IN VITRO***

### **1. LÍNEAS CELULARES**

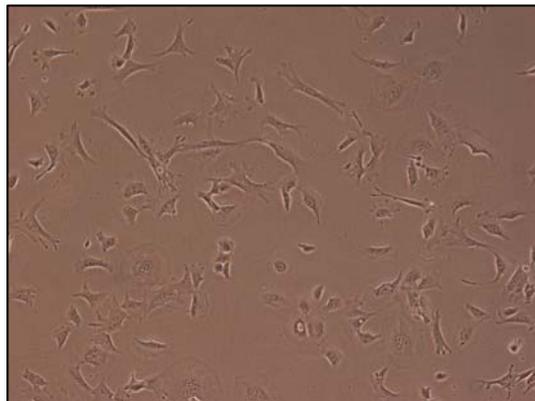
En los estudios *in vitro* hemos utilizado las siguientes líneas celulares:

- **Línea celular de carcinoma de próstata de ratón transgénico TRAMP-C1 (ATCC, EEUU) (Fig. 13).**

Esta línea de carcinoma de próstata fue derivada en 1996 de un tumor primario desarrollado en la cepa transgénica de ratones TRAMP.

Estos ratones, procedentes de la cepa C57BL/6, fueron diseñados para expresar un constructo para dirigir la expresión específica en el epitelio prostático del antígeno T grande del virus SV40. Todos los machos TRAMP desarrollan, de forma espontánea y uniforme tras la pubertad, todo el espectro tumoral de la próstata, que semeja completamente a la patogenia del cáncer de próstata en humanos.

Para el cultivo de la línea TRAMP-C1 hemos utilizado el medio DMEM con 4,5 g/l de glucosa, tamponado a pH 7,2-7,4 y suplementado con suero bovino fetal (5%) y Nu-Serum (5%), glutamina (4 mM), dehidroandrosterona (10 nM), insulina (10 mg/ml), penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Los cultivos se han mantenido a 37°C, con una humedad relativa del 90-95% y atmósfera con el 8% de CO<sub>2</sub>.

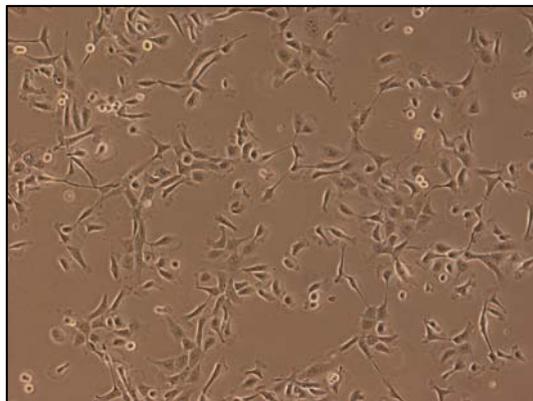


**Figura 13.** Células de la línea TRAMP-C1 en cultivo (contraste de fases, 100x).

**- Línea celular de células epiteliales de próstata PNT2 (HPACC, Reino Unido) (Fig. 14).**

Línea de células epiteliales de próstata normales, establecida a partir de tejido de próstata de un hombre de 33 años, e inmortalizada mediante la transfección de un plásmido con el genoma del virus SV40 con un origen de replicación defectivo.

Para el cultivo de esta línea celular hemos utilizado el medio RPMI 1640, tamponado a pH 7,2-7,4 y suplementado con SBF (10%), glutamina (2 mM), penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Los cultivos se han mantenido a 37°C, con una humedad relativa del 90-95% y atmósfera con el 5% de CO<sub>2</sub>.



**Figura 14.** Células de la línea PNT2 en cultivo (contraste de fases, 100x).

### **Método de cultivo.**

Establecimos los cultivos a partir de viales criocongelados en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Descongelamos los viales rápidamente en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$ , pasando el contenido del vial a un frasco de cultivo de  $75\text{ cm}^2$  con 10 mL de medio de cultivo fresco. Cuando las células se habían fijado al sustrato, pasadas 24 horas, sustituimos el medio por medio fresco para eliminar el crioprotector (dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%) que contenía el vial.

Para el cultivo masivo usamos frascos de  $75\text{ cm}^2$  y el medio adecuado según la línea celular. Todo el instrumental utilizado fue esterilizado previamente y realizamos la manipulación de las células en cabinas de flujo laminar vertical Cultair ASB tipo II. Controlamos el crecimiento celular diariamente mediante un microscopio invertido de contraste de fases, cambiando el medio de cultivo cada vez que el indicador de pH señalaba que se había agotado (2-3 días).

Para realizar los subcultivos y obtener las células para inocular los ratones, tratamos los cultivos confluentes con 3 ml de tripsina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (0.25% y 0.25%, respectivamente) durante 2-5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Tras despegar las células mediante agitación y añadir 5 ml de medio suplementado con suero bovino fetal, fueron centrifugadas a 214 g durante 10 minutos (TRAMP-C1) o a 150 g durante 5 minutos (PNT2) a temperatura ambiente para eliminar la tripsina. Resuspendimos el sedimento en 2 ml de medio fresco para realizar el conteo de células vivas con azul tripán en una cámara hemocitométrica, comprobando que la viabilidad celular media fuera como mínimo del 99%. A partir de la densidad así obtenida calculábamos el inóculo necesario para el subcultivo o para los ensayos.

Comprobamos regularmente la ausencia de *Mycoplasma spp.* en todas las líneas celulares utilizadas mediante la tinción de fluorescencia directa del ADN con Hoechst 33258.

## 2. REACTIVOS

- El medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), el medio RPMI 1640 y el F-10, la glutamina, la dehidroandrosterona, la insulina, la penicilina, la estreptomycinina, el bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), el dimetil sulfóxido (DMSO), el Hoechst 33258, el PBS, la estaurosporina, la ribonucleasa A (RNasa) pancreática bovina, el yoduro de propidio, la fitohemaglutinina y la citochalasina B procedían de Sigma (Sigma Co., España).
- El suero bovino fetal (SBF) y el Nu-Serum se compraron a Gibco (EEUU) y a BD (EEUU), respectivamente.
- El ácido acético glacial y el etanol se obtuvieron de Scharlau (Scharlab S.L., España)
- El metanol procedía de Panreac (España).
- La heparina sódica al 5% se obtuvo de Laboratorios Rovi (España).

### 3. APARATOS

En los estudios *in vitro* hemos utilizado los siguientes aparatos:

- Lector de placas de 96 pocillos (Servicio de Cultivo de Tejidos, Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI), Universidad de Murcia) modelo Multiskan MCC/340P (Labsystems, Finlandia), que realiza medidas de absorbancia en placas múltiples de 96 pocillos, y que dispone de los siguientes filtros: 340, 380, 405, 520, 550, 560 y 690 nm.
- Microscopio óptico (Servicio de Cultivo de Tejidos, SAI, Universidad de Murcia) Nikon Eclipse TE2000-U (Nikon corp., Japón) equipado con contraste de fases y fluorescencia (filtros para ultravioleta (excitación (Ex): 330-380 nm; espejo dicróico (Di): 400 nm; filtro de barrera (Ba): 435 nm), azul (Ex: 470-490 nm; Di: 510 nm; Ba: 435 nm) y verde (Ex: 510-560 nm; Di: 580 nm; Ba: 610 nm)).
- Citómetro de flujo (Servicio de Cultivo de Tejidos, SAI, Universidad de Murcia) modelo FACSort (Becton Dickinson, EEUU), equipado con láser de argón de 15 mW a 488 nm y detectores para fluorescencia a longitudes de onda aproximadas de 525, 575, 620 y 675 nm.
- Irradiador y (Centro Regional de Hemodonación de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia) modelo IBL 437C (Schering Cis, Biointernacional, Alemania) con Cs<sup>137</sup> como isótopo radiactivo, con una actividad de 1700 Ci, que produce una exposición constante de 50 mGy/s.

- Dosímetros de termoluminiscencia formados por cristales de fluoruro de litio con Mg, Cu, P (GR-200r, Conqueror Electronics Technology Co. Ltd, China), proporcionados y analizados por el Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) del Ministerio de Industria y Energía, para determinar las dosis de radiación utilizadas.
- Irradiador de rayos X de la marca YXLON (YXLON International AS, Dinamarca) de 200 kV y 4,5 mA (Servicio de Radioprotección y Residuos, SAI, Universidad de Murcia), que consta de una unidad control modelo SMART 583 E y un tubo de rayos X modelo SMART 200 E.
- Microscopio electrónico (Servicio Universitario de Microscopía, SAI, Universidad de Murcia) Philips Tecnai 12 (FEI Europe B.V., Países Bajos) de 120kv.

## II. ESTUDIOS *IN VIVO*

### 1. ANIMALES

Hemos utilizado ratones Swiss y C57Bl/6 procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia (SAI; nº REGA ES300305440012). Fueron mantenidos en salas cerradas sin ventanas, con fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, temperatura entre 20 y 24°C y nivel de humedad relativa del 55%±10%. Durante el estudio recibieron comida y bebida *ad libitum*.

Todos los animales usados en este estudio han sido mantenidos y utilizados siguiendo la guía establecida por la Unión Europea sobre la protección de los animales utilizados en experimentación (86/609/CEE).



**Figura 15.** Ratones Swiss y C57Bl/6.

## 2. REACTIVOS

En los estudios *in vivo* hemos utilizado los siguientes reactivos:

- El pienso de mantenimiento para ratón A04 procedía de Panlab (España).
- El  $\lambda$ -carragenato se obtuvo de Fluka (Sigma-Aldrich Co., España),
- El DMSO y la eosina se compraron a Sigma Co. (España).

- El estándar de apigenina (98%) se obtuvo de Extrasynthèse (Francia).
- Todos los reactivos de grado HPLC para el estudio cromatográfico (metanol, ácido acético) se adquirieron a Merck (Alemania).
- El etanol absoluto, el formol tamponado neutro al 10% y la hematoxilina procedían, respectivamente, de Guinama (España), Panreac (España) y Analema (España).

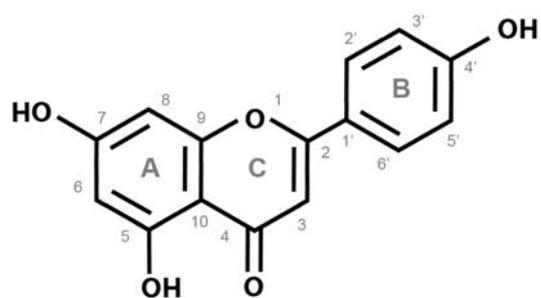
### 3. APARATOS

En el estudio *in vivo* hemos utilizado los siguientes aparatos:

- Lámpara de emisión UV Original Home Solaria de Philips Typl HB 171/A (Philips, Países Bajos), con 4 tubos Philips Cleo 15 w con un espectro de emisión de 300-425 nm y un pico máximo de 354 nm.
- Microscopio electrónico (Servicio Universitario de Microscopía, SAI, Universidad de Murcia) Philips Tecnai 12 (FEI Europe B.V., Países Bajos) de 120kv.
- Homogenizador modelo PT1200B (Polytron, Suiza).
- Cromatógrafo líquido de alto rendimiento (HPLC) HP 1100 (Hewlett-Packard, EEUU) equipado con un detector de UV con red de diodos (*diode array detector*) (Nutrafur S.A.).

### **III. AGENTE: COMPUESTO POLIFENÓLICO**

Para los ensayos, hemos utilizado un derivado hidrosoluble de la apigenina (4', 5, 7 trihidroxiflavona), la apigenina potásica ( $C_{15}H_9O_5K$ ), proporcionado por Nutrafur S.A., (España), cuyas características químicas se recogen en la figura 16.



**Figura 16.** Estructura química del flavonoide apigenina (4', 5, 7 trihidroxiflavona).

## **MÉTODOS**

---



## **I. ESTUDIOS *IN VITRO***

### **1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APIGENINA POTÁSICA SOBRE LA MORFOLOGÍA CELULAR**

#### **Tratamiento.**

Las líneas celulares TRAMP-C1 y PNT2 fueron tratadas con apigenina potásica (100  $\mu$ M) durante 24, 48 y 72 horas para el estudio

mediante microscopía de contraste de fases y durante 48 horas para el estudio ultraestructural con microscopía electrónica de transmisión (TEM).

### **Estudio mediante microscopía de contraste de fases.**

Para este estudio, las células fueron cultivadas a una densidad adecuada (TRAMP-C1: 2000 células por pocillo; PNT2: 3200 células por pocillo) en placas de 96 pocillos. Tras permitir que se adhirieran al sustrato durante 24 horas, se incubaron con la dilución de apigenina potásica recién preparada. Pasadas 24, 48 y 72 horas del comienzo del tratamiento, se observaron las células vivas mediante la técnica de contraste de fases, con un aumento de 100x.

### **Estudio ultraestructural.**

Para el estudio mediante TEM, las células fueron cultivadas en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> a una densidad adecuada (TRAMP-C1: 250 000 células; PNT2: 1x10<sup>6</sup> células), permitiendo que las células crecieran durante 24 horas antes de añadir el tratamiento. Pasadas 48 horas del comienzo del tratamiento, las células fueron recogidas mediante tripsinización y fijadas durante 1 hora en glutaraldehído al 4% a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron embebidas en agar para evitar su pérdida a lo largo del proceso, y post-fijadas en el Servicio de Microscopía (SAI, Universidad de Murcia) con tetróxido de osmio (1%) y teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo (2% en tampón cacodilato). Tras la deshidratación de las muestras en concentraciones crecientes de alcohol, fueron impregnadas en resinas epoxi para la realización de bloques. Realizamos secciones semifinas (150 nm) teñidas con azul de toluidina para seleccionar las zonas de interés. Posteriormente se realizaron

secciones ultrafinas (50-70 nm) que fueron teñidas con citrato de plomo y estudiadas y fotografiadas en un microscopio electrónico Philips Tecnai 12.

## **2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APIGENINA POTÁSICA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR**

### **Tratamientos.**

Las líneas celulares TRAMP-C1 y PNT2 antes descritas fueron tratadas con apigenina potásica a las siguientes concentraciones: 0,78, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 y 200  $\mu$ M, durante 24, 48 y 72 horas.

### **Ensayo de viabilidad celular (MTT).**

Utilizamos la técnica descrita por Carmichael *et al.* (1987a; 1987b) y por Alley *et al.* (1988), adaptada a nuestras condiciones de cultivo (Vicente, 1997), para cuantificar la viabilidad celular.

Las células fueron cultivadas a una densidad adecuada (TRAMP-C1: 2000 células por pocillo; PNT2: 3200 células por pocillo) en placas de 96 pocillos durante 24 horas, tras lo que añadimos los tratamientos recién preparados, realizando 6-12 réplicas por cada tratamiento. Pasadas 24, 48 y 72 horas de comenzar el tratamiento, eliminamos el medio e incubamos las células según las condiciones de cultivo con MTT recién disuelto en medio sin rojo fenol (1 mg/ml) durante 4 horas. Pasado ese tiempo, eliminamos cuidadosamente el medio con el MTT no metabolizado y

añadimos 100 µl de DMSO a cada pocillo para solubilizar el formazano producido por las células viables. Leímos las placas en un espectrofotómetro de placas Multiskan MCC/340P, usando una longitud de onda de 570 nm para la lectura y de 690 nm como longitud de onda de referencia.

### **3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APIGENINA POTÁSICA SOBRE LA APOPTOSIS**

#### **Tratamientos.**

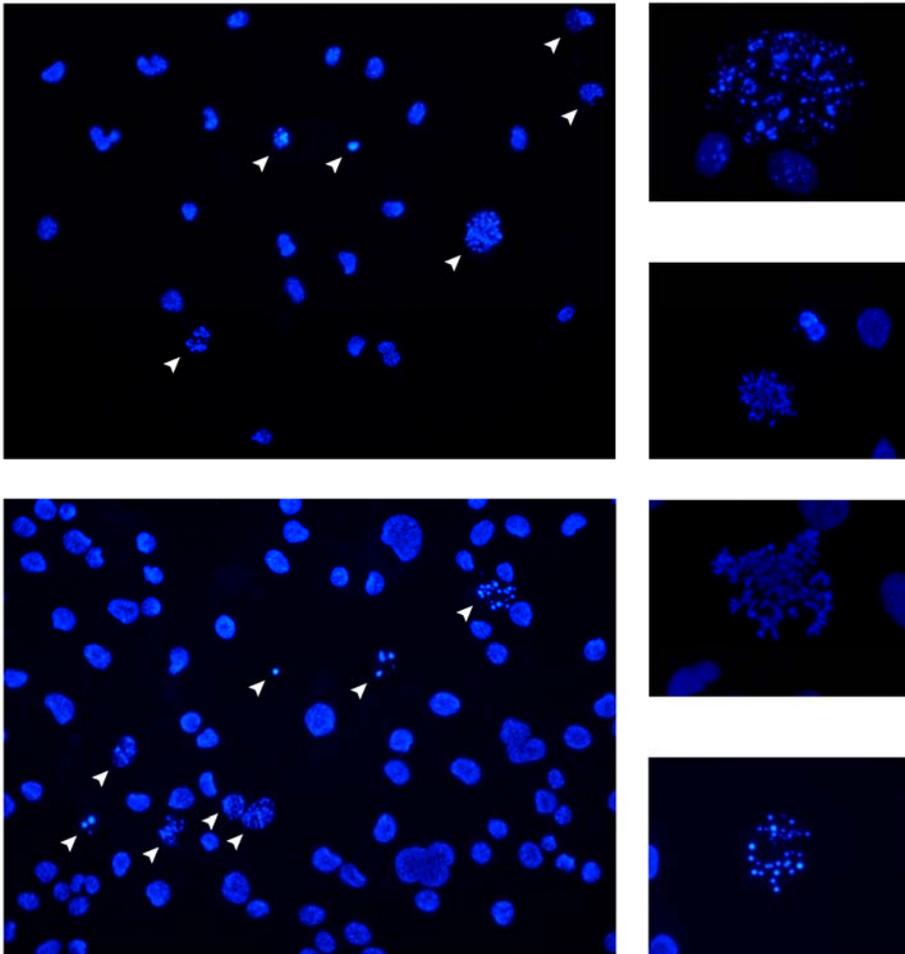
Los cultivos de las líneas celulares TRAMP-C1 y PNT2 fueron tratadas con apigenina potásica a concentraciones de 25, 50, 100 y 200 µM durante 24, 48 y 72 horas.

#### **Medida de apoptosis mediante tinción con Hoechst 33258.**

Cultivamos las células a una densidad adecuada (TRAMP-C1: 12 500 células por pocillo; PNT2: 20 000 células por pocillo) en placas de 24 pocillos. Tras dejar 24 horas para que se adhirieran al sustrato, añadimos los tratamientos por triplicado. Además, añadimos pocillos con células sin tratar (controles negativos de apoptosis) y células tratadas con estaurosporina (controles positivos de apoptosis; 1 µM).

Pasadas 24, 48 o 72 horas, retiramos la mitad del medio de cultivo y añadimos el mismo volumen de fijador de Carnoy recién preparado (mezcla de metanol absoluto y ácido acético glacial en proporción 3:1)

durante 5 minutos. Retiramos el líquido y añadimos de nuevo 1 ml de fijador de Carnoy, dejando que las células se fijen durante otros 10 minutos. Tras ese tiempo, retiramos el fijador y dejamos que los portaobjetos se secan al aire, para, posteriormente, lavar dos veces las células con PBS y añadir 1 ml de Hoechst 33258 (0,2 µg/ml en PBS) recién preparado a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos, protegiendo las células de la luz. Dejamos secar ligeramente el portaobjetos y observamos las células (100x) en un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U (filtro de UV: excitación: 330-380 nm; espejo dicróico: 400; filtro de barrera: 435). Contamos el número de células con condensación nuclear o fragmentación nuclear de, al menos, 300 células en cada pocillo (Fig. 17).



**Figura 17.** Aspecto de los controles positivos de apoptosis tratados con estaurosporina 1  $\mu$ M: células TRAMP-C1 (arriba) y PNT2 (abajo), con detalles de células apoptóticas (derecha). Las puntas de flecha señalan las células apoptóticas (con condensación o fragmentación nuclear) (Hoechst 33258, 100x (izquierda) y 300x (derecha)).

#### **4. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APIGENINA POTÁSICA SOBRE EL CICLO CELULAR**

##### **Tratamiento.**

Los cultivos de la línea celular TRAMP-C1 fueron tratados con apigenina potásica 100  $\mu$ M durante 24, 48 y 72 horas por triplicado.

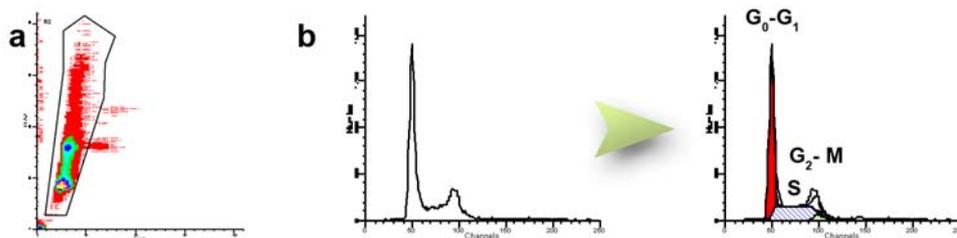
##### **Estudio del ciclo celular mediante citometría de flujo.**

Cultivamos la línea celular a una densidad adecuada en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (TRAMP-C1: 150 000 células), permitiendo que las células crecieran durante 24 horas antes de añadir los tratamientos. Tras 24, 48 y 72 de la adición de la apigenina potásica, las células, con una confluencia menor del 80%, fueron recogidas mediante tripsinización (ver condiciones específicas en la página 96) y centrifugadas a 214 g durante 10 minutos. Las células fueron resuspendidas en 200  $\mu$ l de PBS a una densidad celular de 0,5-1 x 10<sup>6</sup> células/ml. Fueron fijadas con etanol (70% en PBS) a 4°C durante 30 minutos y, después de centrifugarlas 10 minutos a 214 g, se resuspendieron en 800  $\mu$ l de PBS. Posteriormente, se incubaron a 37°C durante 30 minutos con 100  $\mu$ l de yoduro de propidio (concentración final de 40  $\mu$ g/ml) y 100  $\mu$ l de RNasa (concentración final de 100  $\mu$ g/ml).

El contenido de DNA de las células teñidas fue estudiado mediante un citómetro de flujo modelo FACSort utilizando el láser de argón de 488 nm para tomar datos de FSC (*forward scatter*), SSC (*side scatter*) y de intensidad de fluorescencia del yoduro de propidio (PLA-2) de 20 000 eventos.

Los datos fueron analizados mediante el software CELLQUEST y el programa MODFIT (Becton Dickinson, EEUU). Previamente, se representaron los datos en una gráfica con el área del pico (PLA-2 A) frente a la anchura del pico (PLA-2 W) lo que permitió seleccionar una región que contuviera, únicamente, las células que pasaron por el detector aisladas y evitar, así, las interferencias que produciría la inclusión de grupos de dos células (dobletes) (Fig. 18a).

Esta técnica, basada en la correlación entre la intensidad de fluorescencia de un fluorocromo que se une al DNA (yoduro de propidio) y el contenido de DNA de la célula, permite distinguir las células que se encuentran en las fases  $G_0$ - $G_1$  de las que, tras la duplicación del DNA, han alcanzado las fases  $G_2$ -M. Además, identifica la población de células que está duplicando su DNA durante la fase S (Fig. 18b).



**Figura 18.** Análisis de los datos de contenido de DNA. a) Selección de regiones para evitar dobletes. b) Histograma y análisis del mismo mediante la aplicación de modelos matemáticos con el programa MODFIT.

## **5. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APIGENINA POTÁSICA SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR**

### **Tratamientos.**

Los cultivos de las líneas celulares TRAMP-C1 y PNT2 fueron tratados con 25, 50 y 100  $\mu$ M de apigenina potásica.

### **Ensayo de migración celular, *wound healing assay*.**

Para este ensayo, cultivamos las células a una densidad adecuada en placas de 6 pocillos hasta que alcanzaron la confluencia. En ese momento, despejamos de células varias zonas (*wounds*) paralelas utilizando una punta amarilla de pipeta estéril, cambiamos el medio de cultivo para retirar las células despegadas y administramos los tratamientos por duplicado; también se realizaron ensayos con la incubación con el flavonoide desde 12 horas antes del comienzo del ensayo. Tomamos imágenes de las zonas despejadas, teniendo como referencia marcas realizadas en el fondo del pocillo con rotulador permanente, tras despejar las zonas (0 horas) y cada 3 horas; para ello utilizamos un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U.

### **Análisis cuantitativo de la distancia de migración.**

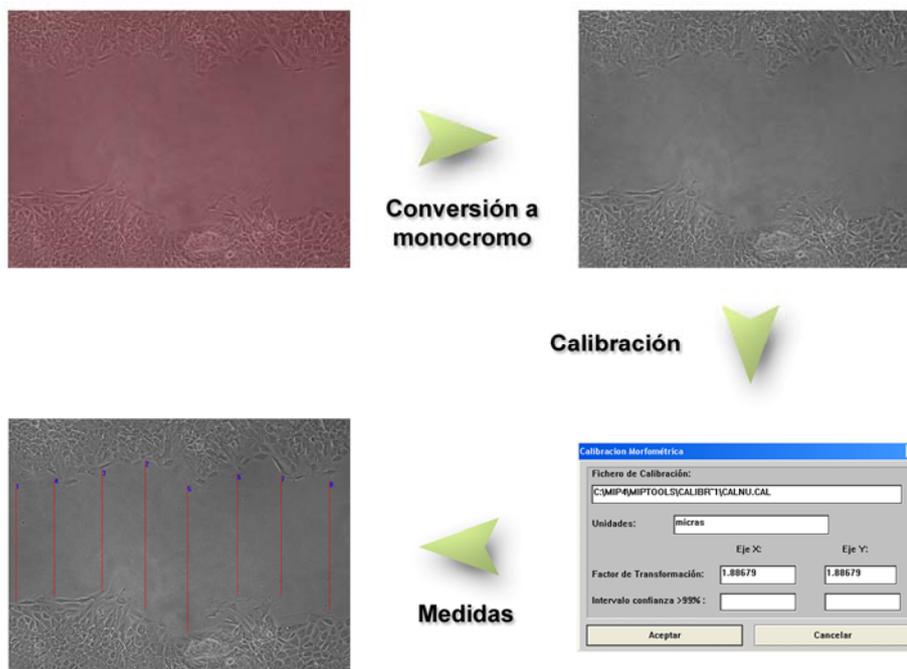
Evaluamos la distancia recorrida por las células en cada fotografía mediante técnicas de análisis de imagen (Sistema MIP-4, Digital Image System, Barcelona; Servicio de Análisis de Imagen, SAI, Universidad de Murcia). Para ello, todas las imágenes fueron transformadas a escala de

grises y calibradas (X: 1,88679  $\mu\text{m}$ ; Y: 1,88679  $\mu\text{m}$ ), tras lo que se tomaron ocho medidas del espacio libre de células, calculando después el valor medio (Fig. 19). Determinamos la distancia de migración comparando el ancho del espacio libre en cada momento con respecto a la medida de esa misma zona a tiempo cero, según la siguiente fórmula (Valster, 2005):

$$\text{Distancia de migración} = (A_0 / 2) - (A_t / 2)$$

**A<sub>0</sub>**: Ancho del espacio libre de células inicial

**A<sub>t</sub>**: ancho del espacio libre de células a tiempo t



**Figura 19.** Medida del espacio libre de células mediante técnicas de análisis de imagen.

## **6. ESTUDIO DEL EFECTO GENOPROTECTOR DE LA APIGENINA POTÁSICA**

### **Muestras de sangre.**

La sangre se obtuvo de donantes voluntarios no fumadores y supuestamente sanos, a los que se les solicitó su autorización expresa para el uso de sus muestras en el estudio. Hubo dos donantes (dos mujeres; 26-28 años) para el estudio de los efectos del compuesto. La sangre fue heparinizada (heparina sódica, 5%) y alicuotada en tubos de 2 ml para el estudio.

### **Tratamientos.**

Las muestras de sangre periférica fueron tratadas con apigenina potásica (25  $\mu$ M) previa o posteriormente a la exposición a radiación y (2 Gy). Para el estudio de los efectos de la apigenina potásica contamos con controles no irradiados ni tratados, controles solo irradiados y controles únicamente tratados con apigenina, además de con muestras tratadas antes (15 minutos) y después (5 minutos) de la irradiación (2 Gy).

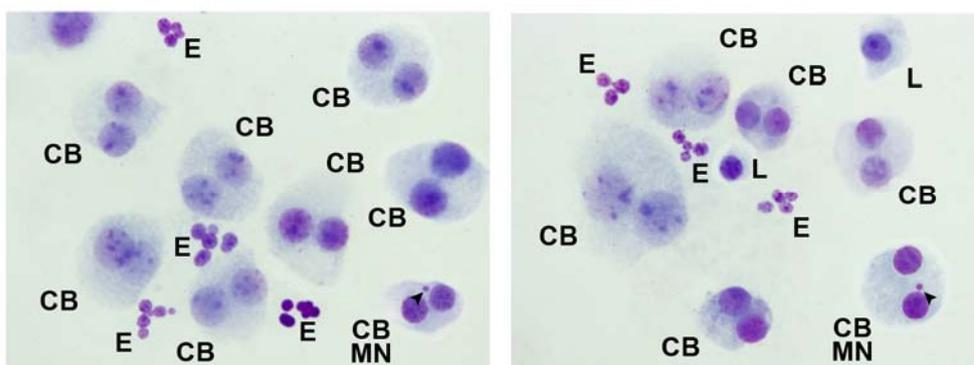
### **Test de micronúcleos.**

Hemos utilizado la técnica según Fenech *et al.* (1985; 1993), adaptada posteriormente por la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA) (2001).

Brevemente, cultivamos 1 ml de la sangre tratada en medio de cultivo F-10 suplementado con SBF (15%), fitohemaglutinina (1,6%) y penicilina y estreptomina (1%) a 37°C, en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

Tras 48 horas, añadimos citochalasin B (3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) para bloquear la división celular. Pasadas 24 horas, tratamos los linfocitos con una solución hipotónica (KCl, 75 mM) durante 3 minutos y los fijamos con fijador de Carnoy. Preparamos extensiones secadas al aire y las teñimos con la tinción de May-Grunwald Giemsa.

Realizamos el conteo de los micronúcleos (Fig. 20) en, al menos, 500 células binucleadas bloqueadas en la citoquinesis (células CB) utilizando un aumento de 400x para revisar las preparaciones y de 1000x para confirmar la presencia de micronúcleos. Los micronúcleos han sido identificados según los criterios de Almassy *et al.* (1987) y Fenech *et al.* (2003): deben tener la misma estructura que el núcleo principal y ser menores (menos de la mitad del tamaño del núcleo principal o dos veces la longitud normal de un cromosoma); deben ser redondos o esféricos, estar claramente separados del núcleo principal, y no mostrar refractilidad a la luz; deben contarse solamente en las células con citoplasma conservado y su frecuencia de aparición debe seguir la cinética de la división celular.



**Figura 20.** Aspecto de los linfocitos cultivados para el test de micronúcleos. CB: célula binucleada; E: eritrocito; L: linfocito; MN: célula binucleada con micronúcleo. Las flechas señalan los micronúcleos (May-Grunwald Giemsa, 600x).

A partir de los datos del recuento de micronúcleos, se calcularon dos parámetros relacionados con la capacidad protectora de un radioprotector, tanto para los valores de preirradiación como de postirradiación: el factor de protección (FP) y el factor reductor de dosis (FRD), tal y como propusieron Sarma *et al.* (1993) y Travis *et al.* (1979), respectivamente, cuyas fórmulas son:

$$FP = \frac{F_c - F_T}{F_c} \times 100$$

**F<sub>c</sub>**: Frecuencia de micronúcleos en las muestras irradiadas

**F<sub>T</sub>**: Frecuencia de micronúcleos en las muestras irradiadas y tratadas

$$FRD = \frac{\text{Dosis con RP para n}^\circ \text{ MN}}{\text{Dosis sin RP para n}^\circ \text{ MN}}$$

**Dosis con RP para n<sup>o</sup> MN**: Dosis de radiación necesaria en presencia del radioprotector (RP) para observar un número dado de micronúcleos (MN)

**Dosis sin RP para n<sup>o</sup> MN**: Dosis de radiación necesaria para observar un número dado de micronúcleos (MN)

## 7. ESTUDIO DEL EFECTO COMBINADO DE LA APIGENINA POTÁSICA Y LA RADIACIÓN IONIZANTE SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

### Tratamientos.

Los cultivos de las líneas celulares TRAMP-C1 y PNT2 fueron tratados con apigenina potásica a las concentraciones de 20 y 40 µM y, 15 minutos después, irradiados en un irradiador de rayos X YXLON con las siguientes condiciones: 4,5 mA, 120 kV y 36 cm de distancia foco-objeto y

un rendimiento de 1,48 cGy/s. Se administraron dosis de 0, 4, 6, 8 y 10 Gy.

### Ensayo de viabilidad celular (MTT).

Las células fueron cultivadas a una densidad adecuada en placas de 96 pocillos durante 24 horas, tras lo que añadimos los tratamientos recién preparados antes de la irradiación, realizando 6 réplicas por cada tratamiento. Pasadas 24 y 48 horas de la exposición a la radiación ionizante, utilizamos la técnica anteriormente descrita (pág. 109) para cuantificar la viabilidad celular de los cultivos.

A partir de los datos de supervivencia celular, se calcularon los parámetros ya descritos (pág. 119) para la combinación de apigenina potásica (20 y 40  $\mu\text{M}$ ) con la mayor dosis de radiación (10 Gy): el factor de protección (FP) y el factor reductor de dosis (FRD), cuyas fórmulas adaptadas son:

$$\text{FP} = \frac{M_c - M_T}{M_c} \times 100$$

**$M_c$ :** Muerte celular en las muestras irradiadas

**$M_T$ :** Muerte celular en las muestras irradiadas y tratadas

$$\text{FRD} = \frac{\text{Dosis con RP para \% supervivencia}}{\text{Dosis sin RP para \% supervivencia}}$$

**Dosis con RP para % de supervivencia:** Dosis de radiación necesaria en presencia del radioprotector (RP) para obtener un porcentaje de supervivencia dado

**Dosis sin RP para % de supervivencia:** Dosis de radiación necesaria para obtener un porcentaje de supervivencia dado

## 8. MÉTODO ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos de los ensayos de viabilidad celular, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para dos factores ortogonales (tiempo y concentración), realizando una regresión lineal para el cálculo de los valores de IC50 y 90. Los datos de los experimentos de apoptosis, del análisis del ciclo celular y de los estudios con radiación ionizante (test de micronúcleos y ensayos de viabilidad celular) fueron analizados mediante un análisis de varianza, mientras que en el caso de los ensayos de migración se realizó un análisis de varianza de medidas repetidas, correspondiente a un diseño jerarquizado con dos factores principales (tratamiento y tiempo) y las réplicas como factor anidado dentro de los tratamientos. Los análisis se complementaron con el contraste de igualdad de medias y con el análisis con comparaciones entre pares de medias mediante el test de la mínima diferencia significativa (LSD).

Los valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## **II. ESTUDIOS *IN VIVO***

### **1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA APIGENINA POTÁSICA SOBRE LA INFLAMACIÓN AGUDA**

#### **Animales.**

Hemos utilizado 45 ratones Swiss machos de entre 8 y 10 semanas de edad y  $34,07 \pm 5.87$  g de peso al comienzo del experimento, procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia.

### **Modelo de edema en pata de ratón inducido por carragenato.**

Hemos utilizado el modelo desarrollado por Winter *et al.* (1962) para estudiar los efectos de la apigenina potásica sobre la inflamación aguda inducida por carragenato.

Los animales fueron divididos en 3 grupos de 15 ratones:

- Grupo I (control). Tratado con 0,4 ml de suero salino estéril (0,9% de NaCl).
- Grupo II. Tratado con 50 mg/kg de apigenina potásica disuelta en suero salino estéril.
- Grupo III. Tratado con 100 mg/kg de apigenina potásica disuelta en suero salino estéril.

Los animales recibieron 0,4 ml del tratamiento por vía intraperitoneal 1 hora antes de provocar la inflamación.

La inflamación fue provocada mediante la inyección de 50  $\mu$ l de  $\lambda$ -carragenato recién disuelto en suero salino estéril (1%) en la almohadilla plantar de la pata trasera derecha de los animales (Fig. 23).



**Figura 23.** Inyección de  $\lambda$ -carragenato (1%) en la almohadilla plantar de la pata trasera derecha de ratones Swiss.

Medimos los tres diámetros principales de la pata (Fig. 24) por triplicado utilizando un calibre digital (Proinsa, España) antes y 1, 5, 24 y 48 horas después de causar la inflamación. Con estas medidas calculamos el volumen de la pata, con el cual calculamos el porcentaje de edema (E) y el porcentaje de inhibición (I) según las fórmulas siguientes (Winter, 1962):

$$E = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

$V_t$  : Volumen en el tiempo t

$V_0$  : Volumen antes de la inflamación

$$I = \frac{E_C - E_T}{E_C} \times 100$$

$E_C$  : Porcentaje de edema del grupo control

$E_T$  : Porcentaje de edema del grupo tratado



**Figura 24.** Diámetros principales de la pata.

Sacrificamos grupos de 5 animales a las 5, 24 y 48 horas para el posterior análisis histológico de las almohadillas de las patas inflamadas y no inflamadas.

#### **Método anatomopatológico.**

Las almohadillas plantares de las patas traseras izquierda (control) y derecha (inyectada con carragenato) fueron fijadas en formol neutro tamponado al 10% e incluidas en parafina por el método habitual. Se realizaron secciones de 5  $\mu$ m, que fueron teñidas con hematoxilina-eosina.

Se realizó el estudio de 5 secciones de cada muestra, evaluando el grado de inflamación con 0 (ausencia de inflamación), 1 (leve; edema leve y pocos infiltrados inflamatorios en la dermis), 2 (moderada; edema e infiltrados inflamatorios en la dermis, que no penetran en el músculo), 3 (severa; edema severo y gran cantidad de infiltrados inflamatorios que penetran en el músculo).

## 2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APIGENINA POTÁSICA SOBRE LOS TUMORES TRASPLANTABLES DE PRÓSTATA TRAMP-C1

### **Animales.**

Para este modelo hemos utilizado 96 ratones macho C57Bl/6 de entre 10 y 12 semanas de edad y  $19,13 \pm 2,31$  g de peso al comienzo del experimento, procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio (SAI; nº REGA ES300305440012) de la Universidad de Murcia.

**Modelo I: inoculación de tumores.** En un primer modelo intentamos establecer tumores primarios de la línea celular TRAMP-C1 en 80 ratones sinegéticos C57Bl/6 por inoculación de distintas cantidades ( $0,5-3 \times 10^6$ ) de células de la línea celular TRAMP-C1.

Para ello, la densidad celular de cultivos de la línea celular TRAMP-C1 con una viabilidad mayor del 99% fue ajustada a la concentración necesaria para la implantación (de  $2,5 \times 10^6$  a  $15 \times 10^6$  células/ml) en medio de cultivo, tras lo que inoculamos 200  $\mu$ l de la suspensión celular subcutáneamente en la región inguinal derecha de los animales (Fig. 21).

El desarrollo de tumores en los animales inoculados resultó muy irregular: solamente un pequeño porcentaje (aproximadamente, el 30%) de los animales presentaron tumores (Fig. 21), porcentaje que se mantuvo constante a pesar de aumentar el número de células inoculadas. Además, el periodo de tiempo transcurrido desde la inoculación hasta que el tumor era palpable era muy variable y también independiente del número de células implantadas, desde uno a varios meses. Por ello, decidimos utilizar

uno de los tumores desarrollados para implantar fragmentos en ratones sanos (modelo II).

**Modelo II: trasplante de tumores.** En este modelo, utilizamos uno de los tumores obtenidos en el modelo anterior para implantar pequeños fragmentos cilíndricos en el lomo de ratones C57Bl/6.

Para ello, tras el sacrificio del animal con el tumor y el lavado de este con suero salino estéril, tomamos cilindros de 2x4 mm que fueron implantados subcutáneamente en la zona dorsal derecha de 16 ratones C57Bl/6 sanos sedados con ketamina + xilacina (5 + 10 mg/ml) a través de una pequeña incisión en la piel. Esta intervención no requirió sutura y la recuperación de los animales fue rápida.

Pasados 21 días, todos los animales habían desarrollado tumores palpables (Fig. 22). Los animales fueron separados en dos grupos (n=8):

- Grupo I (control). Ratones tratados con suero salino estéril s.c.
- Grupo II. Ratones tratados con apigenina potásica s.c. 5 días/semana (1,10 mg/kg/día, para intentar lograr una concentración plasmática de 50  $\mu$ M).

Se realizó el seguimiento de los animales para el estudio de su supervivencia.



**Figura 21.** Inoculación de las células TRAMP-C1 en la región inguinal de ratones C57Bl/6 (izquierda) y aspecto macroscópico del tumor primario desarrollado (derecha).



**Figura 22.** Aspecto macroscópico de un ratón trasplantado con un tumor TRAMP-C1.

### **3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APIGENINA POTÁSICA SOBRE EL FOTOENVEJECIMIENTO**

#### **Animales.**

Para este estudio, hemos utilizado 30 ratones Swiss machos de 10-12 semanas de edad y un peso medio de  $40,72 \pm 2,34$  g al comienzo del experimento.

Los animales fueron separados en 2 grupos experimentales de 15 animales cada uno:

1. Grupo I. Animales control expuestos a radiación UV.
2. Grupo II. Animales irradiados con UV y tratados con apigenina potásica. Estos animales recibieron el compuesto en la comida (pienso de mantenimiento para ratón A04 triturado) desde 10 días antes de comenzar con la aplicación de radiación UV. Considerando la biodisponibilidad y la toxicidad del compuesto (112 mM), la dosis de ingesta se estableció por comparación con la dosis máxima farmacéutica-nutracéutica, 150  $\mu$ M, para ello, cada animal debía tomar 1,54 mg de apigenina potásica diarios (37,82 mg/kg/día). La dosis se ajustó semanalmente en función de la cantidad de pienso comido y el peso de los animales.

#### **Procedimiento experimental.**

Para la irradiación con radiación UV, utilizamos el modelo de lámpara Original Home Solaria de Philips. Los animales, previamente

rasurados y separados individualmente en cajas, fueron colocados bajo la lámpara a una distancia de 20 cm entre el foco y la piel. Los animales recibieron 3 sesiones semanales de 1 hora de duración en días alternos. La energía absorbida en cada sesión, según las especificaciones del fabricante, fue de 8,74 J/cm<sup>2</sup>.

Sacrificamos 5 animales de cada grupo tras 25, 50 y 100 sesiones, tomando muestras de sangre, hígado y cerebro.

### **Método anatomopatológico.**

Muestras de piel y vísceras fueron fijadas en formol neutro tamponado al 10% e incluidas en parafina por el método habitual. Se realizaron secciones de 5 µm, que fueron teñidas con hematoxilina-eosina.

Se realizó el estudio de 5 secciones de cada muestra de piel, evaluando distintos parámetros histológicos cutáneos: atrofia o engrosamiento (acantosis) de la epidermis; hiperplasia de las células basales epidérmicas; displasia (grado I o leve, grado II o moderada, grado III o severa); pérdida de polaridad; fibrosis de la dermis papilar; elastosis (grado I o leve, grado II o moderada, grado III o severa); alteraciones de los vasos y de las glándulas; presencia de infiltrados. Cada parámetro se valoró con 0 (ausencia), 1 (presencia en menos de 1/3 del tejido estudiado), 2 (presencia en menos de 2/3 del tejido estudiado), 3 (presencia en más de 2/3 del tejido estudiado).

### **Estudio ultraestructural.**

Para el estudio mediante microscopía electrónica de transmisión, muestras de piel de 1 mm<sup>3</sup> de animales de ambos grupos fueron fijadas en formaldehído/glutaraldehído (Karnovsky, 1965) durante 5 horas. Posteriormente, las muestras fueron post-fijadas en el Servicio de Microscopía (SAI, Universidad de Murcia) con tetróxido de osmio (1%) y teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo (2% en tampón cacodilato). Tras la deshidratación de las muestras en concentraciones crecientes de etanol, fueron impregnadas en resinas epoxi para la realización de bloques. Realizamos secciones semifinas (150 nm) teñidas con azul de toluidina para seleccionar las zonas de interés. Posteriormente se realizaron secciones ultrafinas (50-70 nm) que fueron teñidas con citrato de plomo y estudiadas y fotografiadas en un microscopio electrónico Philips Tecnai 12.

### **Estudio cromatográfico del contenido en apigenina potásica de distintos tejidos.**

Realizamos el estudio cromatográfico del contenido en apigenina potásica de sangre, hígado y cerebro. Para ello, los tejidos fueron rápidamente congelados en nitrógeno líquido tras la extracción; la sangre fue centrifugada a 800 rpm durante 10 minutos para separar el plasma. Los tejidos y el plasma se mantuvieron congelados a -80°C hasta el momento de su utilización.

Los tejidos, tras ser descongelados a 4°C durante la noche, se homogeneizaron (Polytron PT1200B) usando DMSO; tras centrifugar (1000 rpm, 10 minutos), fueron congelados a -80°C hasta su estudio.

Para la identificación y cuantificación de la apigenina potásica presente en las muestras, utilizamos el método descrito por Del Baño *et al.* (2003; 2004). Utilizamos una columna analítica C18 LiChrospher 100 (longitud: 250 mm; diámetro interior: 4 mm; espesor de la fase estacionaria 5 µm; Merck, Alemania) como fase estacionaria, termostata a 30°C; la velocidad de flujo de la fase móvil fue de 1 ml/min, y la elución fue controlada a 280 nm.

Las fases móviles utilizadas para el análisis cromatográfico fueron agua con un 1% de ácido acético (A) y metanol (B). El paso de las fases móviles (45 minutos) se reguló de la siguiente forma:

- Durante los primeros 5 minutos, utilizamos un paso isocrático del 50% de B.
- En los siguientes 25 minutos, programamos un gradiente lineal hasta el 100% de B, que se mantuvo durante 10 minutos más.
- En los últimos 5 minutos, se volvió a las condiciones iniciales para el siguiente análisis.

La apigenina se identificó por comparación de su tiempo de retención con el patrón correspondiente, así como por su espectro de absorción UV, obtenido mediante el detector con red de diodos.

#### **4. MÉTODO ESTADÍSTICO**

Para el análisis de los datos del estudio sobre inflamación aguda, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) doble. Las diferencias entre la

supervivencia de los dos grupos del modelo de tumores trasplantables de próstata se analizaron mediante el test de la T de Student. Todos los tests fueron complementados con el contraste de igualdad de medias y con el análisis con comparaciones entre pares de medias mediante el test de la mínima diferencia significativa (LSD).

Los valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.



## **RESULTADOS**

---



## **1. EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LA APIGENINA POTÁSICA**

Macroscópicamente, la apigenina potásica provocó una reducción visible del aumento de volumen de las patas tras la inyección de carragenato, como se observa en la Fig. 25.

Se encontraron diferencias significativas al comparar tanto los valores medios del grupo control con los de los grupos tratados con apigenina potásica (50 mg/kg y 100 mg/kg) ( $p < 0,001$  en ambos casos), como los valores medios del grupo tratado con 50 mg/kg con los del que recibió la dosis mayor del flavonoide (100 mg/kg) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 25.** Aspecto macroscópico de las patas inyectadas (a, c) y no inyectadas (b, d) con carragenato de animales del grupo control (a, b) y del tratado con apigenina potásica (100 mg/kg) (c, d), 24 horas después de la inyección de carragenato.

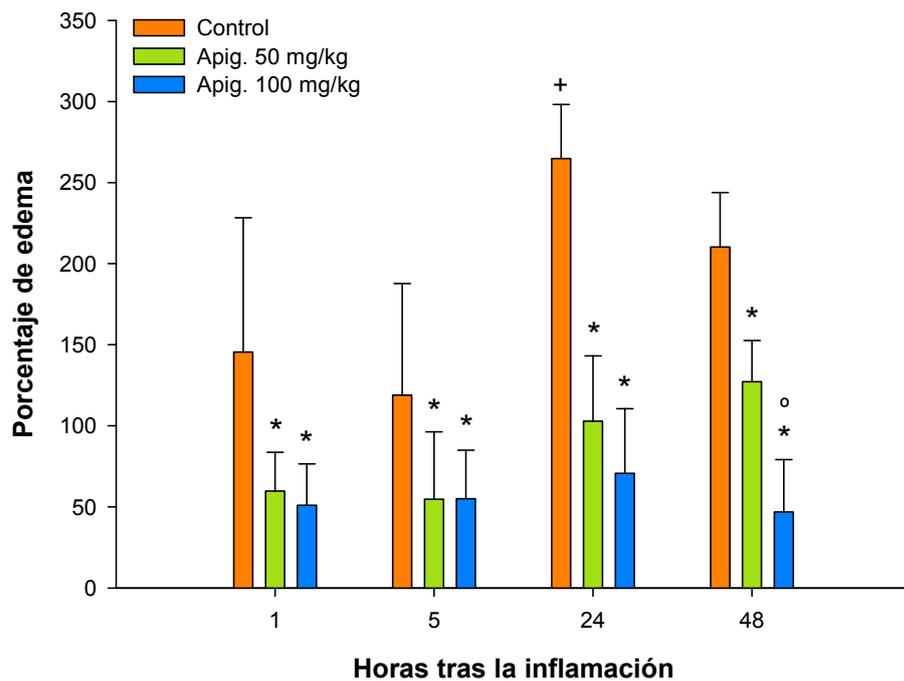
Los animales del grupo control, tratados con el vehículo, suero salino estéril, mostraron los mayores valores del porcentaje de edema, indicando, por tanto, la mayor respuesta inflamatoria. El volumen de la pata inyectada con carragenato mostró dos máximos: uno con un aumento de 145,46% una hora después de provocar la inflamación, y otro pico con un aumento de 264,75%, 24 horas después de la inyección de carragenato, que resultó significativo respecto a la medida anterior (5 horas) ( $p < 0,05$ ) (Tabla 5, Fig. 26).

En el grupo tratado con la menor concentración de apigenina potásica (50 mg/kg), aunque no encontramos diferencias significativas al comparar el porcentaje de edema medido a las 5, 24 y 48 horas respecto a la medida inmediatamente anterior, observamos una tendencia a la respuesta bifásica ya mencionada: un máximo tras 1 hora de la inyección de carragenato (59,91%) y otro a las 48 horas (127,2%). En este grupo el porcentaje de edema se redujo aproximadamente a la mitad respecto al grupo control, siendo significativa la reducción en todas las medidas (Tabla 5, Fig. 26). El porcentaje de inhibición de este grupo fue máximo a las 24 horas (61,12%) (Tabla 6, Fig. 27).

El tratamiento con 100 mg/kg de apigenina potásica dio los mejores resultados. Al igual que en el grupo anterior, solo existía una tendencia no significativa a mostrar una respuesta bifásica, con dos máximos del porcentaje de edema a las 5 (55,06%) y 24 horas (70,64%) tras la inyección de carragenato; destacó que el porcentaje de edema a las 48 horas fue incluso menor que 1 hora después de provocar la inflamación. En estos animales, el porcentaje de edema se redujo significativamente respecto al control en todas las medidas y, a pesar de que disminuyó respecto al grupo que recibió 50 mg/kg de apigenina potásica, la reducción únicamente fue significativa a las 48 horas (Tabla 5, Fig. 26). El porcentaje de inhibición de este grupo fue máximo a las 48 horas (77,73%) (Tabla 6, Fig. 27).

	1 hora	5 horas	24 horas	48 horas
<b>Control</b>	145,46 ± 82,82	118,85 ± 68,86	264,75 ± 33,43	210,24 ± 33,64
<b>Apig. (50 mg/kg)</b>	59,81 ± 23,89	54,78 ± 41,47	102,92 ± 40,24	127,20 ± 25,35
<b>Apig. (100 mg/kg)</b>	51,04 ± 25,51	55,06 ± 29,97	70,64 ± 39,91	46,83 ± 32,31

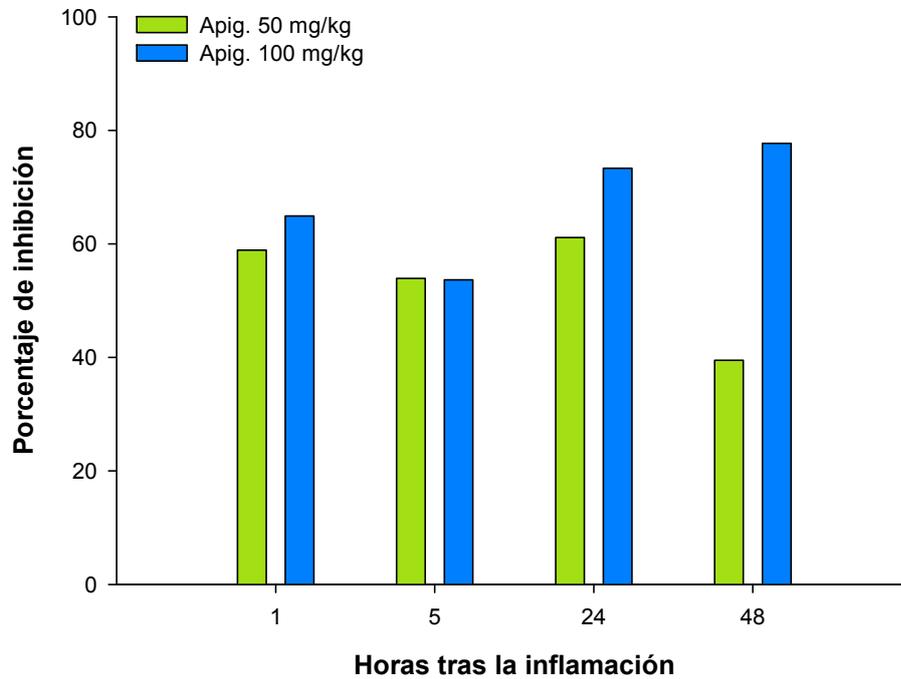
**Tabla 5.** Porcentaje de edema en los 3 grupos (media ± desviación estándar). *Apig.*: apigenina potásica.



**Figura 26.** Comparación del porcentaje de edema en los tres grupos; cada valor es la media de las medidas de 5-15 animales. Barra de error: desviación estándar. \*: significación estadística respecto al control no tratado ( $p < 0,05$ ); †: significación estadística respecto a la medida anterior del mismo grupo ( $p < 0,05$ ); °: significación estadística respecto al grupo tratado con apigenina potásica, 50 mg/kg. *Apig.*: apigenina potásica.

	1 hora	5 horas	24 horas	48 horas
Apig. (50 mg/kg)	58,88	53,91	61,12	39,50
Apig. (100 mg/kg)	64,91	53,67	73,32	77,73

**Tabla 6.** Porcentaje de inhibición en los grupos tratados. Apig.: apigenina potásica.



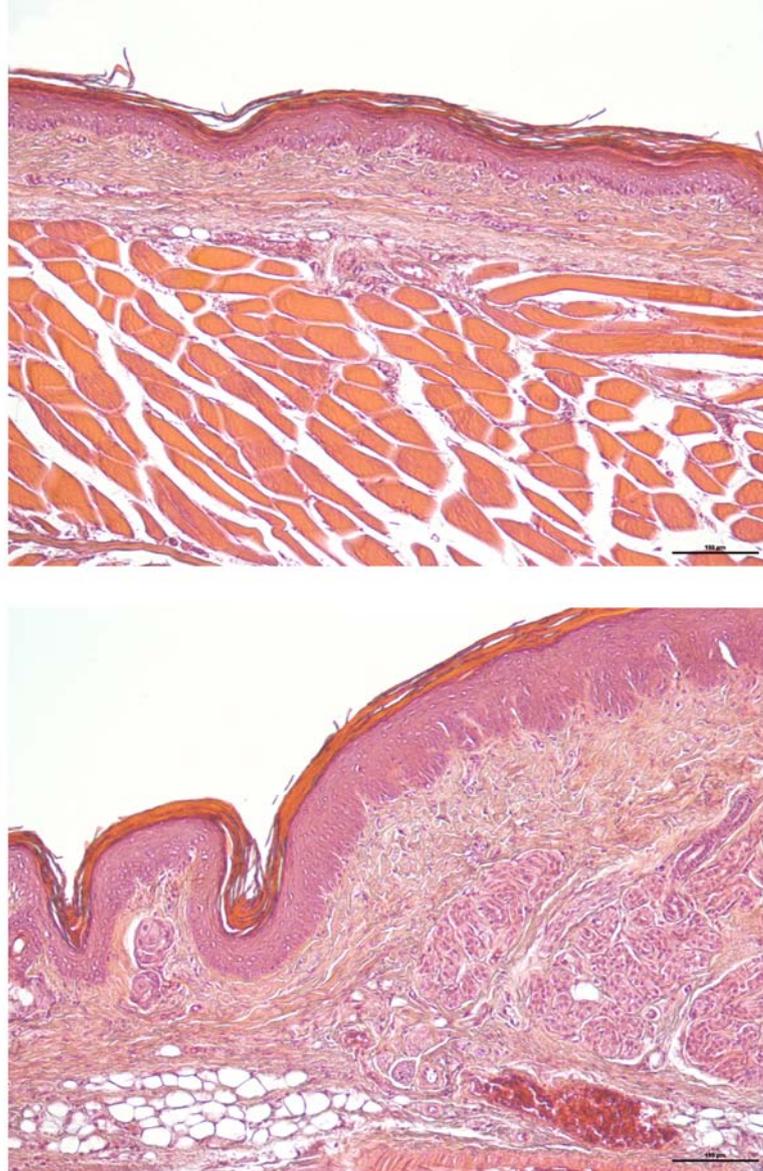
**Figura 27.** Comparación del porcentaje de inhibición entre los grupos tratados. Apig.: apigenina potásica.

Microscópicamente, la inyección de carragenato provocó edema e infiltración de células inflamatorias. La intensidad de la respuesta inflamatoria varió a lo largo del experimento y según el tratamiento, de forma que las muestras presentaron todos los grados de inflamación, desde la ausencia hasta la inflamación severa (Figs. 28-31)

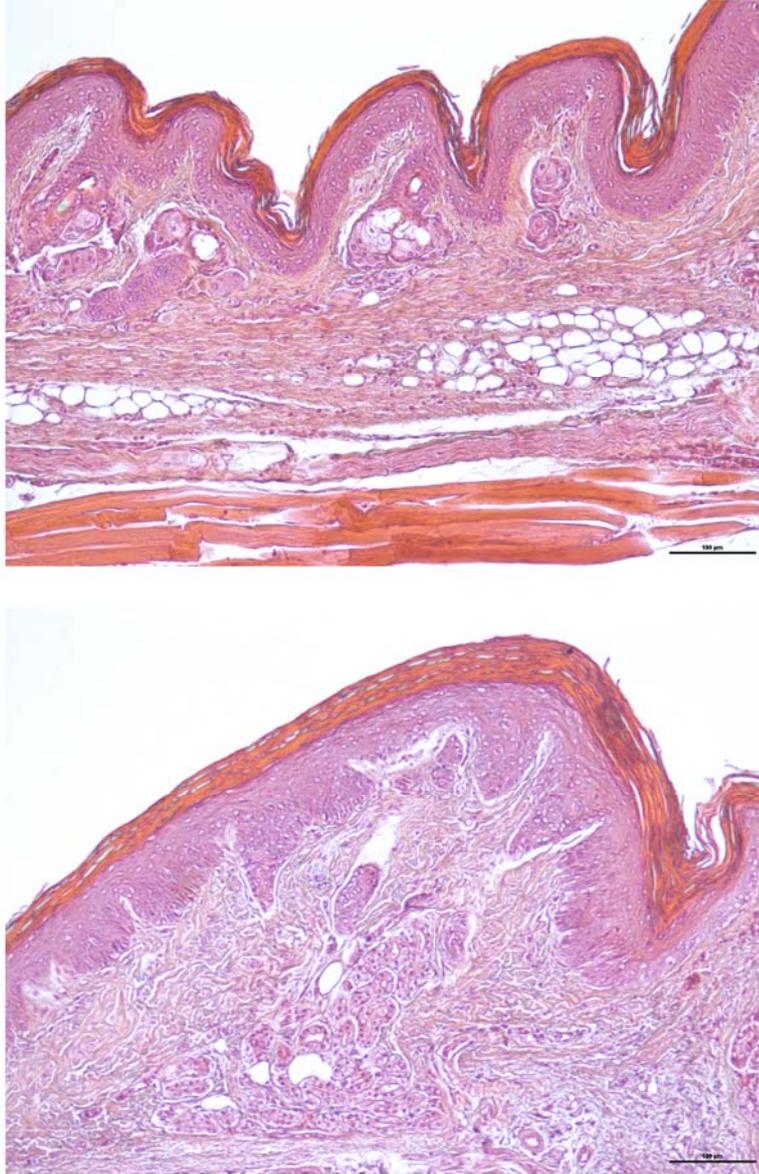
Tras 5 horas de la inyección del carragenato, las muestras del grupo control mostraban inflamación entre leve y moderada, que pasó a ser severa a las 24 horas, coincidiendo con el porcentaje máximo de edema. Las muestras de 48 horas presentaban inflamación moderada-severa.

En el grupo tratado con la menor dosis de apigenina potásica (50 mg/kg), la respuesta inflamatoria fue menos intensa que en el grupo control. Tras 5 horas de la inyección de carragenato, las almohadillas plantares no presentaban inflamación, o, en ocasiones, inflamación leve. En las muestras tomadas a las 24 horas, se observó, fundamentalmente, inflamación moderada, aunque algunas muestras eran de grado leve o no presentaban inflamación. De forma similar, en las muestras de 48 horas, el grado predominante era la inflamación moderada, aunque también había muestras con inflamación leve; a las 48 horas todas las muestras presentaron inflamación.

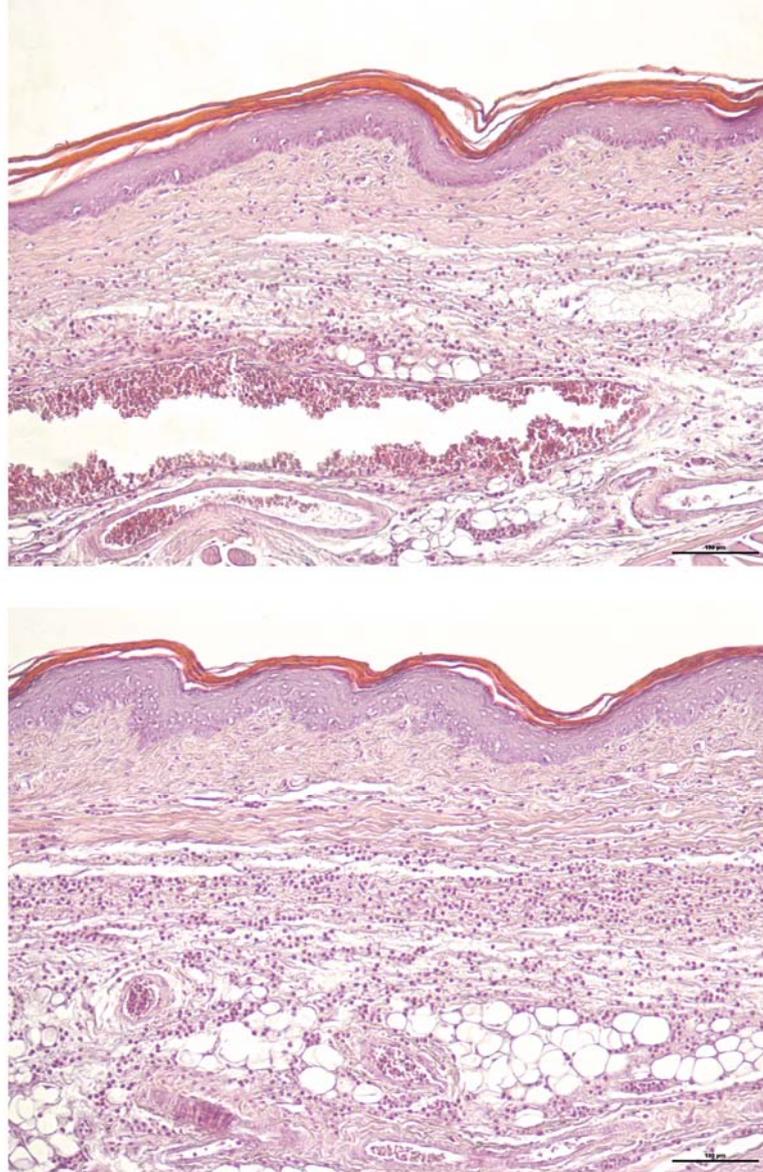
El grupo tratado con 100 mg/kg de apigenina potásica presentó los mejores resultados. En las muestras tomadas tras 5 horas desde la administración del carragenato, la respuesta inflamatoria no era observable o, en muy pocos casos, leve, de forma parecida a lo ocurrido con la dosis menor de flavonoide. Sin embargo, a las 24 horas la mayoría de muestras estudiadas presentaban inflamación leve, mientras que a las 48 horas se observó inflamación leve-moderada.



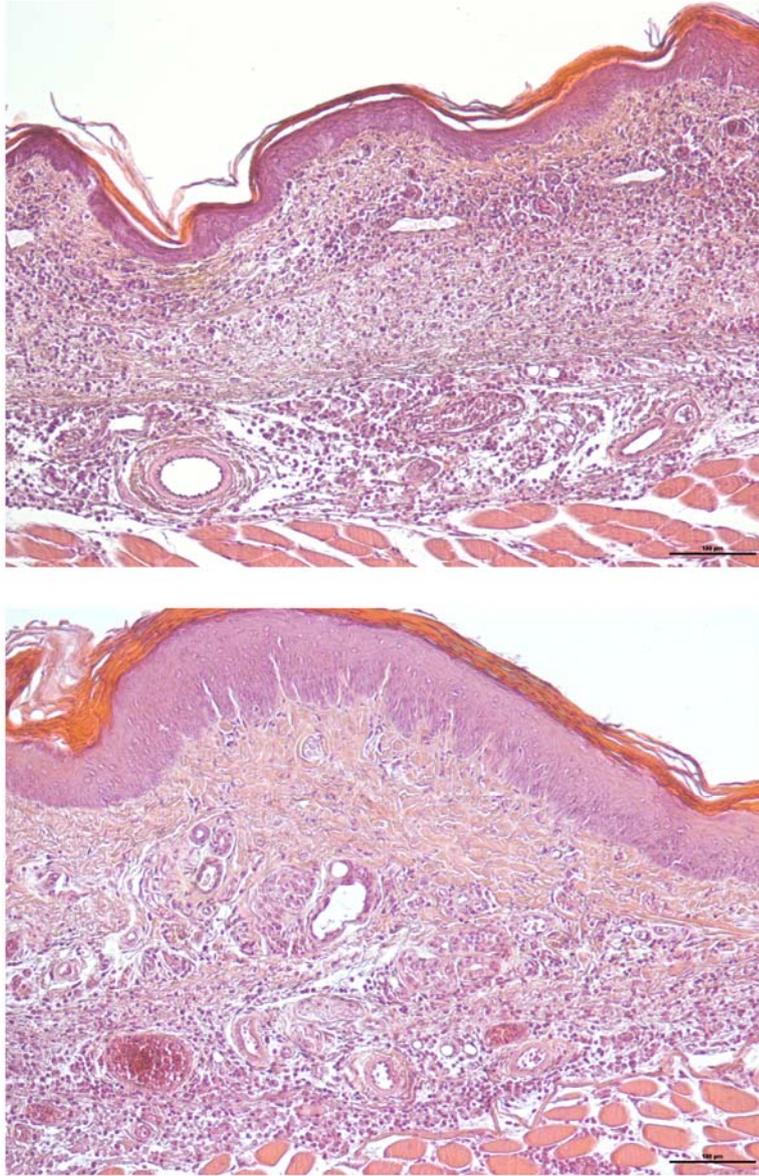
**Figura 28.** Aspecto microscópico de la almohadilla plantar de patas inyectadas con carragenato, sin inflamación (H.E., 100x). Las escalas equivalen a 100 µm.



**Figura 29.** Aspecto microscópico de la almohadilla plantar de patas inyectadas con carragenato. Inflamación leve, con edema leve y pocos infiltrados inflamatorios en la dermis (H.E., 100x). Las escalas equivalen a 100 µm.



**Figura 30.** Aspecto microscópico de la almohadilla plantar de patas inyectadas con carragenato. Inflamación moderada, con edema e infiltrados inflamatorios en la dermis, que no penetran en el músculo (H.E., 100x). Las escalas equivalen a 100 µm.



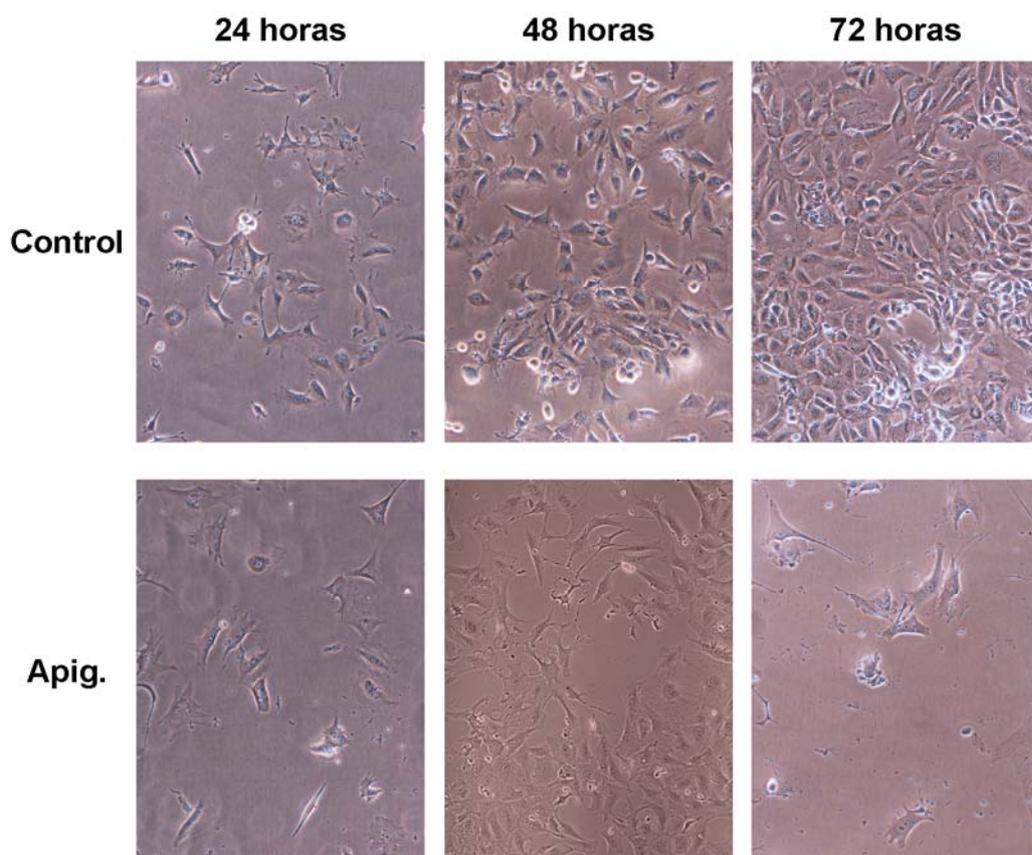
**Figura 31.** Aspecto microscópico de la almohadilla plantar de patas inyectadas con carragenato. Inflamación severa, con edema y gran cantidad de infiltrados inflamatorios en la dermis que penetran en el músculo (H.E., 100x). Las escalas equivalen a 100  $\mu$ m.

## **2. EFECTOS DE LA APIGENINA POTÁSICA SOBRE DOS LÍNEAS CELULARES DE PRÓSTATA TUMORAL (TRAMP-C1) Y NO TUMORAL (PNT2) *IN VITRO* E *IN VIVO***

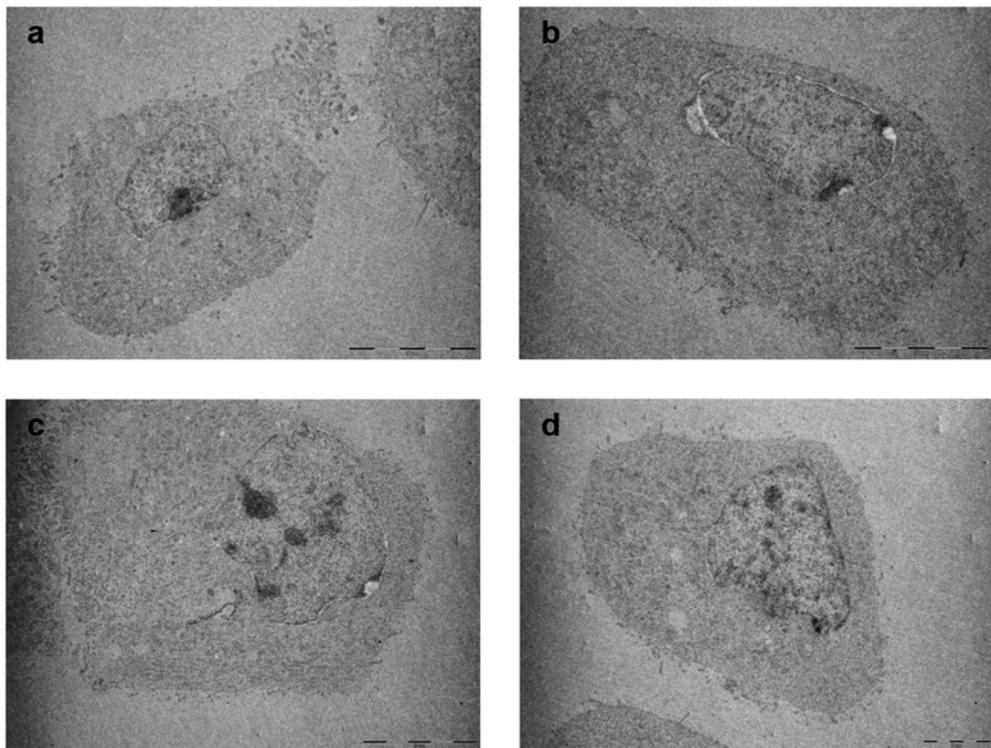
### **Efecto de la apigenina potásica sobre la morfología de las líneas celulares TRAMP-C1 y PNT2**

La incubación de células de la línea TRAMP-C1 con apigenina potásica (100  $\mu$ M) durante 24-72 horas provocó ciertos cambios en los cultivos; redujo el número de células y aumentó el de restos celulares (células no adheridas, restos de membranas celulares). Además, las células tratadas con la flavona presentaban mayor número de prolongaciones y cierto grado de vacuolización del citoplasma. Los cambios eran más pronunciados cuanto mayor fue la duración de la incubación con el flavonoide (Fig. 32).

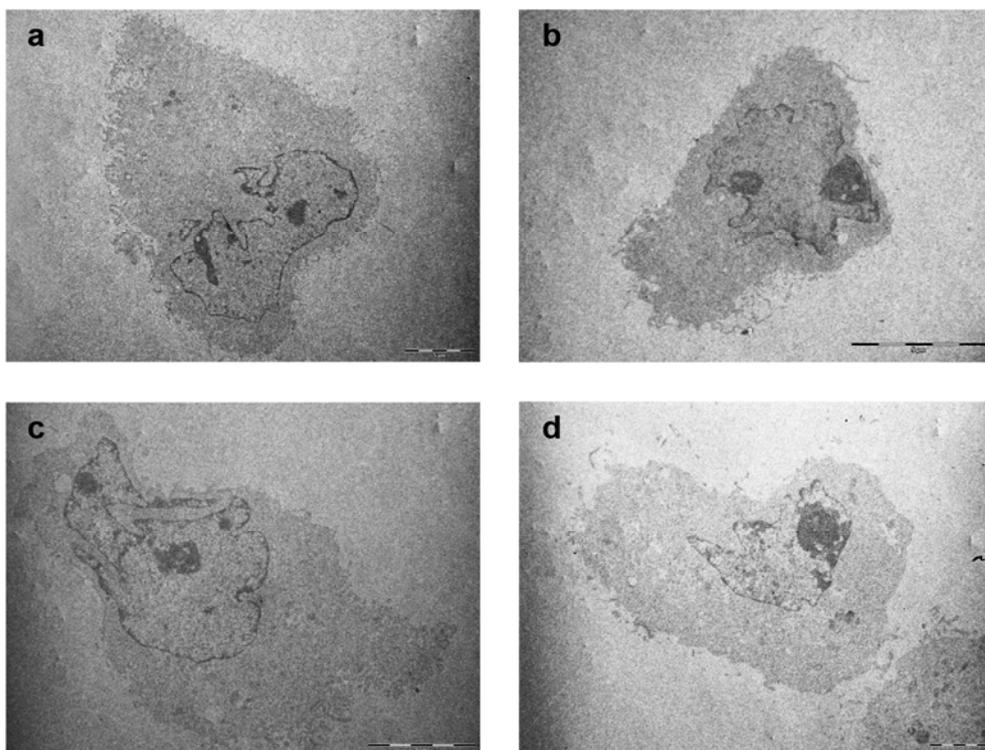
El estudio mediante TEM (Figs. 33 y 34) mostró que las células TRAMP-C1 no tratadas eran, en su mayoría, redondeadas o ligeramente ovales, debido a que habían adoptado esa forma tras ser separadas de su sustrato tras la tripsinización, con pequeñas prolongaciones de la membrana recubriendo su superficie. Su núcleo era redondeado con uno o, en ocasiones, dos nucléolos (Fig. 33). Las células tratadas con apigenina potásica (100  $\mu$ M, 48 horas) tenían una morfología más irregular, en ocasiones poligonal; aunque tenían prolongaciones membranosas similares a las células no tratadas, estas eran menos numerosas. Los núcleos de estas células eran irregulares, con varias invaginaciones y contaban, con mucha frecuencia, con dos o más nucléolos, en general mayores que los de las células control (Fig. 34)



**Figura 32.** Aspecto de células de la línea TRAMP-C1 cultivadas durante 24, 48 y 72 horas en presencia o no de apigenina potásica (100  $\mu$ M) (contraste de fases; 100x).



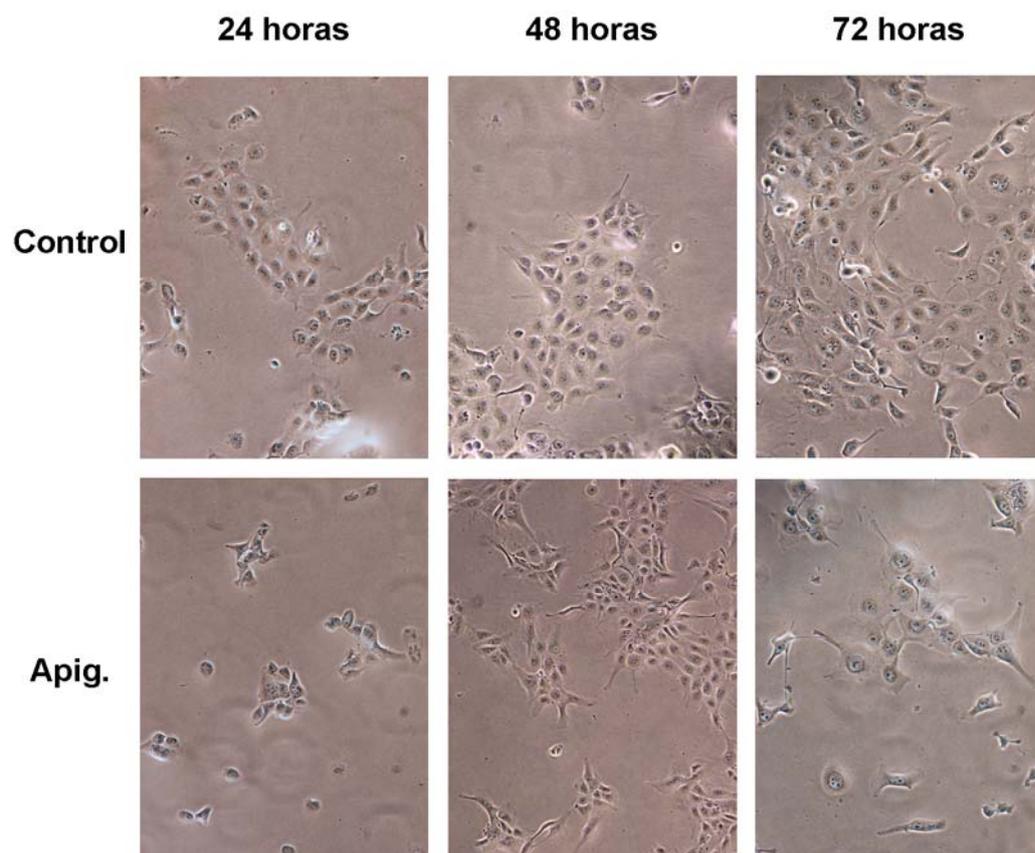
**Figura 33.** Ultraestructura de células control de la línea TRAMP-C1 (TEM; a-c: 3900x; d: 5800x). Las escalas equivalen a 5  $\mu\text{m}$  (a-c) y a 2  $\mu\text{m}$  (d).



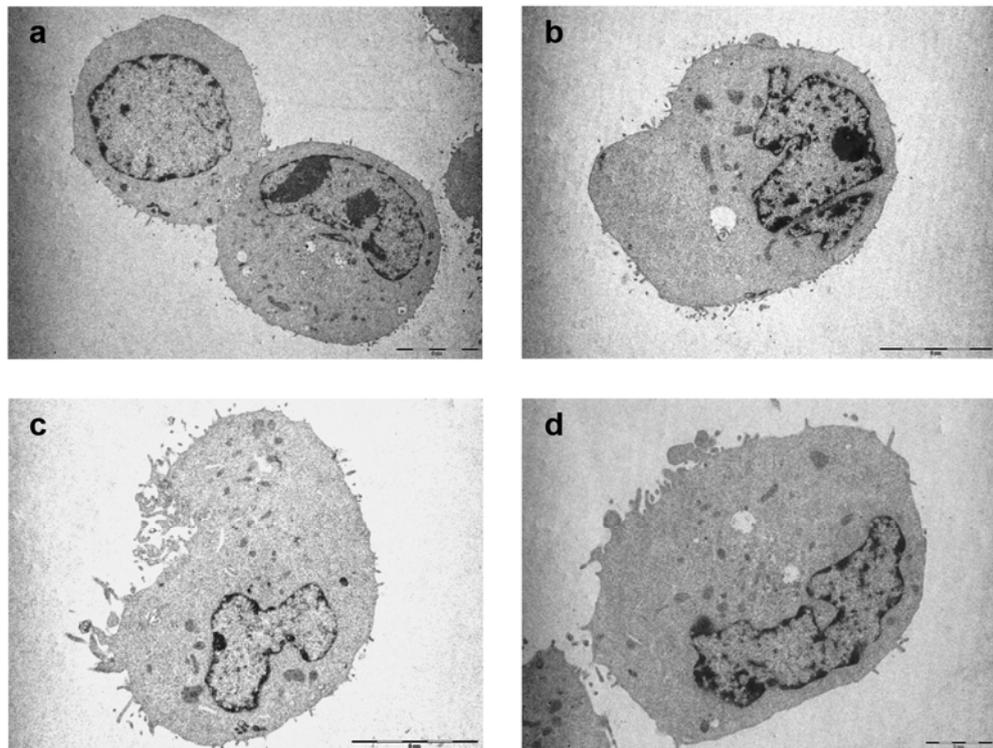
**Figura 34.** Ultraestructura de células de la línea TRAMP-C1 cultivadas durante 48 horas en presencia de apigenina potásica (100  $\mu\text{M}$ ) (TEM; a: 2850x; b-c: 3900x; d: 5800x). Las escalas equivalen a 5  $\mu\text{m}$  (a-c) y a 2  $\mu\text{m}$  (d).

El tratamiento de las células de la línea PNT2 con apigenina potásica (100  $\mu\text{M}$ ) a lo largo de 72 horas no provocó apenas cambios morfológicos. Únicamente causó la disminución del número de células, mayor cuanto más larga fue la incubación, y, solamente a las 72 horas, se observó cierta cantidad de restos de membranas celulares en el medio de cultivo (Fig. 35).

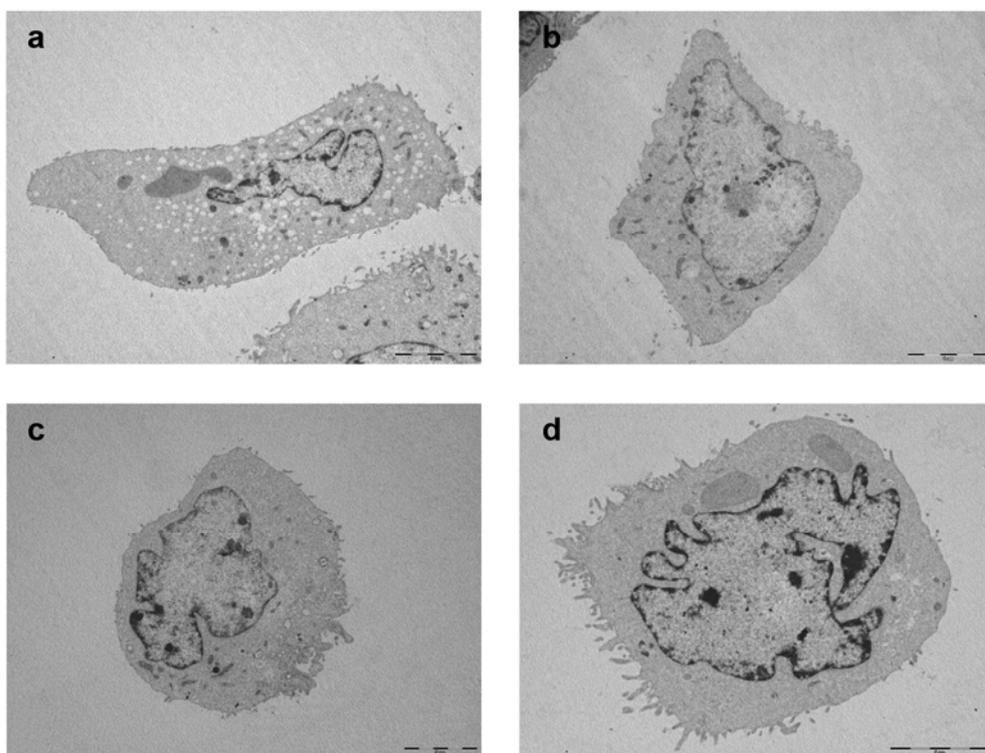
El estudio mediante TEM (Figs. 36 y 37) mostró que las células PNT2 no tratadas eran redondeadas o ligeramente ovaladas, recubiertas de algunas prolongaciones membranosas pequeñas. Los núcleos eran redondeados o de forma irregular, con uno o dos nucléolos prominentes (Fig. 36). Las células tratadas con apigenina potásica (100  $\mu\text{M}$ , 48 horas) eran, en ocasiones, poligonales, aunque, con mayor frecuencia, tenían una morfología similar a la de las células control. También presentaban pocas prolongaciones de la membrana, similares a las de las células no tratadas. Los núcleos de estas células eran redondeados o irregulares, con uno o más nucléolos (Fig. 37).



**Figura 35.** Aspecto de células de la línea PNT2 cultivadas durante 24, 48 y 72 horas en presencia o no de apigenina potásica (100  $\mu$ M) (contraste de fases; 100x).



**Figura 36.** Ultraestructura de células no tratadas de la línea PNT2 (TEM; a: 2850x; b, c: 3900x; d: 5800x). Las escalas equivalen a 5  $\mu\text{m}$  (a-c) y a 2  $\mu\text{m}$  (d).



**Figura 37.** Ultraestructura de células de la línea PNT2 cultivadas durante 48 horas en presencia de apigenina potásica (100  $\mu\text{M}$ ) (TEM; a-c: 2850x; d: 3900x). Las escalas equivalen a 5  $\mu\text{m}$ .

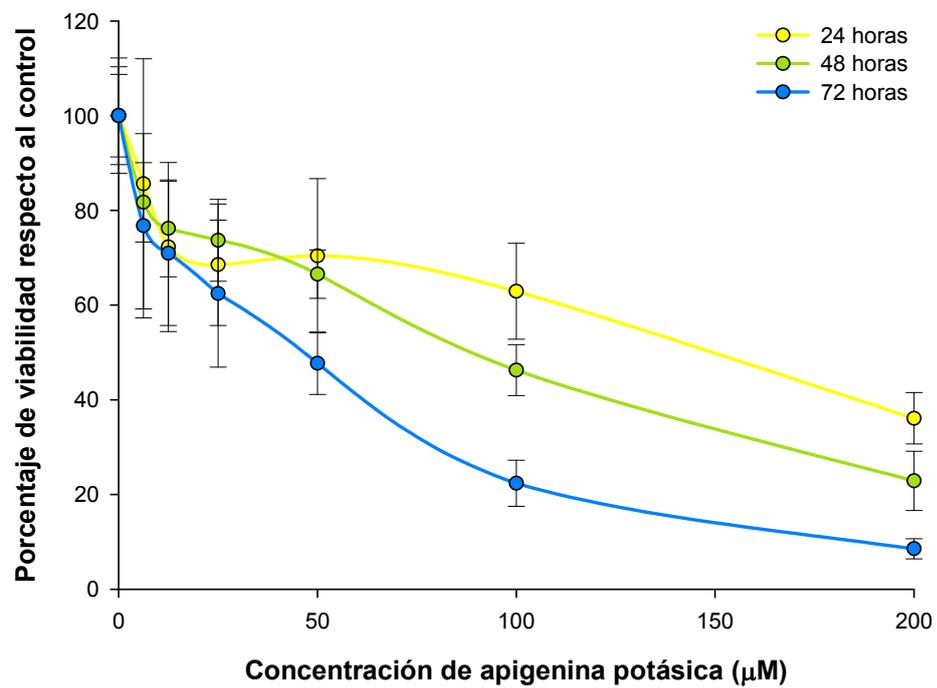
### **Efecto de la apigenina potásica sobre la viabilidad celular en las líneas celulares TRAMP-C1 y PNT2**

El tratamiento de la línea celular TRAMP-C1 con apigenina potásica (0-200  $\mu\text{M}$ ) durante 24, 48 o 72 horas provocó una disminución significativa de la viabilidad celular ( $p < 0,001$ ), que resultó dependiente de la duración de la incubación ( $p < 0,001$ ) y de la concentración de flavonoide utilizada ( $p < 0,001$ ) (Tabla 7, Fig. 38).

La concentración mínima que disminuyó la viabilidad respecto al control no tratado (0  $\mu\text{M}$ ) de forma significativa fue la de 0,78  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,005$  respecto al control no tratado). La concentración más alta (200  $\mu\text{M}$ ) provocó la mayor inhibición de la viabilidad celular; los porcentajes de viabilidad calculados respecto al control alcanzados con esta dosis fueron de un  $36,10 \pm 5,43$  % tras 24 horas de incubación, de un  $22,90 \pm 6,23$  % tras 48 horas y de un  $8,54 \pm 2,11$  % tras 72 horas.

	24 horas	48 horas	72 horas
Apig. 0 $\mu$ M (control)	100 $\pm$ 10,32	100 $\pm$ 12,19	100 $\pm$ 8,69
Apig. 0,78 $\mu$ M	98,11 $\pm$ 21,82	92,52 $\pm$ 9,5	92,22 $\pm$ 16,64
Apig. 1,56 $\mu$ M	100,83 $\pm$ 24,83	98,39 $\pm$ 8,14	91,29 $\pm$ 22,92
Apig. 3,13 $\mu$ M	94,18 $\pm$ 16,5	91,18 $\pm$ 6,7	76,75 $\pm$ 15,36
Apig. 6,25 $\mu$ M	85,61 $\pm$ 26,41	81,69 $\pm$ 8,37	76,76 $\pm$ 19,43
Apig. 12,5 $\mu$ M	72,27 $\pm$ 17,85	76,18 $\pm$ 10,22	70,93 $\pm$ 15,21
Apig. 25 $\mu$ M	68,53 $\pm$ 12,83	73,68 $\pm$ 8,63	62,43 $\pm$ 15,54
Apig. 50 $\mu$ M	70,41 $\pm$ 16,26	66,54 $\pm$ 5,11	47,72 $\pm$ 6,58
Apig. 100 $\mu$ M	62,92 $\pm$ 10,12	46,25 $\pm$ 5,37	22,38 $\pm$ 4,87
Apig. 200 $\mu$ M	36,10 $\pm$ 5,43	22,90 $\pm$ 6,23	8,54 $\pm$ 2,11

**Tabla 7.** Porcentaje de viabilidad de la línea TRAMP-C1 tratada con apigenina potásica (0-200  $\mu$ M; 24-72 horas) respecto al control (células no tratadas) (media  $\pm$  desviación estándar); cada valor es la media de 12 medidas. *Apig.*: apigenina potásica.



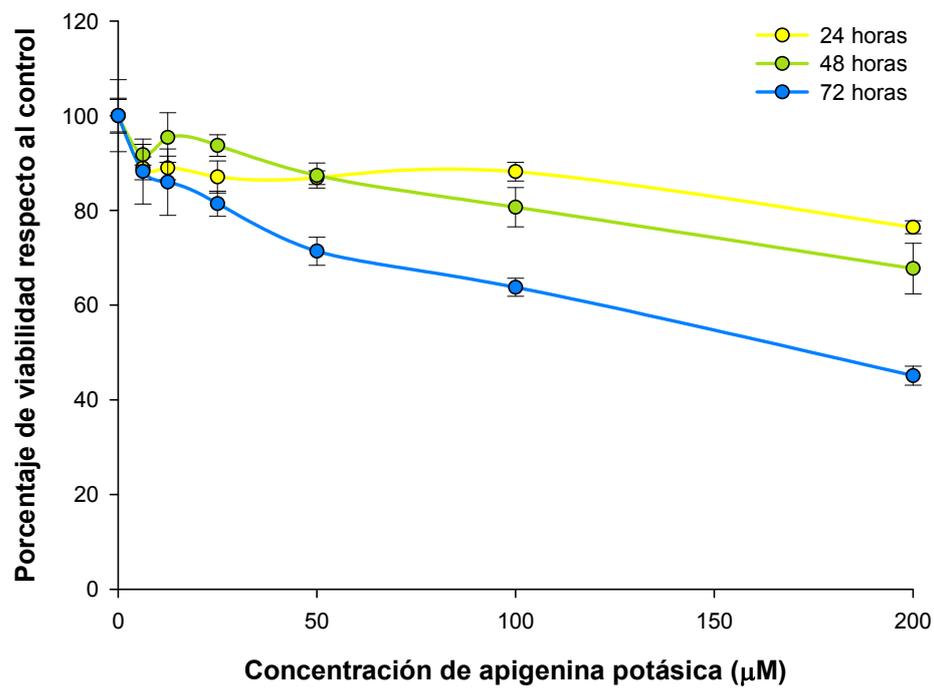
**Figura 38.** Viabilidad de la línea TRAMP-C1 tratada con apigenina potásica (0-200  $\mu\text{M}$ ; 24-72 horas); cada valor es la media de 12 medidas. Barra de error: desviación estándar. *Apig.*: apigenina potásica.

El tratamiento de la línea celular PNT2 con apigenina potásica (0-200  $\mu\text{M}$ ) durante 24, 48 o 72 horas provocó una disminución significativa de la viabilidad celular ( $p < 0,001$ ), que resultó dependiente de la duración de la incubación ( $p < 0,001$ ) y de la concentración de flavonoide utilizada ( $p < 0,001$ ) (Tabla 8, Fig. 39).

La concentración mínima que disminuyó la viabilidad respecto al control no tratado (0  $\mu\text{M}$ ) de forma significativa fue la de 1,56  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$  respecto al control no tratado). La concentración más alta (200  $\mu\text{M}$ ) provocó la mayor inhibición de la viabilidad celular; los porcentajes de viabilidad calculados respecto al control alcanzados con esta dosis fueron de un  $76,43 \pm 1,37$  % tras 24 horas de incubación, de un  $67,71 \pm 5,34$  % tras 48 horas y de un  $45,10 \pm 2$  % tras 72 horas.

	24 horas	48 horas	72 horas
Apig. 0 $\mu$ M	100 $\pm$ 3,71	100 $\pm$ 3,43	100 $\pm$ 7,58
Apig. 0,78 $\mu$ M	99,45 $\pm$ 4,49	100,44 $\pm$ 2,23	99,55 $\pm$ 11,19
Apig. 1,56 $\mu$ M	89,61 $\pm$ 2,17	85,79 $\pm$ 2,45	83,97 $\pm$ 5,45
Apig. 3,13 $\mu$ M	89,30 $\pm$ 1,73	96 $\pm$ 2,52	80,31 $\pm$ 2,51
Apig. 6,25 $\mu$ M	88,88 $\pm$ 2,42	91,75 $\pm$ 2,18	88,21 $\pm$ 6,86
Apig. 12,5 $\mu$ M	88,96 $\pm$ 2,5	95,38 $\pm$ 5,22	85,96 $\pm$ 7,01
Apig. 25 $\mu$ M	87,05 $\pm$ 3,39	93,69 $\pm$ 2,27	81,40 $\pm$ 2,65
Apig. 50 $\mu$ M	86,90 $\pm$ 1,44	87,36 $\pm$ 2,64	71,39 $\pm$ 2,95
Apig. 100 $\mu$ M	88,18 $\pm$ 1,96	80,67 $\pm$ 4,14	63,77 $\pm$ 1,89
Apig. 200 $\mu$ M	76,43 $\pm$ 1,37	67,71 $\pm$ 5,34	45,10 $\pm$ 2

**Tabla 8.** Porcentaje de viabilidad de la línea PNT2 tratada con apigenina potásica (0-200  $\mu$ M; 24-72 horas) respecto al control (células no tratadas) (media  $\pm$  desviación estándar); cada valor es la media de 12 medidas. *Apig.*: apigenina potásica.



**Figura 39.** Viabilidad de la línea PNT2 tratada con apigenina potásica (0-200  $\mu\text{M}$ ; 24-72 horas); cada valor es la media de 12 medidas. Barra de error: desviación estándar. *Apig.*: apigenina potásica.

Para comparar el efecto inhibitorio de la viabilidad celular de la apigenina potásica entre las dos líneas celulares utilizadas, se realizó el cálculo de las concentraciones inhibitorias (IC) 50 y 90, es decir, las dosis del flavonoide que produjeron la inhibición de la viabilidad del 50% y del 90% respecto al control sin tratar. Para ello se empleó el ajuste de una regresión lineal a cada curva de viabilidad obtenida en el experimento con cada línea celular. Las ecuaciones lineales obtenidas fueron las siguientes (*abs.*: absorbancia):

<b>TRAMP-C1; 24 horas</b>	Concentración = 149,85 – 279,81 x <i>abs.</i>	R <sup>2</sup> = 0,441
<b>TRAMP-C1; 48 horas</b>	Concentración = 224,15 – 220,75 x <i>abs.</i>	R <sup>2</sup> = 0,828
<b>TRAMP-C1; 72 horas</b>	Concentración = 153,68 – 67,96 x <i>abs.</i>	R <sup>2</sup> = 0,798
<b>PNT2; 24 horas</b>	Concentración = 617,98 – 1215,65 x <i>abs.</i>	R <sup>2</sup> = 0,506
<b>PNT2; 48 horas</b>	Concentración = 517,721 – 721,87 x <i>abs.</i>	R <sup>2</sup> = 0,751
<b>PNT2; 72 horas</b>	Concentración = 298,83 – 338,63 x <i>abs.</i>	R <sup>2</sup> = 0,765

Los valores de IC50 e IC90 para cada línea celular y duración de la incubación quedan reflejados en la tabla 9. Debido a los valores bajos del coeficiente de determinación R<sup>2</sup> de las regresiones para los ensayos a 24 horas en ambas líneas celulares, que indican un ajuste pobre, no se realizó ninguna estimación para 24 horas; gracias a que los coeficientes R<sup>2</sup> del resto de regresiones fueron más elevados, se realizaron estimaciones de los valores de IC50 e IC90 para 48 y 72 horas. Estos valores indican que el poder inhibitorio de la viabilidad de la apigenina potásica es mayor sobre la línea celular tumoral, TRAMP-C1, que sobre la línea celular no tumoral, PNT2.

		24 horas	48 horas	72 horas
TRAMP-C1	IC <sub>50</sub>	-	104,88	74,46
	IC <sub>90</sub>	-	200,3	137,83
PNT2	IC <sub>50</sub>	-	251,92	136,94
	IC <sub>90</sub>	-	464,56	266,45

**Tabla 9.** Valor de la concentración inhibitoria (IC) 50 y 90 ( $\mu\text{M}$ ) de la apigenina potásica en las líneas TRAMP-C1 y PNT2.

### **Efecto de la apigenina potásica sobre la apoptosis en las líneas celulares TRAMP-C1 y PNT2**

La incubación de células de la línea celular de carcinoma de próstata TRAMP-C1 con apigenina potásica (25-200  $\mu\text{M}$ ) durante 24, 48 o 72 horas provocó un aumento del número de células apoptóticas (células con condensación o fragmentación nuclear) estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ), dependiente de la duración de la incubación y de la concentración del compuesto (Tabla 10, Figs. 40 y 41,).

Las células no tratadas (control) mostraron un porcentaje basal de células apoptóticas cuya media fue de  $3,96 \pm 0,93$  %. Al administrar estaurosporina (STS) a las células como control positivo de apoptosis, el porcentaje de células en muerte programada ascendió hasta  $17,09 \pm 0,93$  %, lo que supuso un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ) del 331,51% respecto al control.

Al incubar la línea TRAMP-C1 con distintas concentraciones de apigenina potásica durante 24 horas, el porcentaje de células apoptóticas mostró una tendencia a aumentar respecto al control a todas las dosis ensayadas, aunque manteniéndose por debajo de los valores alcanzados con el inductor STS. Así, mientras que el aumento de la apoptosis causado por la concentración menor de apigenina potásica (25  $\mu\text{M}$ ), de un 15,64% respecto al control, no resultó estadísticamente significativo ( $p = 0,11$ ), sí lo fueron los causados por el resto de dosis; la apigenina potásica incrementó la apoptosis en un 35,25% ( $p < 0,005$ ), un 29,39% ( $p < 0,01$ ) y un 43,24% ( $p < 0,001$ ), a las concentraciones de 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

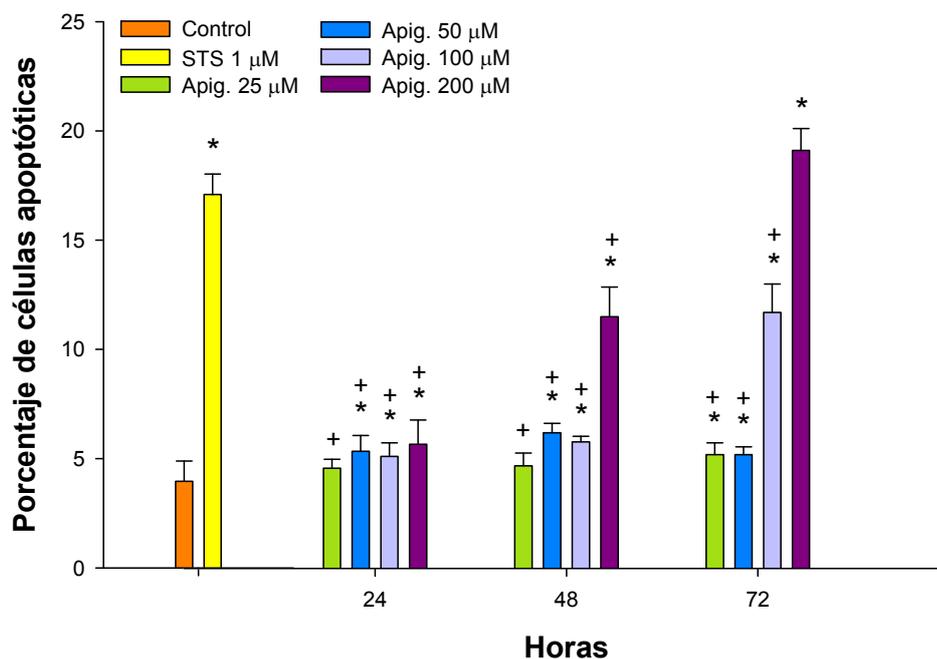
El tratamiento con apigenina potásica durante 48 horas también provocó un aumento significativo de la apoptosis en la línea celular

TRAMP-C1 respecto al control, que fue mayor que el producido por la incubación durante 24 horas. Respecto a las células no tratadas, la apoptosis creció en un 18,49% (no significativo;  $p=0,071$ ), un 56,69% ( $p<0,001$ ), un 46,10% ( $p<0,001$ ) y un 190,57% ( $p<0,001$ ), al añadir a las células apigenina potásica a 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

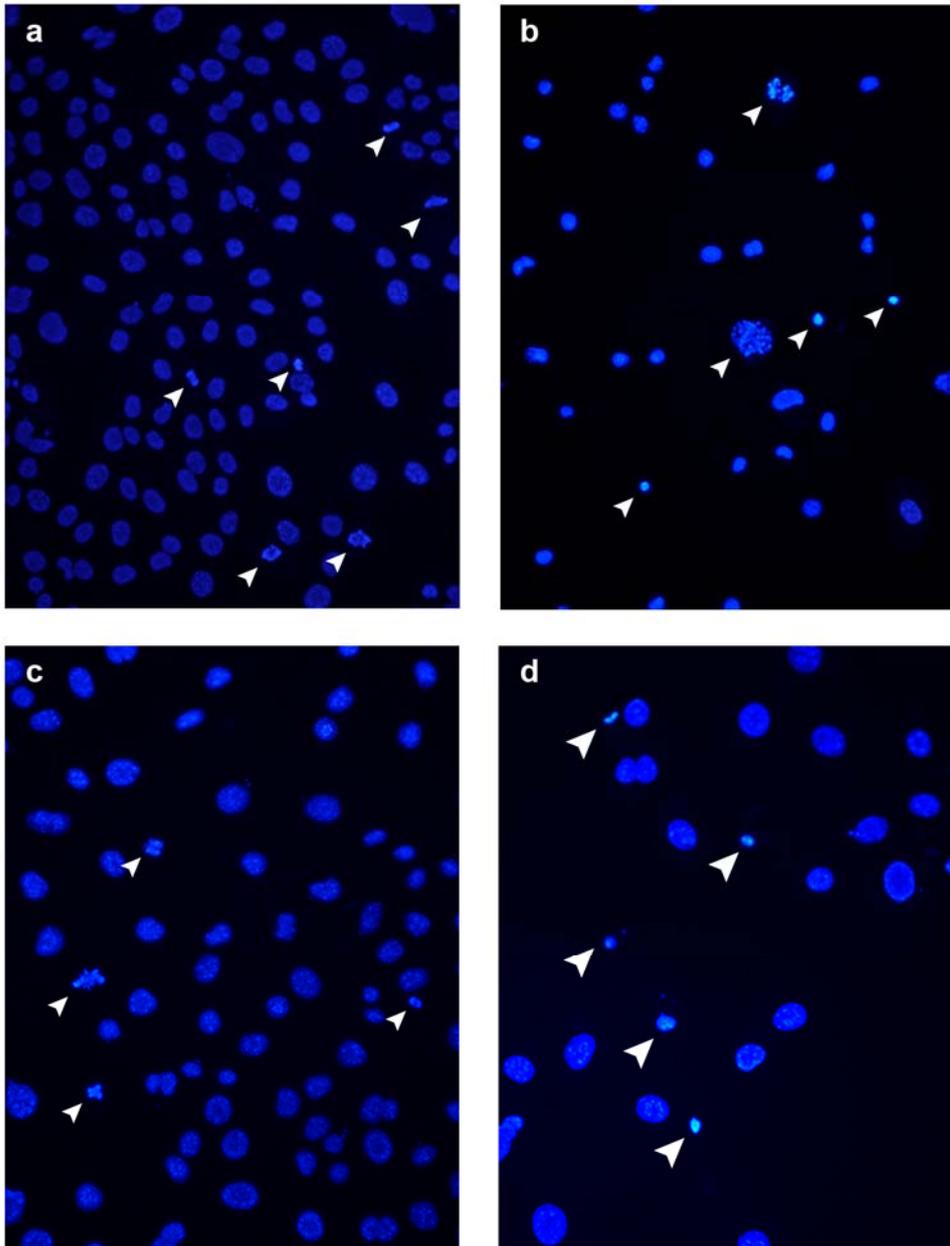
Por último, el tratamiento con apigenina potásica durante 72 horas aumentó el porcentaje de células apoptóticas respecto a los controles en mayor medida que la incubación durante 24 o 48 horas. En este caso, al comparar los valores de las células tratadas con los controles, todos resultaron estadísticamente significativos. La administración de apigenina potásica a 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  aumentó el número de células apoptóticas en un 31,37% ( $p<0,01$ ), 31,44% ( $p<0,01$ ), 195,64% ( $p<0,001$ ) y 382,84% ( $p<0,001$ ), respectivamente. En estos resultados destaca que el efecto proapoptótico del tratamiento con apigenina potásica 200  $\mu\text{M}$  durante 72 horas supera al del inductor STS (331,51%), aunque los resultados de la comparación no fueron significativos ( $p=0,259$ ).

	24 horas	48 horas	72 horas
Control		3,96 ± 0,93 %	
STS 1 μM		17,09 ± 0,93 %	
Apig. 25 μM	4,58 ± 0,41 %	4,69 ± 0,58 %	5,20 ± 0,55 %
Apig. 50 μM	5,36 ± 0,72 %	6,21 ± 0,43 %	5,21 ± 0,36 %
Apig. 100 μM	5,13 ± 0,62 %	5,79 ± 0,25 %	11,71 ± 1,3%
Apig. 200 μM	5,67 ± 1,12 %	11,51 ± 1,36 %	19,12 ± 1 %

**Tabla 10.** Porcentaje de células apoptóticas en la línea TRAMP-C1 con cada uno de los tratamientos (media ± desviación estándar); cada valor es la media de 3 medidas. *Apig.*: apigenina potásica; *STS*: estaurosporina.



**Figura 40.** Comparación del porcentaje de células apoptóticas en la línea TRAMP-C1 con cada uno de los tratamientos a 24, 48 y 72 horas; cada valor es la media de 3 medidas. Barra de error: desviación estándar. \*: significación estadística respecto al control no tratado ( $p < 0,05$ ); +: significación estadística respecto al control positivo tratado con estaurosporina ( $p < 0,05$ ). *Apig.*: apigenina potásica; *STS*: estaurosporina.



**Figura 41.** Efecto de la apigenina potásica sobre la apoptosis de las células de carcinoma de próstata TRAMP-C1. Aspecto de células TRAMP-C1 no tratadas (a), incubadas con STS (b), o tratadas con apigenina potásica 200  $\mu$ M durante 24 horas (c) o 72 horas (d) (Hoechst, 100x). Las puntas de flecha indican células apoptóticas. STS: estaurosporina.

Los efectos de la apigenina potásica sobre la apoptosis en la línea celular de epitelio de próstata no tumoral (PNT2) son muy diferentes (Tabla 11, Figs. 42 y 43).

En esta línea celular, el porcentaje de apoptosis basal de las células no tratadas fue de  $4,63 \pm 0,44$  %, y aumentó significativamente en un 185,07% ( $p < 0,001$ ) con la administración del inductor de apoptosis STS.

La incubación de las células PNT2 con apigenina (25-200  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas no produjo un aumento significativo de la apoptosis, manteniéndose todos los valores próximos a los de las células control. Así, se produjo una reducción de un 1,13% ( $p = 0,944$ ) respecto al control no tratado con la dosis menor (25  $\mu\text{M}$ ), y de un 6,58% ( $p = 0,773$ ) con la concentración de 100  $\mu\text{M}$ , mientras que las otras concentraciones provocaron ligeros aumentos: un 4,19% (50  $\mu\text{M}$ ;  $p = 0,701$ ) y un 2,74% (200  $\mu\text{M}$ ;  $p = 0,850$ ).

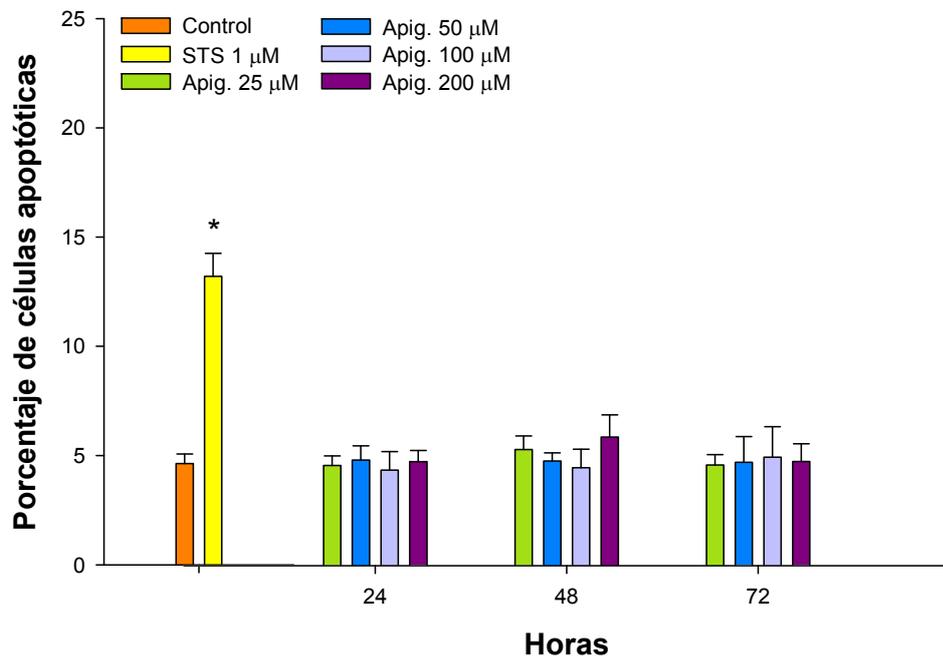
De forma similar, la administración de los tratamientos durante 48 horas tampoco varió significativamente el porcentaje de células apoptóticas respecto a los controles. Todas las concentraciones ensayadas del flavonoide causaron un ligero aumento de la proporción de células apoptóticas, excepto la concentración de 100  $\mu\text{M}$ , con la que se produjo una disminución respecto al control de un 3,21% ( $p = 0,825$ ). Las dosis de 25, 50 y 200  $\mu\text{M}$  incrementaron la apoptosis respecto al control en un 14,83% ( $p = 0,312$ ), 3,28% ( $p = 0,822$ ) y 26,88% ( $p = 0,072$ ), respectivamente.

Por último, el tratamiento de las células durante 72 horas produjo resultados similares a los anteriores. La menor dosis ensayada disminuyó levemente el porcentaje de células apoptóticas (0,55%;  $p = 0,970$ ) y el resto

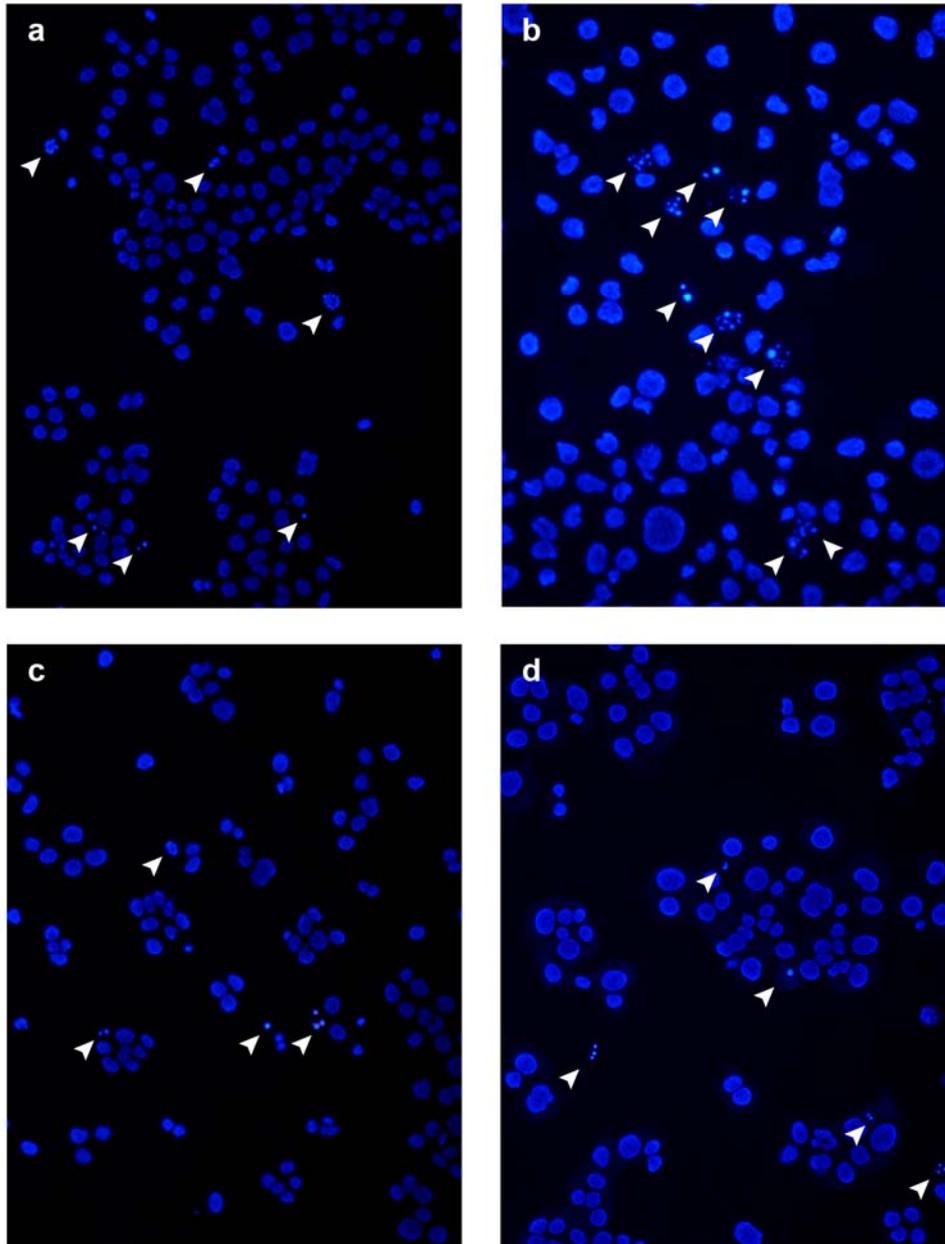
de concentraciones lo aumentó en un 2,15% (50  $\mu$ M;  $p=0,883$ ), un 7,18% (100  $\mu$ M;  $p=0,622$ ) y un 2,92% (200  $\mu$ M;  $p=0,841$ ).

	24 horas	48 horas	72 horas
Control		4,63 ± 0,44 %	
STS 1 μM		13,21 ± 1,05 %	
Apig. 25 μM	4,59 ± 0,44 %	5,32 ± 0,61 %	4,61 ± 0,47 %
Apig. 50 μM	4,83 ± 0,65 %	4,78 ± 0,38 %	4,77 ± 0,81 %
Apig. 100 μM	4,37 ± 0,84 %	4,48 ± 0,85 %	4,97 ± 1,39 %
Apig. 200 μM	4,76 ± 0,51 %	5,88 ± 1,02 %	4,73 ± 1,17 %

**Tabla 11.** Porcentaje de células apoptóticas en la línea PNT2 con cada uno de los tratamientos (media ± desviación estándar); cada valor es la media de tres medidas. *Apig.*: apigenina potásica; *STS*: estaurosporina.



**Figura 42.** Comparación del porcentaje de células apoptóticas en la línea PNT2 con cada uno de los tratamientos a 24, 48 y 72 horas; cada valor es la media de 3 medidas. Barra de error: desviación estándar. \*: significación estadística respecto al control no tratado ( $p < 0,05$ ). *Apig.*: apigenina potásica; *STS*: estaurosporina.



**Figura 43.** Efecto de la apigenina potásica sobre la apoptosis de las células de epitelio de próstata PNT2. Aspecto de células PNT2 no tratadas (a), incubadas con STS (b), o tratadas con apigenina potásica 200  $\mu$ M durante 24 horas (c) o 72 horas (d) (Hoechst, 100x). Las puntas de flecha indican células apoptóticas. STS: estaurosporina.

### **Efecto de la apigenina potásica sobre el ciclo celular en la línea celular TRAMP-C1**

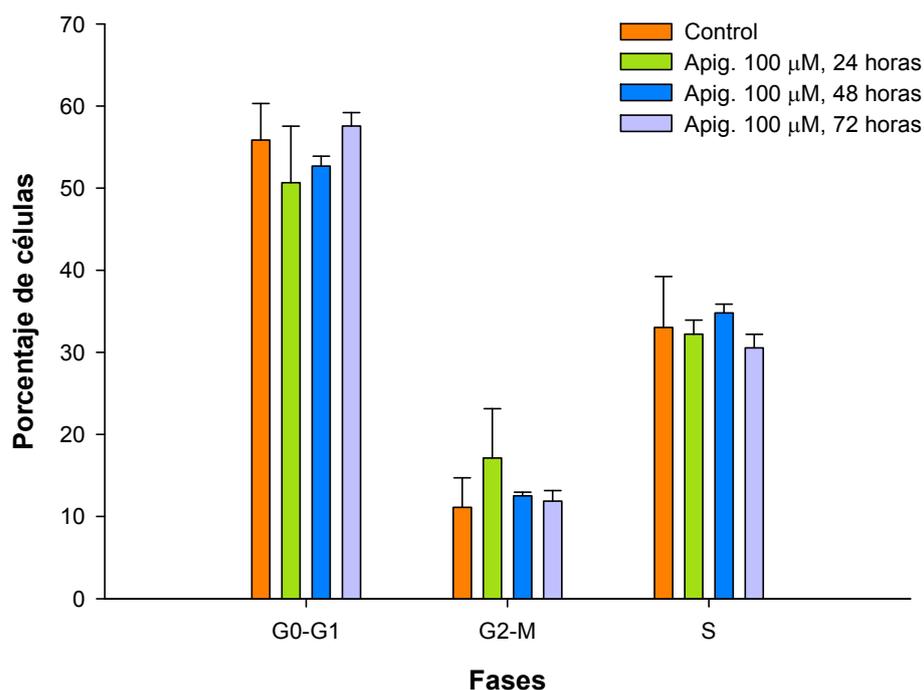
La incubación de células de la línea TRAMP-C1 con apigenina potásica a una concentración de 100  $\mu$ M durante 24-72 horas no causó el bloqueo del ciclo celular, puesto que no hubo cambios estadísticamente significativos en el porcentaje de células que se encontraban en cada una de las fases ( $G_0 - G_1$ :  $p=0,261$ ; S:  $p=0,513$ ;  $G_2 - M$ :  $p=0,242$ ) (Tabla 12, Figs. 44 y 45).

Las células no tratadas se encontraban, principalmente, en las fases  $G_0 - G_1$  y S, con un  $55,86 \pm 4,45$  % y un  $33,02 \pm 6,2$  % del total de células analizadas, respectivamente; únicamente un pequeño porcentaje de las células se encontraban en las fases más próximas a la mitosis ( $11,12 \pm 3,59$  %).

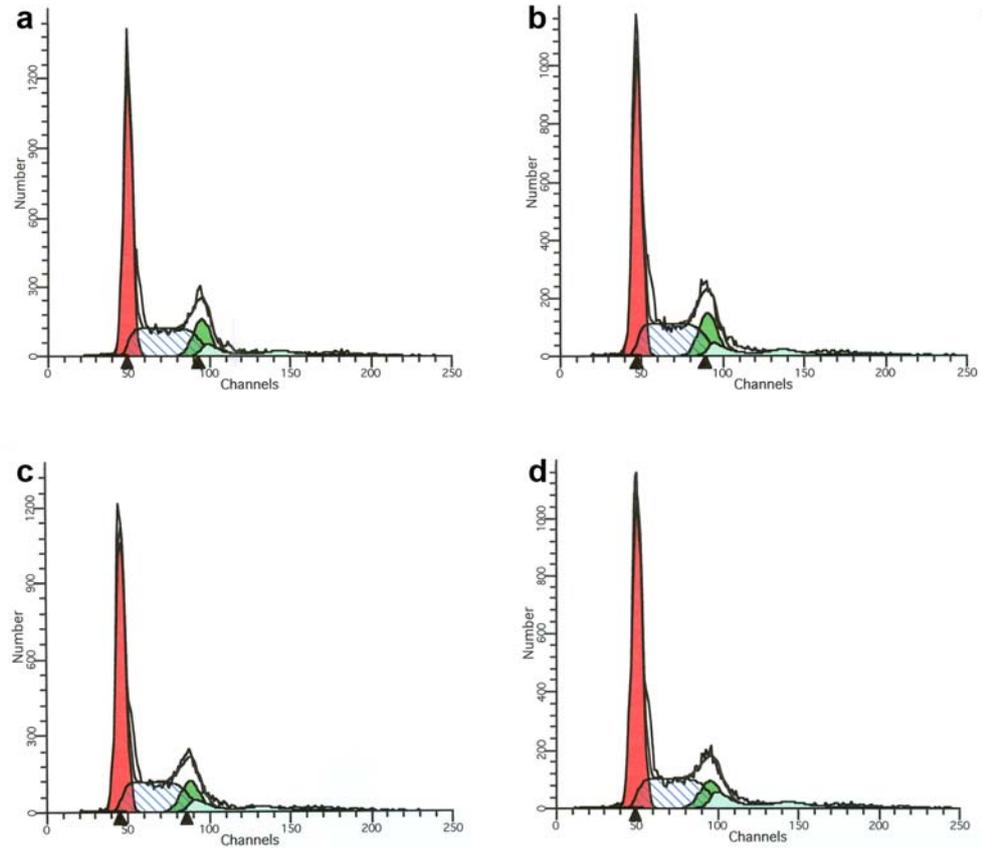
Las células tratadas con apigenina potásica, al igual que los controles, estaban mayoritariamente en las fases  $G_0 - G_1$ , con porcentajes en estas fases de  $50,67 \pm 6,89$  % (24 horas),  $52,67 \pm 1,22$  % (48 horas) y  $57,56 \pm 1,63$  % (72 horas). La siguiente población más numerosa era la de las células en fase S, con un  $32,22 \pm 1,72$  %, un  $34,8 \pm 1,07$  % y un  $30,54 \pm 1,64$  %, a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente. Por último, solo una pequeña parte de las células se encontraban en las fases  $G_2 - M$ : un  $17,11 \pm 6,03$  % en el caso del tratamiento durante 24 horas, un  $12,52 \pm 0,45$  % para la incubación durante 48 horas, y un  $11,89 \pm 12,7$  % en el caso del tratamiento más prolongado.

	G <sub>0</sub> - G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> - M
Control	55,86 ± 4,45 %	33,02 ± 6,2 %	11,12 ± 3,59 %
Apig. 100 μM, 24 horas	50,67 ± 6,89 %	32,22 ± 1,72 %	17,11 ± 6,03 %
Apig. 100 μM, 48 horas	52,67 ± 1,22 %	34,8 ± 1,07 %	12,52 ± 0,45 %
Apig. 100 μM, 72 horas	57,56 ± 1,63 %	30,54 ± 1,64 %	11,89 ± 12,7 %

**Tabla 12.** Porcentaje de células de la línea TRAMP-C1 en las distintas fases del ciclo celular (media ± desviación estándar) tras el tratamiento con apigenina potásica (100 μM) durante 24-72 horas; cada valor es la media de tres medidas. *Apig.*: apigenina potásica.



**Figura 44.** Comparación del porcentaje de células de la línea TRAMP-C1 en las distintas fases del ciclo celular tratadas o no con apigenina potásica (100 μM) durante 24-72 horas. Barra de error: desviación estándar. *Apig.*: apigenina potásica.



**Figura 45.** Histogramas representativos del análisis del ciclo celular de células de la línea TRAMP-C1 sin tratar (a), o tratadas con apigenina potásica 100  $\mu$ M durante 24 (b), 48 (c) o 72 horas (d).

## **Efecto de la apigenina potásica sobre la migración celular en las líneas celulares TRAMP-C1 y PNT2**

Durante el experimento, las células de la línea TRAMP-C1 situadas en el borde de la zona despejada emitieron prolongaciones membranas, con o sin invaginaciones profundas, hacia el área sin células. Estas estructuras, que no estaban presentes al comienzo del experimento, eran similares a los lamelipodios, característicos del movimiento celular (Fig. 46). Además, era frecuente encontrar células separadas del borde (Fig. 46 d), que presentaban también estas prolongaciones, bien rodeando toda la célula o bien orientadas en una dirección.

Para el estudio de los efectos de la apigenina potásica sobre la línea celular TRAMP-C1 realizamos un estudio piloto previo, con el fin de determinar la periodicidad de las medidas y las concentraciones del flavonoide más adecuadas. Para ello, las células fueron incubadas con distintas concentraciones (25-100  $\mu\text{M}$ ), todas ellas menores a la IC50 de este compuesto para esta línea celular, desde el comienzo del experimento y se realizaron medidas cada 3 horas. Todos los tratamientos provocaron la inhibición del movimiento celular respecto al control no tratado ( $p < 0,001$  en todos los casos). Gracias a este ensayo, no se empleó posteriormente la concentración de 50  $\mu\text{M}$ , ya que no mostró diferencias significativas respecto a la concentración menor ( $p = 0,834$ ).

La incubación de células de la línea TRAMP-C1 con distintas concentraciones de apigenina potásica (25, 100  $\mu\text{M}$ ), tanto justo al comienzo del experimento, como 12 horas antes de la creación de la zona libre de células, solamente causó una inhibición significativa de la migración celular a la concentración más elevada ( $p < 0,001$ ) (Tabla 13, Figs. 47 y 48).

Las células de la línea celular TRAMP-C1 no tratadas con flavonoide migraron a lo largo del experimento hasta ocupar el espacio libre a las 48 horas del comienzo del mismo.

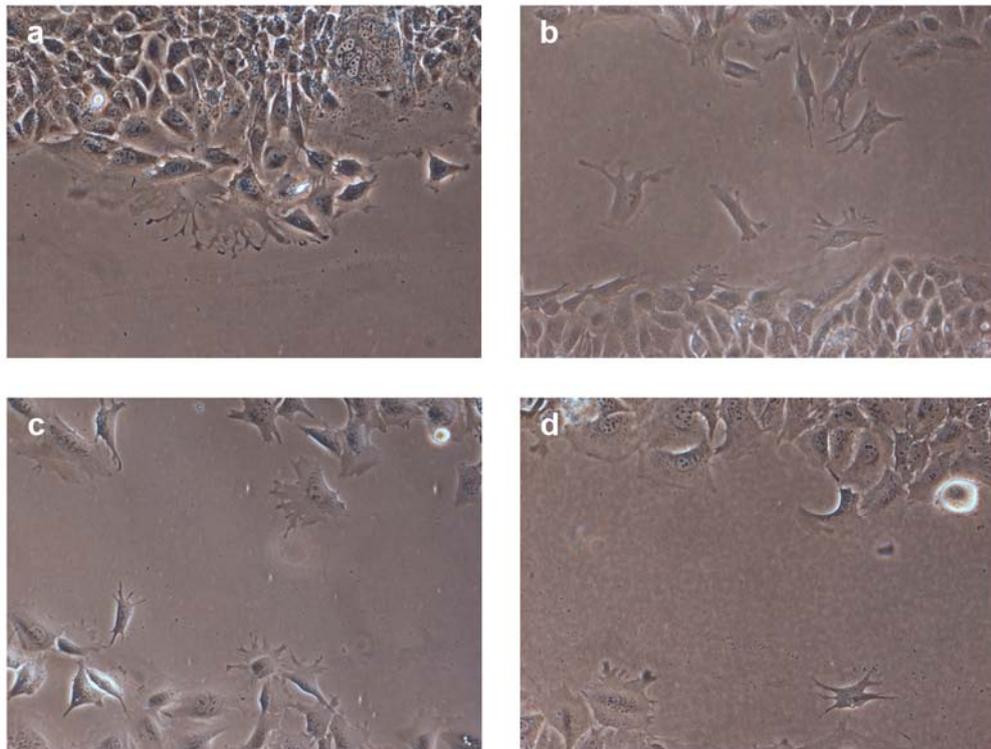
El tratamiento de las células con la concentración menor de apigenina potásica (25  $\mu\text{M}$ ) al inicio del ensayo no inhibió significativamente la migración celular respecto a los controles no tratados ( $p=0,943$ ), aunque mostró una tendencia a reducirla; la distancia recorrida por las células tratadas fue entre un 5,76% y un 14,9% menor que la de los controles en las primeras 30 horas de ensayo.

La incubación con apigenina potásica 25  $\mu\text{M}$  desde 12 horas antes del comienzo del ensayo tampoco inhibió la migración de forma significativa ( $p=0,689$ ), aunque también demostró una tendencia a disminuir el movimiento celular: la distancia de migración de las células tratadas fue entre un 2,84% y un 16,02% menor que la de los controles a todo lo largo del ensayo. La comparación con los datos del tratamiento con la misma dosis justo al empezar el experimento no resultó estadísticamente significativa ( $p=0,733$ ).

La concentración más elevada de apigenina potásica (100  $\mu\text{M}$ ) inhibió el movimiento celular de forma significativa respecto a los controles sin tratar ( $p<0,001$ ). Así, la distancia recorrida por estas células fue, a lo largo de todo el experimento, entre un 4,62% y un 58,78% menor que la migrada por los controles, destacando que las células nunca llegaron a cubrir por completo la zona vacía de células.

El pretratamiento con apigenina potásica 100  $\mu\text{M}$  desde las 12 horas previas al ensayo también redujo significativamente la migración celular respecto al control ( $p<0,001$ ), manteniéndose en valores entre un 18,95% y un 59,82% menores que los de las células no tratadas. Al

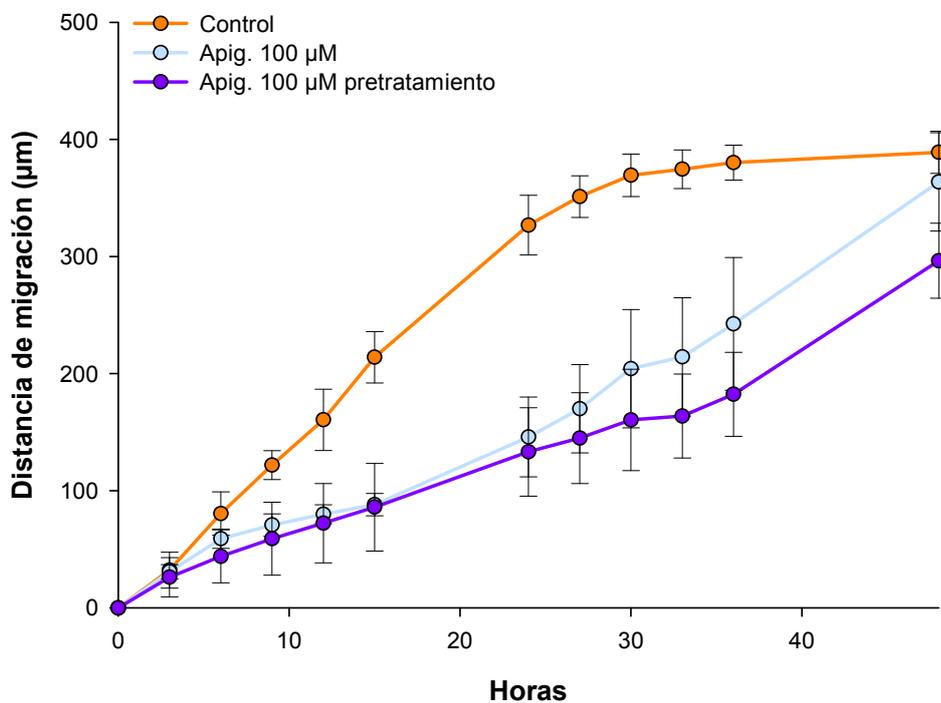
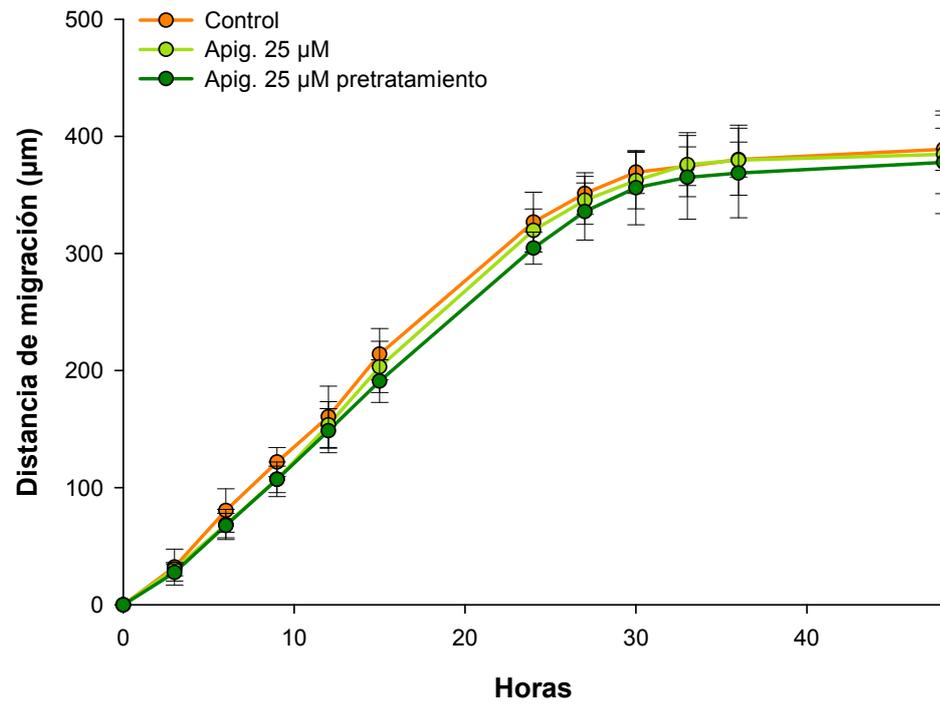
comparar con la administración la misma concentración al inicio del ensayo, la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0,085$ ); sin embargo, el pretratamiento mostró una tendencia a causar una disminución de la migración, con valores entre un 2,52% y un 25,5% menores que los de la apigenina potásica 100  $\mu\text{M}$  administrada al comienzo del ensayo.



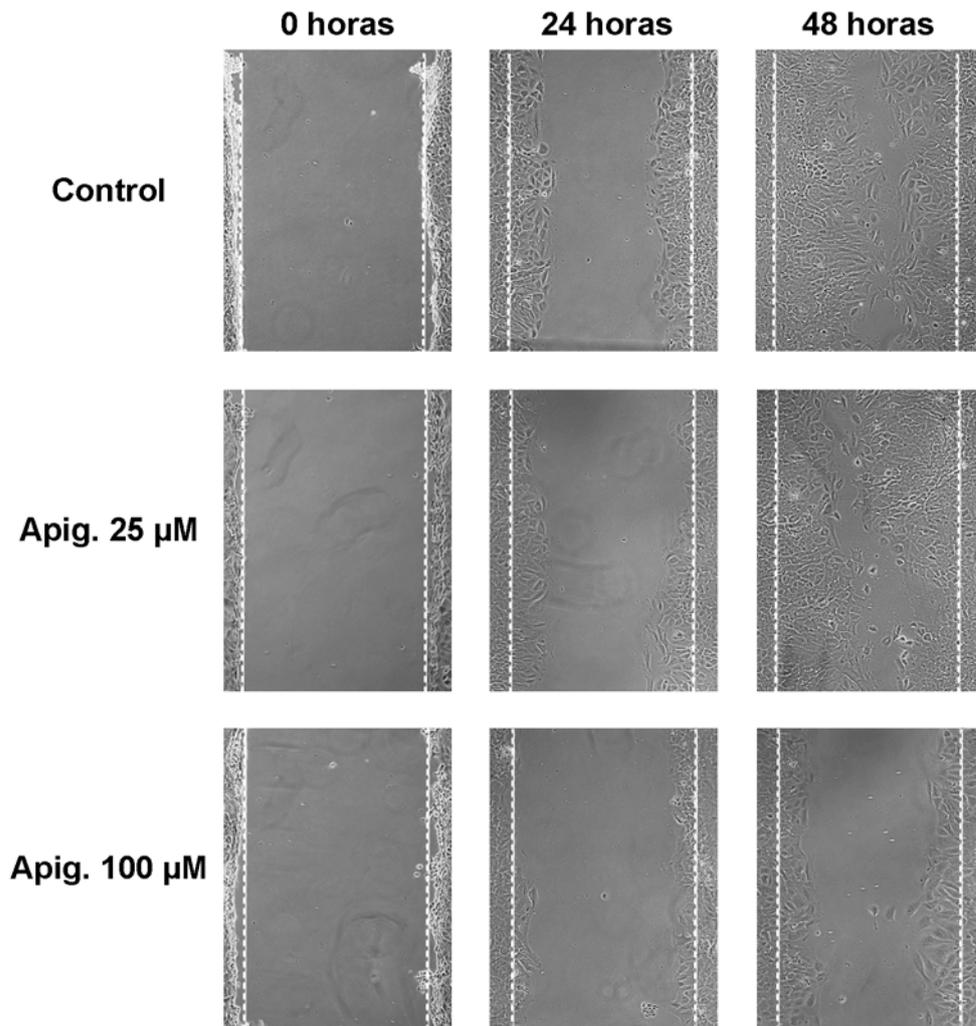
**Figura 46.** Detalles de la migración de la línea TRAMP-C1 a lo largo del experimento (contraste de fases; a-d: 150x).

	0 horas	3 horas	6 horas	9 horas	12 horas	15 horas	24 horas	27 horas	30 horas	33 horas	36 horas	40 horas
<b>Control</b>	0 ± 0	32,27 ± 15,36	80,57 ± 18,6	121,91 ± 12,38	160,62 ± 26,13	213,94 ± 21,98	326,82 ± 25,52	351,23 ± 17,78	369,33 ± 18,11	374,56 ± 16,4	380,23 ± 14,88	388,96 ± 17,97
<b>Apig. 25 µM</b>	0 ± 0	30,42 ± 5,7	68,56 ± 12,9	107,18 ± 14,84	153,67 ± 19,91	203,21 ± 21,88	319,70 ± 18,32	345,40 ± 20,51	362,31 ± 24,09	375,83 ± 27,26	379,73 ± 29,92	384,64 ± 33,63
<b>Apig. 25 µM pretrat.</b>	0 ± 0	27,58 ± 7,3	67,66 ± 10,41	107,11 ± 11,4	148,7 ± 18,75	191,02 ± 18,17	304,62 ± 13,68	335,85 ± 24,41	356,17 ± 31,61	365,04 ± 35,66	368,73 ± 38,2	377,93 ± 43,77
<b>Apig. 100 µM</b>	0 ± 0	30,78 ± 6,12	59,08 ± 8,16	70,71 ± 9,59	79,96 ± 8,04	88,18 ± 9,57	145,89 ± 34,07	170,03 ± 37,66	204,25 ± 50,49	214,29 ± 50,57	242,46 ± 56,62	363,8 ± 41,95
<b>Apig. 100 µM pretrat.</b>	0 ± 0	26,16 ± 16,76	44,02 ± 22,65	59,06 ± 31,24	72,33 ± 33,86	85,96 ± 37,47	133,22 ± 37,8	144,94 ± 38,8	160,51 ± 43,25	163,78 ± 35,85	182,43 ± 35,81	296,44 ± 32,05

**Tabla 13.** Distancia de migración (µm; media ± desviación estándar) de la línea celular TRAMP-C1 tratada o no con apigenina potásica (25-100 µM); cada valor es la media de ocho medidas. El flavonoide se administró en el momento de comenzar el experimento o 12 horas antes (pretratamiento). *Apig.*: apigenina potásica; *pretrat.*: pretratamiento.



**Figura 47.** Comparación de la distancia de migración de las células de la línea TRAMP-C1 no tratadas o tratadas con apigenina potásica (25-100 µM); cada valor es la media de ocho medidas. Barra de error: desviación estándar.



**Figura 48.** Migración de células de la línea TRAMP-C1 no tratadas o tratadas con apigenina potásica (25, 100  $\mu\text{M}$ ) a lo largo del experimento. Las líneas discontinuas indican la zona libre de células al comienzo del experimento. *Apig.*: apigenina potásica.

Al igual que ocurrió con la línea celular TRAMP-C1, las células de la línea PNT2 próximas a la región despejada presentaban prolongaciones membranosas, similares a lamelipodios, hacia el área sin células a partir del comienzo del experimento (Fig. 49). Asimismo, también era frecuente observar células, aisladas o en pequeños grupos, localizadas en la zona sin células, rodeadas en parte o por completo por las prolongaciones ya descritas (Fig. 49).

La apigenina potásica causó la inhibición de la migración celular en la línea PNT2, que resultó dependiente de la concentración de flavonoide empleada ( $p < 0,001$ ) (Tabla 14, Figs. 50 y 51).

Las células no tratadas cubrieron por completo el área despejada tras 24 horas de ensayo.

La administración de apigenina potásica 25  $\mu\text{M}$  justo al comienzo del experimento inhibió la migración celular de forma significativa al comparar con el control no tratado ( $p < 0,001$ ). Entre las 3 y 12 horas posteriores al inicio del ensayo, la distancia recorrida por estas células fue entre un 3,18% y un 18,65% menor que la distancia de migración de los controles; fue máxima a las 3 horas y mínima a las 12 horas.

La incubación de las células con la concentración menor del flavonoide desde 12 horas antes de empezar el experimento dio resultados muy similares. Desde las 3 a las 15 horas, la distancia migrada por las células tratadas fue entre un 9,16% y un 18,57% menor que la de los controles ( $p < 0,001$ ). No obstante, la comparación con el mismo tratamiento administrado al comienzo del experimento no produjo diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,752$ ).

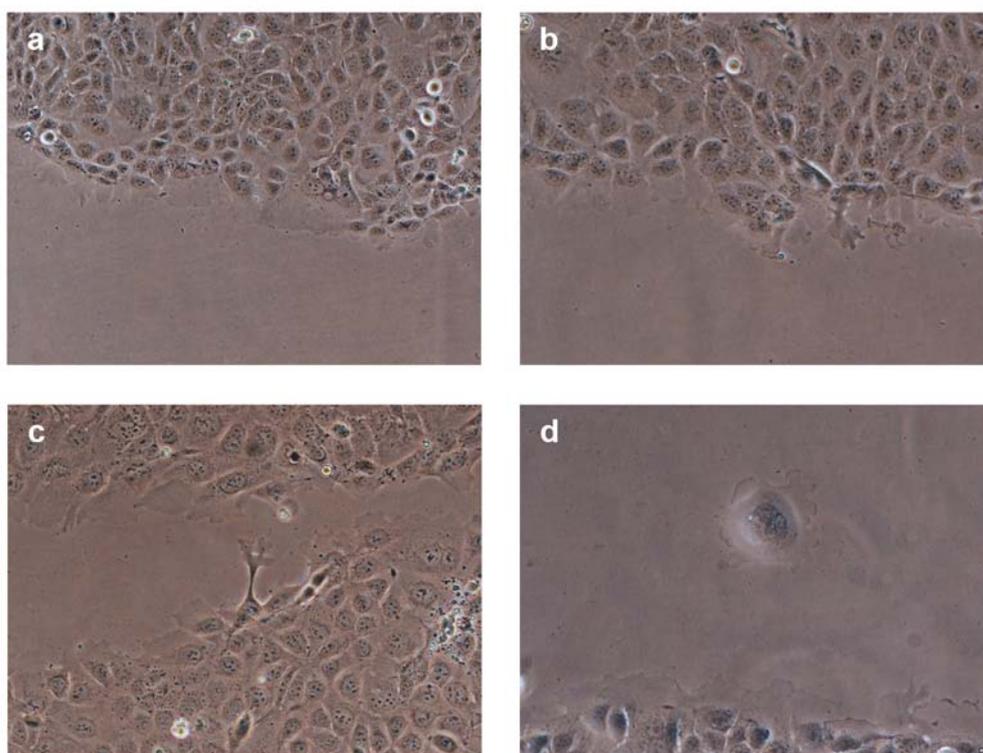
El tratamiento con la concentración intermedia de apigenina potásica (50  $\mu\text{M}$ ) también inhibió significativamente el movimiento celular con respecto a los controles no tratados ( $p < 0,001$ ). En este caso, la distancia de migración fue entre un 1,04% y un 25,22% menor que la de los controles entre las 3 y 15 horas de experimento. La reducción fue máxima a las 3 horas y mínima a las 15 horas.

La incubación de las células desde 12 horas antes del experimento con apigenina potásica 50  $\mu\text{M}$  causó la inhibición de la migración al comparar con las células no tratadas ( $p < 0,001$ ). La distancia recorrida fue entre un 5,12% y un 50,61% menor que la migrada por los controles. Sin embargo, no había diferencias significativas respecto a la administración de la misma dosis justo al comienzo del experimento ( $p = 0,159$ ).

El efecto inhibidor de la migración celular de la apigenina potásica respecto a los controles fue máximo con la mayor concentración (100  $\mu\text{M}$ ) ( $p < 0,001$ ). Entre las 3 y 27 horas desde el comienzo del experimento, la distancia que recorrieron las células tratadas con esta dosis de flavonoide fue entre un 2,75% y un 40,89% menor que la distancia de migración de las células control; al igual que con las concentraciones menores, la reducción de la distancia de migración en comparación con los controles fue máxima a las 3 horas. Fue destacable que no se llegó a cubrir por completo la zona libre de células.

El pretratamiento de las células PNT2 con apigenina potásica 100  $\mu\text{M}$  desde 12 horas antes del comienzo del experimento redujo significativamente la migración celular con respecto a los controles ( $p < 0,001$ ) entre un 2,49% y un 57,76% a lo largo del experimento. Al igual que en el caso anterior, las células tampoco llegaron nunca a cubrir por completo la zona despejada. En este caso, la comparación con la administración de la misma concentración justo al inicio del ensayo sí

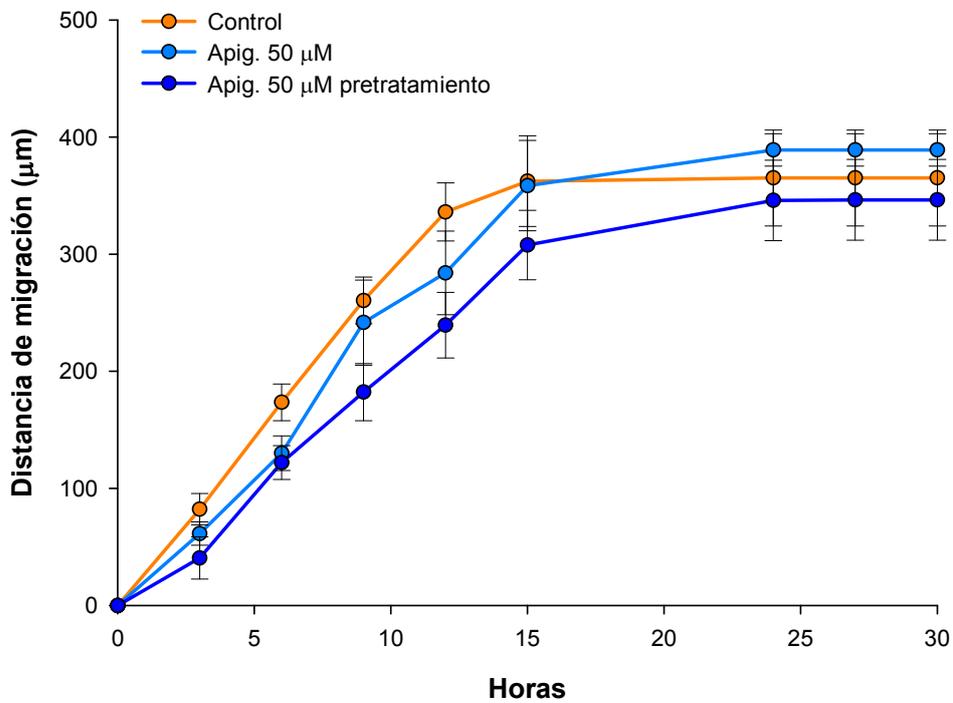
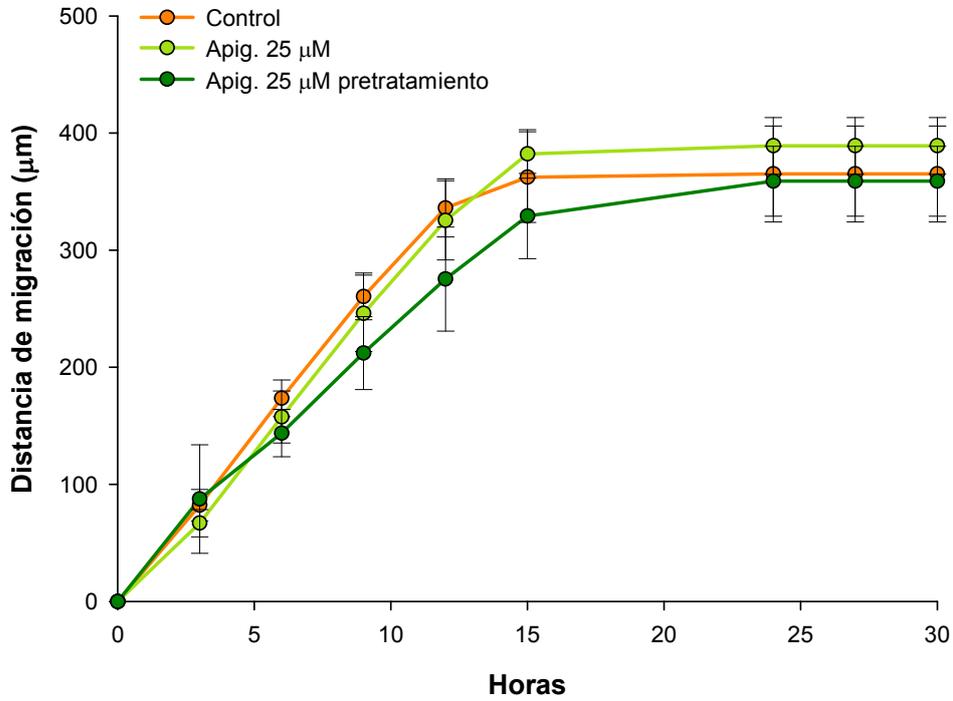
mostró diferencias significativas ( $p < 0,001$ ). Así, entre las 3 y 9 horas posteriores al inicio del experimento la distancia de migración de las células pretratadas fue entre un 5,85% y un 28,53% menor que la recorrida por las células tratadas al comienzo; sin embargo, a partir de las 12 horas las células pretratadas recorrieron entre un 2,51% y un 11,51% más que aquellas a las que se les administró la misma concentración justo al empezar el experimento.

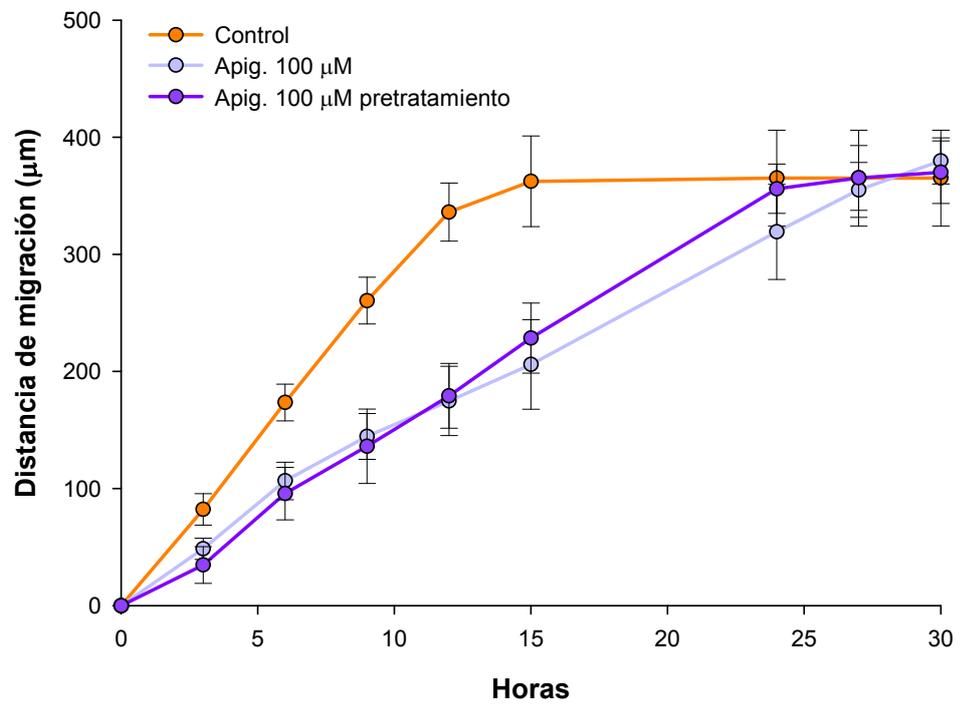


**Figura 51.** Detalles de la migración de la línea PNT2 a lo largo del experimento (contraste de fases; a-c: 150x; d: 200x).

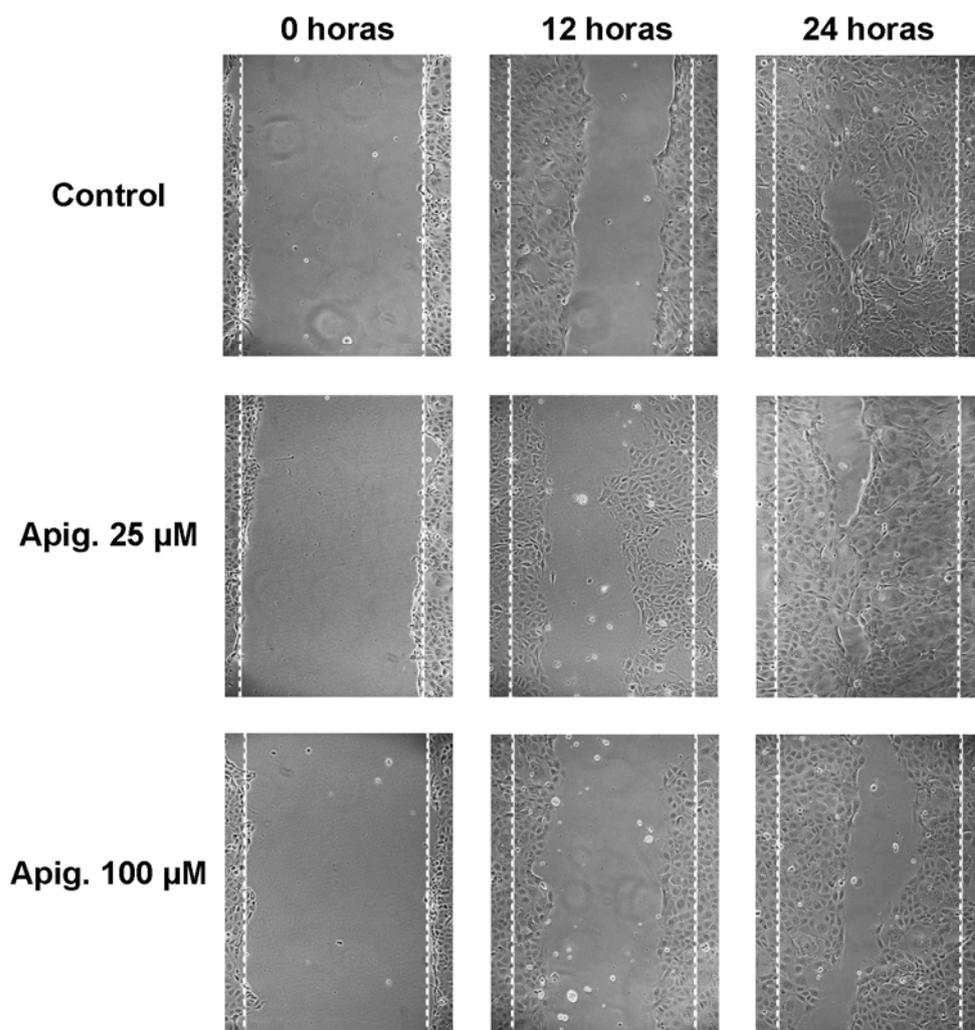
	0 horas	3 horas	6 horas	9 horas	12 horas	15 horas	24 horas	27 horas	30 horas
<b>Control</b>	0±0	82,25±13,38	173,52±15,68	260,51±19,99	336,13±24,85	362,37±38,74	365,1±40,98	365,1±40,98	365,1±40,98
<b>Apig. 25 µM</b>	0±0	66,91±22,17	157,53±22,17	246,1±32,63	325,43±33,78	382,17±20,62	389,12±24,19	389,12±24,19	389,12±24,19
<b>Apig. 25 µM pretrat.</b>	0±0	87,53±46,39	143,79±20,26	212,14±31,11	275,36±44,37	329,18±36,38	358,9±29,85	358,9±29,85	358,9±29,85
<b>Apig. 50 µM</b>	0±0	61,51±9,92	130,08±14,76	241,64±36,35	284,07±35,7	358,58±38,56	388,99±13,87	388,99±13,87	388,99±13,87
<b>Apig. 50 µM pretrat.</b>	0±0	40,62±17,98	122,06±14,5	182,28±24,39	239,35±28,03	307,88±29,62	345,91±34,4	346,42±34,49	346,42±34,49
<b>Apig. 100 µM</b>	0±0	48,62±9,07	106,55±16,05	144,53±19,52	174,81±29,56	205,96±38,21	319,24±40,58	355,06±23,47	379,79±19,69
<b>Apig. 100 µM pretrat.</b>	0±0	34,75±15,66	95,76±22,47	136,08±31,78	179,20±27,75	228,57±29,95	356±21,09	365,27±27,69	370,16±26,7

**Tabla 14.** Distancia de migración (µm; media ± desviación estándar) de la línea celular PNT2 tratada o no con apigenina potásica (25-100 µM); cada valor es la media de ocho medidas. El flavonoide se administró en el momento de comenzar el experimento o 12 horas antes (pretratamiento). *Apig.*: apigenina potásica; *pretrat.*: pretratamiento.





**Figura 50.** Comparación de la distancia de migración de las células de la línea PNT2 no tratadas o tratadas con apigenina potásica (25-100 µM); cada valor es la media de ocho medidas. Barra de error: desviación estándar.



**Figura 51.** Migración de células de la línea PNT2 no tratadas o tratadas con apigenina potásica (25, 100  $\mu\text{M}$ ) a lo largo del experimento. Las líneas discontinuas indican la zona libre de células al comienzo del experimento. *Apig.*: apigenina potásica.

### **Efecto de la apigenina potásica sobre la supervivencia de ratones trasplantados con tumores TRAMP-C1**

**Modelo I:** La inoculación de células TRAMP-C1 subcutáneamente en ratones C57Bl/6 no dio resultados satisfactorios, a pesar de que la línea celular había sido aislada de ratones de esa cepa.

Muy pocos animales desarrollaron tumores, solo un 30%, aproximadamente, porcentaje que se mantuvo sin cambios a pesar de duplicar o triplicar el número de células inoculadas o, incluso, de realizar varias inoculaciones separadas en el tiempo al mismo animal.

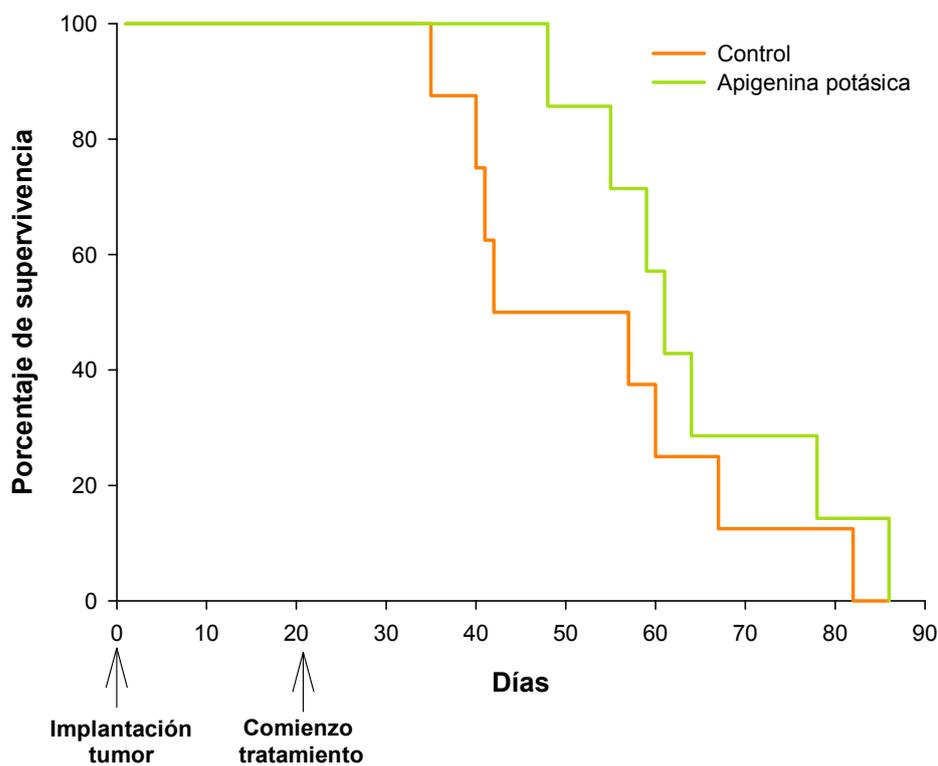
El periodo de latencia del tumor, hasta que este era palpable, resultó también muy variable, desde aproximadamente un mes, en los casos de evolución más rápida, hasta cerca de los 4 meses. Este parámetro, al igual que la tasa de implantación, resultó independiente de la cantidad de células o el número de inoculaciones.

Debido al relativo fracaso de este modelo, se puso en marcha el modelo II, consistente en el trasplante de pequeños fragmentos de uno de los tumores desarrollados mediante la inoculación directa de células TRAMP-C1.

**Modelo II:** Al contrario que en el modelo anterior, la implantación de fragmentos de un tumor desarrollado por inoculación permitió obtener un modelo robusto. Todos los animales desarrollaron tumores bajo la piel del lomo, que resultaron palpables entre los días 20 y 21 tras el trasplante; fue en el día 21 cuando comenzó la administración del tratamiento.

En el grupo de animales no tratados, la vida media fue de 51 días desde la implantación del tumor, con una vida máxima de 82 días (Fig. 52).

El tratamiento con apigenina potásica alargó ambos parámetros; la vida media fue de 61 días, lo que supuso un incremento respecto a los animales control del 45,24%. La vida máxima, por su parte, fue de 86 días, aumentando, por tanto, un 4,88% respecto a los animales no tratados (Fig. 52). No obstante, no se encontró significación estadística ( $p=0,151$ ).



**Figura 52.** Curva de supervivencia de los ratones trasplantados con tumores TRAMP-C1.

### **3. EFECTO LA APIGENINA POTÁSICA FRENTE A RADIACIONES IONIZANTES Y NO IONIZANTES**

#### **Efecto genoprotector de la apigenina potásica frente a la radiación ionizante y en linfocitos humanos**

Las muestras no tratadas ni irradiadas (control) mostraron una frecuencia basal de micronúcleos, expresada como número de micronúcleos (MN) / 500 células bloqueadas (CB), de  $10 \pm 3,09$ . Todas las células positivas, es decir, con micronúcleos, contenían una sola de estas estructuras, excepto una de ellas, que presentaba dos micronúcleos (Tabla 15, Fig. 53).

Al exponer las muestras a 2 Gy de radiación  $\gamma$ , se produjo un aumento significativo de la frecuencia de micronúcleos al comparar con el control no tratado ( $p < 0,001$ ), alcanzando una media de  $26 \pm 7,15$  MN/500 CB. Además, aumentó el número de células positivas que contenían dos (6 células con dos micronúcleos de 250 células positivas) o, incluso, tres micronúcleos (2 células con dos micronúcleos de 250 células positivas).

En las muestras tratadas con apigenina potásica (25  $\mu$ M), la frecuencia de micronúcleos fue de 9 MN/500 CB, lo que no supuso variaciones significativas respecto al control no tratado.

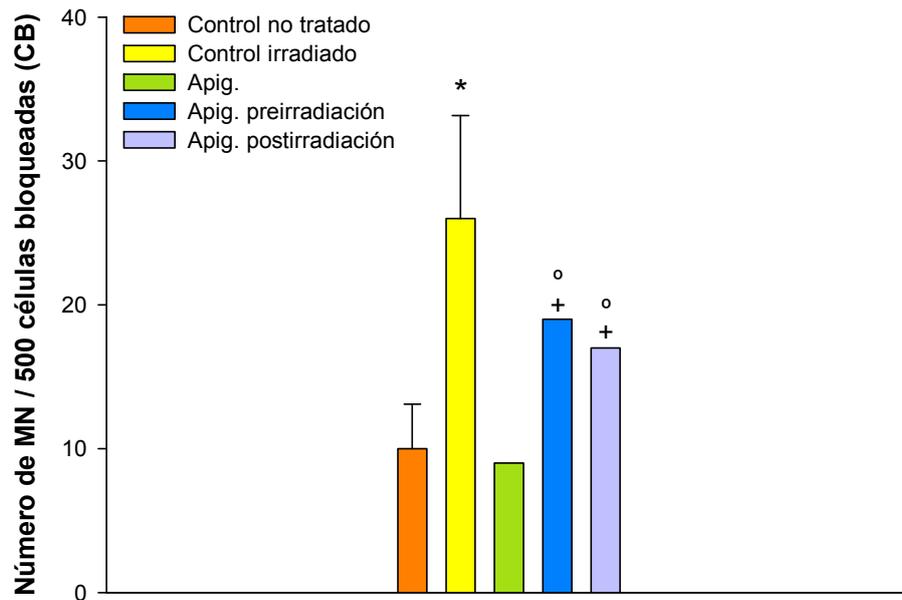
La administración de apigenina potásica 25  $\mu$ M 15 minutos antes de la radiación  $\gamma$  (2 Gy) mostró una frecuencia de 19 MN/500 CB, lo que supuso un aumento significativo respecto a las muestras únicamente tratadas con el flavonoide ( $p < 0,01$ ), pero una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) al comparar con las muestras controles irradiadas con la misma dosis de radiación. Estas muestras

mostraron un factor de protección del 26,92 % (Tabla 15, Fig. 54), y un factor reductor de dosis de 2,52 (Tabla 15, Fig. 55).

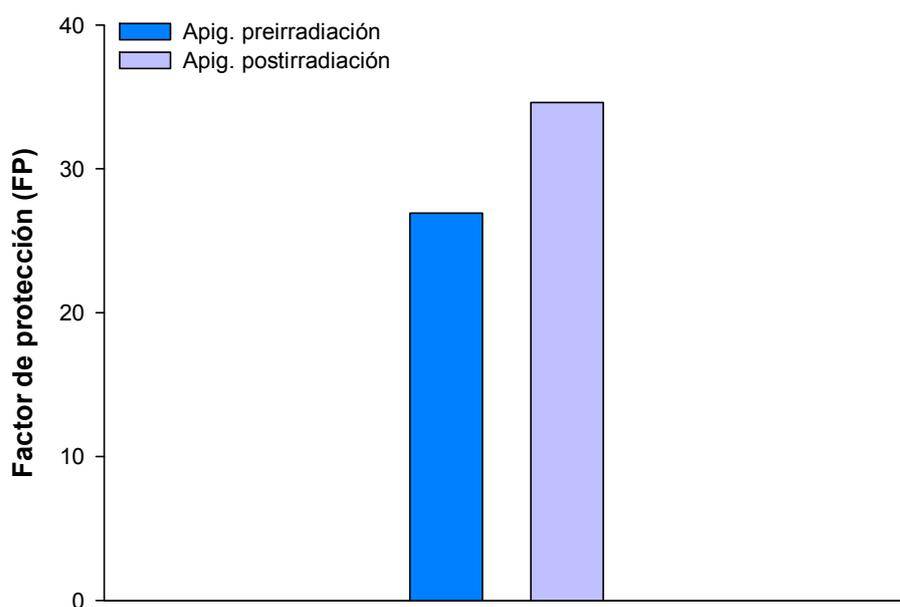
La administración de la apigenina potásica (25  $\mu$ M) tras la radiación causó la aparición de 17 MN/500. Así, provocó un aumento de la frecuencia de micronúcleos respecto a las muestras tratadas únicamente con la flavona ( $p < 0,05$ ) y una disminución significativa respecto a las muestras irradiadas ( $p < 0,001$ ). Con este tratamiento, el factor de protección y el factor reductor de dosis fueron de 34,61 % y 3,01 (Tabla 15. Figs. 54 y 55), respectivamente.

	MN / 500 CB	FP	FRD
Control no tratado	10 $\pm$ 3,09		
Control irradiado	26 $\pm$ 7,15		
Apig.	9		
Apig. preirradiación	19	26,92%	2,52
Apig. postirradiación	17	34,61%	3,01

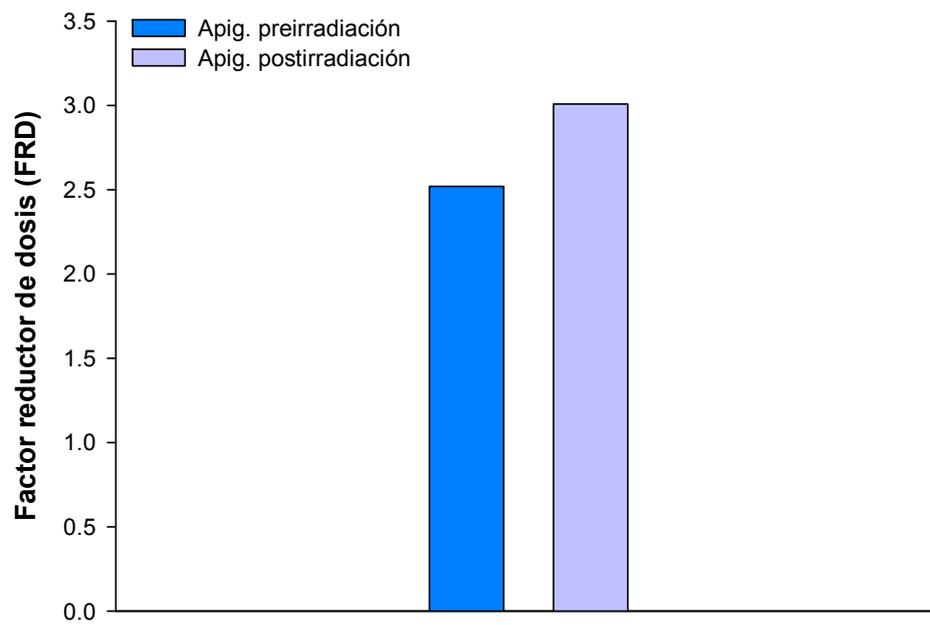
**Tabla 15.** Frecuencia de micronúcleos (número de micronúcleos / 500 células bloqueadas) (media  $\pm$  desviación estándar), factor de protección y factor reductor de dosis de las muestras control, irradiadas (2 Gy) y tratadas con apigenina potásica (25  $\mu$ M), y de las combinaciones de apigenina potásica con radiación  $\gamma$ . *Apig.*: apigenina potásica; *CB*: células bloqueadas en la citoquinesis; *FP*: factor de protección; *FRD*: factor reductor de dosis; *MN*: micronúcleos.



**Figura 53.** Comparación de la frecuencia de aparición de micronúcleos (número de micronúcleos / 500 células bloqueadas) en linfocitos de sangre periférica irradiados o no con radiación  $\gamma$  (2 Gy) y tratados o no con apigenina potásica (25  $\mu$ M) antes o después de la irradiación. Barra de error: desviación estándar. \*: significación estadística respecto al control no tratado ( $p < 0,05$ ); †: significación estadística respecto al control irradiado ( $p < 0,05$ ); °: significación estadística respecto al tratamiento con apigenina potásica. *Apig.*: apigenina potásica; *CB*: células bloqueadas en la citoquinesis; *MN*: micronúcleos.



**Figura 54.** Comparación del factor de protección mostrado por el tratamiento con apigenina potásica (25  $\mu\text{M}$ ) antes o después de la radiación  $\gamma$  (2 Gy). *Apig.*: apigenina potásica; *FP*: factor de protección.



**Figura 55.** Comparación del factor reductor de dosis mostrado por el tratamiento con apigenina potásica (25  $\mu\text{M}$ ) antes o después de la radiación  $\gamma$  (2 Gy). *Apig.*: apigenina potásica; *FRD*: factor reductor de dosis.

### **Efectos de la combinación de apigenina potásica y radiación ionizante X en distintas líneas celulares**

La exposición de la línea celular TRAMP-C1 a rayos X (0-10 Gy) causó la reducción significativa de la viabilidad celular respecto al control ( $p < 0,001$ ), dependiente de la dosis de radiación y del tiempo tras la radiación. La menor dosis de radiación que disminuyó significativamente la viabilidad celular fue la de 4 Gy, tanto a las 24 horas como a las 48 horas, con porcentajes de viabilidad respecto al control de un  $91,55 \pm 11,12 \%$  ( $p < 0,001$ ) y de un  $86,43 \pm 12,57 \%$  ( $p < 0,001$ ), respectivamente. Los daños máximos se produjeron con la dosis mayor, 10 Gy; los porcentajes de viabilidad respecto al control alcanzados con esta dosis fueron de un  $79,94 \pm 7,59 \%$  ( $p < 0,001$ ) a las 24 horas y de un  $71,31 \pm 12,35 \%$  ( $p < 0,001$ ) a las 48 horas (Tablas 16 y 17, Figs. 56 y 57).

La administración de apigenina potásica 20  $\mu\text{M}$  redujo la viabilidad de forma significativa respecto al control no tratado, con un porcentaje de viabilidad de un  $84,14 \pm 12,89 \%$  a las 24 horas ( $p < 0,001$ ) y de un  $80,72 \pm 5,09 \%$  a las 48 horas ( $p < 0,001$ ).

La incubación de la línea TRAMP-C1 con apigenina potásica 20  $\mu\text{M}$  15 minutos antes de la exposición a rayos X no disminuyó significativamente la viabilidad celular respecto a su control, es decir, a las células tratadas con la misma concentración de apigenina potásica. Los porcentajes de viabilidad de la combinación de la apigenina potásica 20  $\mu\text{M}$  con la mayor dosis de radiación (10 Gy) fueron de un  $91,58 \pm 3,32 \%$  ( $p = 0,132$ ) 24 horas después del tratamiento y de un  $95,95 \pm 11,96 \%$  ( $p = 0,406$ ) tras 48 horas (Tablas 16 y 17, Figs. 56 y 57).

Al comparar con el control irradiado, los porcentajes de viabilidad de la combinación de apigenina potásica 20  $\mu\text{M}$  con 4 Gy, 8 Gy y 10 Gy de

radiación tras 24 horas de la exposición fueron significativamente mayores que los de las células únicamente irradiadas ( $p < 0,05$ ,  $p = 0,001$  y  $p < 0,05$ , respectivamente). Únicamente la combinación de apigenina potásica 20  $\mu\text{M}$  con 6 Gy no aumentó la viabilidad celular respecto a las células expuestas a 6 Gy ( $p = 0,067$ ). Tras 48 horas de la exposición a rayos X, la combinación de apigenina potásica 20  $\mu\text{M}$  con rayos X solo aumentó significativamente la viabilidad respecto a los controles irradiados en los tratamientos con apigenina potásica 20  $\mu\text{M}$  con 6 Gy, con 8 Gy y con 10 Gy ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,005$  y  $p < 0,001$ , respectivamente) (Tablas 16 y 17, Figs. 56 y 57). El aumento de la supervivencia celular con la combinación del flavonoide y la radiación respecto a los controles irradiados fue de un 8,45-13,12 % a las 24 horas y de un 12,36-24,64 % a las 48 horas.

El tratamiento con apigenina potásica 40  $\mu\text{M}$  redujo la viabilidad de forma significativa respecto al control no tratado, con un porcentaje de viabilidad de un  $71,05 \pm 10,84$  % a las 24 horas ( $p < 0,001$ ) y de un  $67,53 \pm 15,59$  % a las 48 horas ( $p < 0,001$ ).

Por último, la administración de apigenina potásica 40  $\mu\text{M}$  15 minutos antes de la irradiación provocó una disminución significativa del porcentaje de viabilidad respecto su control, las células tratadas con la misma concentración de apigenina potásica, a las 24 horas de la irradiación, cuando se combinó con 8 y 10 Gy. Los valores de viabilidad de la combinación de apigenina potásica 40  $\mu\text{M}$  con 8 y 10 Gy de radiación X fueron de un  $82,11 \pm 5,72$  % ( $p < 0,005$ ) y  $81,21 \pm 3,44$  % ( $p < 0,0001$ ), respectivamente. No obstante, no se observó una disminución significativa de la viabilidad respecto al control tratado con apigenina potásica 40  $\mu\text{M}$  en los estudios a 48 horas; a las 48 horas de la irradiación, el porcentaje de viabilidad de las células tratadas con apigenina potásica 40  $\mu\text{M}$  e irradiadas con 10 Gy fue de un  $91,26 \pm 8,5$  % ( $p = 0,107$ ) (Tablas 16 y 17, Figs. 56 y 57).

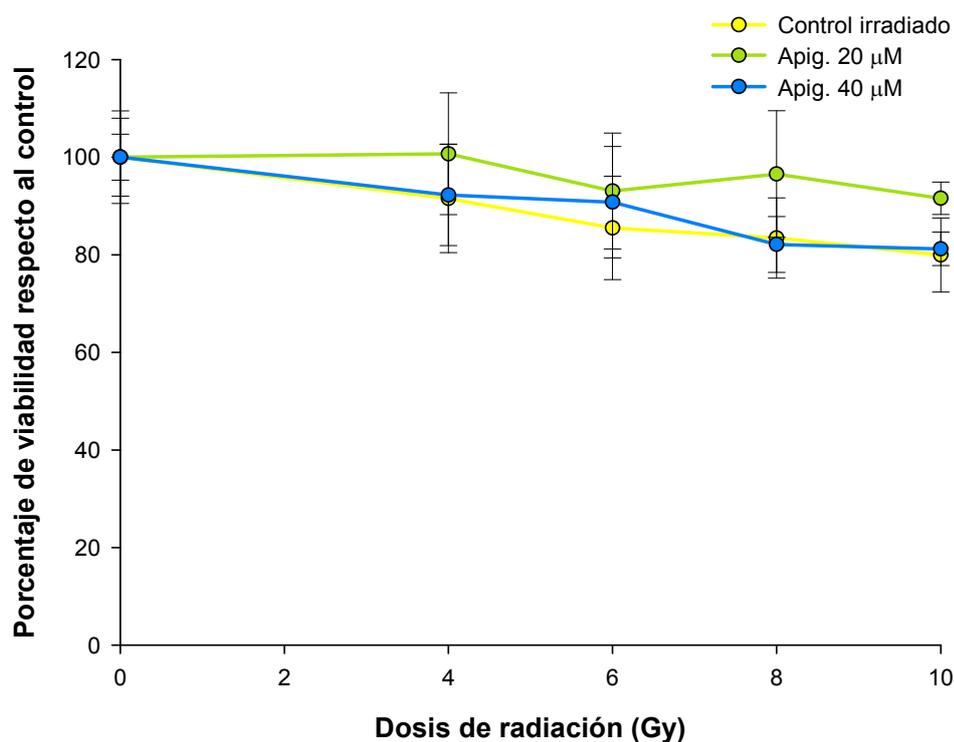
Al comparar la combinación de apigenina potásica 40  $\mu\text{M}$  y las distintas dosis de rayos X con las células únicamente irradiadas tras 24 horas de la exposición, no se observó un aumento significativo de los porcentajes de viabilidad al administrar apigenina potásica 40  $\mu\text{M}$  antes de la irradiación ( $p < 0,0x$ ); el porcentaje de viabilidad celular de la combinación de apigenina potásica 40  $\mu\text{M}$  y 10 Gy a las 24 horas fue de  $81,21 \pm 3,44 \%$  ( $p = 0,761$ ). No obstante, tras 48 horas de la exposición a los rayos X, la combinación de apigenina 40  $\mu\text{M}$  con rayos X aumentó significativamente la viabilidad celular en comparación con el control irradiado ( $p < 0,001$  en todos los casos) (Tablas 16 y 17, Figs. 56 y 57). El aumento de la supervivencia celular causado por la combinación de la flavona con rayos X respecto a los controles irradiados tras 48 horas de la exposición fue de un 13,57-20,8 %.

El factor de protección, calculado para la combinación de apigenina potásica 20 y 40  $\mu\text{M}$  con 10 Gy de rayos X, fue de 58,03% con la menor concentración de flavonoide y de 6,33% con la concentración mayor, tras 24 horas de la irradiación. Tras 48 horas del tratamiento con apigenina potásica y la irradiación con 10 Gy, el factor de protección fue de 85,89% (20  $\mu\text{M}$ ) y de 69,54% (40  $\mu\text{M}$ ) (Tabla 18, Fig. 58).

Tras 24 horas de la administración del flavonoide y la irradiación con 10 Gy, el factor reductor de dosis fue de 2,56 y de 1,12 para 20 y 40  $\mu\text{M}$ , respectivamente. A las 48 horas, el factor reductor de dosis fue de 9,62 para la menor concentración de apigenina potásica y de 3,82 para la mayor (Tabla 19, Fig. 59).

	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control irradiado	100 ± 7,99	91,55 ± 11,12	85,51 ± 10,6	83,43 ± 8,23	79,94 ± 7,59
Apig. 20 µM	100 ± 9,8	100 ± 12,48	93,07 ± 11,87	96,55 ± 12,96	91,58 ± 3,32
Apig. 40 µM	100 ± 4,7	92,24 ± 10,37	90,79 ± 11,41	82,11 ± 5,72	81,21 ± 3,44

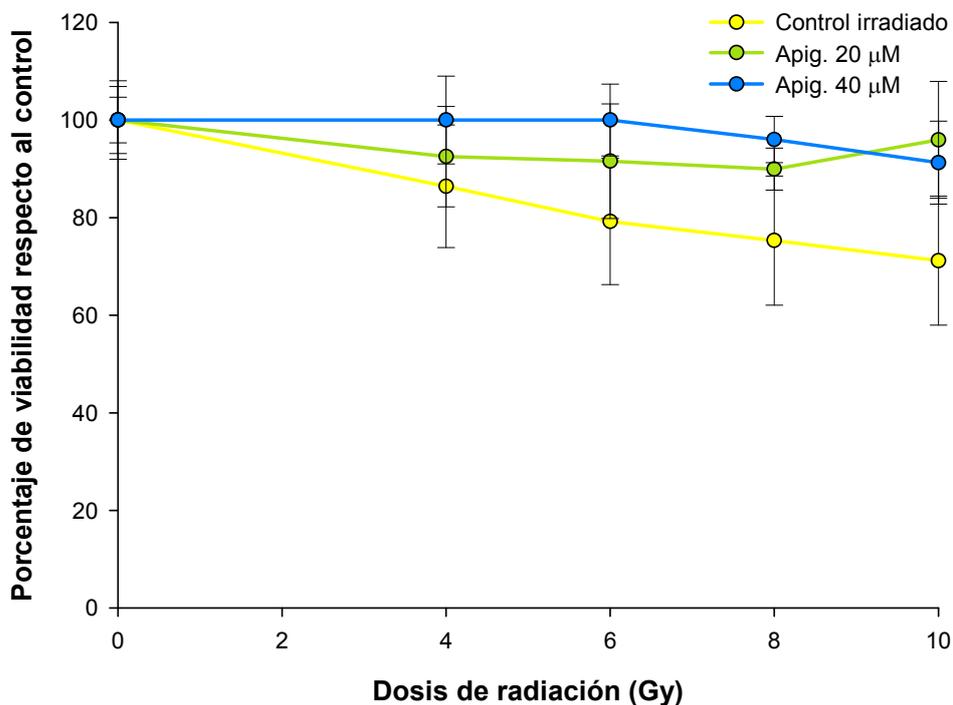
**Tabla 16.** Porcentaje de viabilidad de la línea TRAMP-C1 irradiada (0-10 Gy) y tratada con apigenina potásica (0-40 µM) durante 24 horas respecto al control (media ± desviación estándar); cada valor es la media de, al menos, 12 medidas. *Apig.*: apigenina potásica.



**Figura 56.** Comparación del porcentaje de viabilidad de la línea TRAMP-C1 irradiada con radiación X (0-10 Gy) y tratada con apigenina potásica (0-40 µM) durante 24 horas. Barra de error: desviación estándar. *Apig.*: apigenina potásica.

	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control irradiado	100 ± 6,88	86,43 ± 12,57	79,2 ± 12,93	75,3 ± 13,23	71,31 ± 12,35
Apig. 20 µM	100 ± 3,66	92,5 ± 10,29	91,56 ± 11,76	89,94 ± 4,3	95,95 ± 11,96
Apig. 40 µM	100 ± 8,05	100 ± 9	100 ± 7,34	96 ± 4,74	91,26 ± 8,5

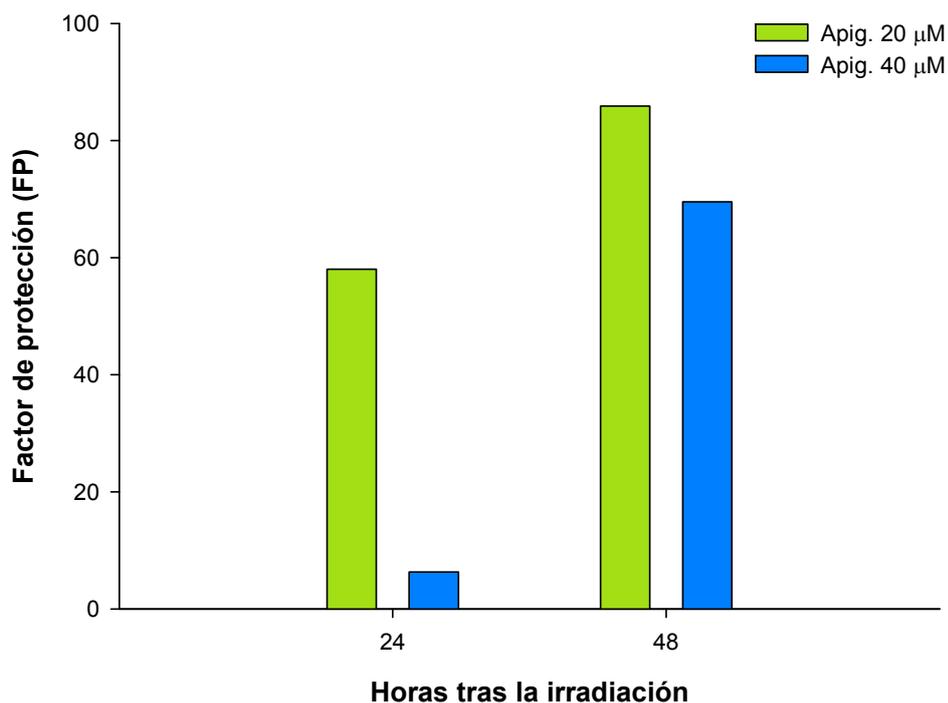
**Tabla 17.** Porcentaje de viabilidad de la línea TRAMP-C1 irradiada (0-10 Gy) y tratada con apigenina potásica (0-40 µM) durante 48 horas respecto al control (media ± desviación estándar); cada valor es la media de, al menos, 12 medidas. *Apig.*: apigenina potásica.



**Figura 57.** Comparación del porcentaje de viabilidad de la línea TRAMP-C1 irradiada con radiación X (0-10 Gy) y tratada con apigenina potásica (0-40 µM) durante 48 horas. Barra de error: desviación estándar. *Apig.*: apigenina potásica.

	24 horas	48 horas
Apig. 20 $\mu$ M + 10 Gy	58,03%	85,89%
Apig. 40 $\mu$ M + 10 Gy	6,33%	69,54%

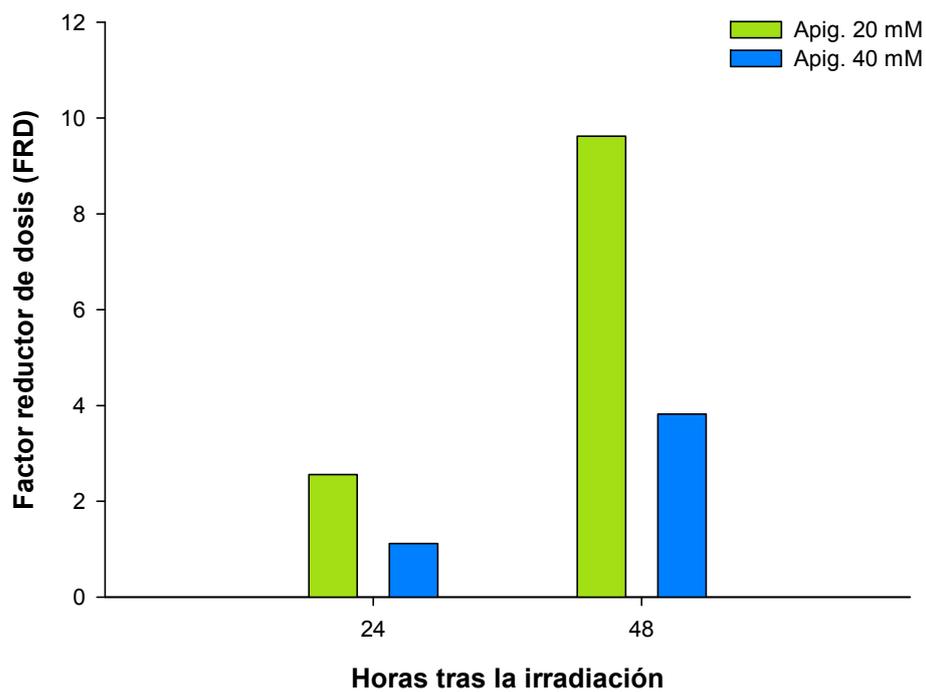
**Tabla 18.** Factor de protección de la combinación de apigenina potásica (20-40  $\mu$ M) con 10 Gy de radiación X sobre la línea TRAMP-C1, tras 24 y 48 horas de la irradiación. *Apig.*: apigenina potásica.



**Figura 58.** Comparación del factor de protección de la combinación de apigenina potásica (20-40  $\mu$ M) con 10 Gy de radiación X sobre la línea TRAMP-C1, tras 24 y 48 horas de la irradiación. Barra de error: desviación estándar. *Apig.*: apigenina potásica; *FP*: factor de protección.

	24 horas	48 horas
Apig. 20 $\mu$ M + 10 Gy	2,56	9,62
Apig. 40 $\mu$ M + 10 Gy	1,12	3,82

**Tabla 19.** Factor reductor de dosis de la combinación de apigenina potásica (20-40  $\mu$ M) con 10 Gy de radiación X sobre la línea TRAMP-C1, tras 24 y 48 horas de la irradiación. *Apig.*: apigenina potásica.



**Figura 59.** Comparación del factor reductor de dosis de la combinación de apigenina potásica (20-40  $\mu$ M) con 10 Gy de radiación X sobre la línea TRAMP-C1, tras 24 y 48 horas de la irradiación. Barra de error: desviación estándar. *Apig.*: apigenina potásica; *FRD*: factor reductor de dosis.

La irradiación de la línea celular PNT2 con 0-10 Gy redujo significativamente la viabilidad celular respecto al control no tratado ( $p < 0,001$ ), de forma dependiente de la dosis y del tiempo transcurrido desde la irradiación ( $p < 0,0x$ ). La menor dosis de radiación que disminuyó significativamente la viabilidad celular fue la de 4 Gy, con un porcentaje de viabilidad respecto al control de un  $91,84 \pm 8,63 \%$  ( $p < 0,001$ ) y de un  $85,77 \pm 9,55 \%$  ( $p < 0,001$ ) a las 24 y 48 horas de la exposición, respectivamente. El efecto máximo se produjo con 10 Gy; los porcentajes de viabilidad respecto al control alcanzados con esta dosis fueron de un  $80,59 \pm 5,05 \%$  ( $p < 0,001$ ) y un  $72,93 \pm 7,34 \%$  ( $p < 0,001$ ) a las 24 y 48 horas, respectivamente (Tablas 20 y 21, Figs. 60 y 61).

La administración de apigenina potásica  $20 \mu\text{M}$  no disminuyó significativamente la viabilidad celular respecto al control no tratado tras 24 horas, presentando un porcentaje de viabilidad de un  $97,17 \pm 8,17 \%$  a las 24 horas ( $p = 0,31$ ). Sin embargo, sí la redujo significativamente a las 48 horas, con un porcentaje de viabilidad de un  $89,91 \pm 6,88 \%$  a las 48 horas ( $p < 0,001$ ).

La combinación de apigenina potásica  $20 \mu\text{M}$  con rayos X (4-10 Gy) disminuyó significativamente la viabilidad respecto a su control, las células tratadas con la misma concentración de flavona. Así, tras 24 horas de la exposición a radiación, la combinación de apigenina potásica  $20 \mu\text{M}$  con 6 Gy, con 8 Gy y con 10 Gy mostró porcentajes de viabilidad de  $91,85 \pm 7,95 \%$  ( $p < 0,01$ ),  $90,86 \pm 7,69 \%$  ( $p < 0,01$ ) y  $90,33 \pm 8,71 \%$  ( $p < 0,005$ ). Tras 48 horas, únicamente la combinación de apigenina potásica  $20 \mu\text{M}$  con 10 Gy ( $90,88 \pm 7,61 \%$ ;  $p = 0,005$ ) redujo significativamente la viabilidad celular respecto al control (Tablas 20 y 21, Figs. 60 y 61).

La comparación de los porcentajes de viabilidad de la combinación de apigenina potásica  $20 \mu\text{M}$  con radiación con los datos de las células

únicamente irradiadas mostró un aumento del porcentaje de viabilidad respecto al control irradiado a las 24 horas de la exposición. El incremento de la viabilidad respecto al control irradiado resultó estadísticamente significativo con la combinación del flavonoide 20  $\mu\text{M}$  con 4 Gy ( $p < 0,05$ ), con 8 Gy ( $p < 0,05$ ) y con 10 Gy ( $p = 0,001$ ). Tras 48 horas de la exposición a rayos X, la combinación de apigenina potásica 20  $\mu\text{M}$  con todas las dosis de radiación (4-10 Gy) aumentó significativamente la viabilidad celular respecto a las células controles irradiadas ( $p < 0,001$  en todos los casos) (Tablas 20 y 21, Figs. 60 y 61). El aumento de la supervivencia celular causado por la combinación del flavonoide con rayos X respecto al control irradiado fue de un 6,39-9,74 % a las 24 horas y de un 14,23-17,95 % a las 48 horas.

La administración de apigenina potásica 40  $\mu\text{M}$  redujo significativamente la viabilidad celular respecto al control no tratado, presentando un porcentaje de viabilidad de un  $89,04 \pm 9,54$  % a las 24 horas ( $p < 0,001$ ) y de un  $91,28 \pm 8,1$  % a las 48 horas ( $p = 0,005$ ).

El tratamiento con apigenina potásica 40  $\mu\text{M}$  antes de la radiación no disminuyó significativamente la viabilidad respecto a su control, las células tratadas con apigenina potásica 40  $\mu\text{M}$ , tras 24 horas de la exposición. El porcentaje de viabilidad de las células tratadas con apigenina potásica 40  $\mu\text{M}$  y 10 Gy tras 24 horas fue de un  $94,24 \pm 7,79$  % 24 horas tras la irradiación ( $p = 0,109$ ). Sin embargo, después de 48 horas de la exposición a radiación, el porcentaje de viabilidad de la combinación de apigenina potásica 40  $\mu\text{M}$  con 10 Gy se redujo significativamente respecto al control ( $93,22 \pm 8,22$  %;  $p < 0,05$ ) (Tablas 20 y 21, Figs. 60 y 61).

Al comparar la combinación de apigenina potásica 40  $\mu\text{M}$  con rayos X con el control irradiado, se observó un aumento significativo del

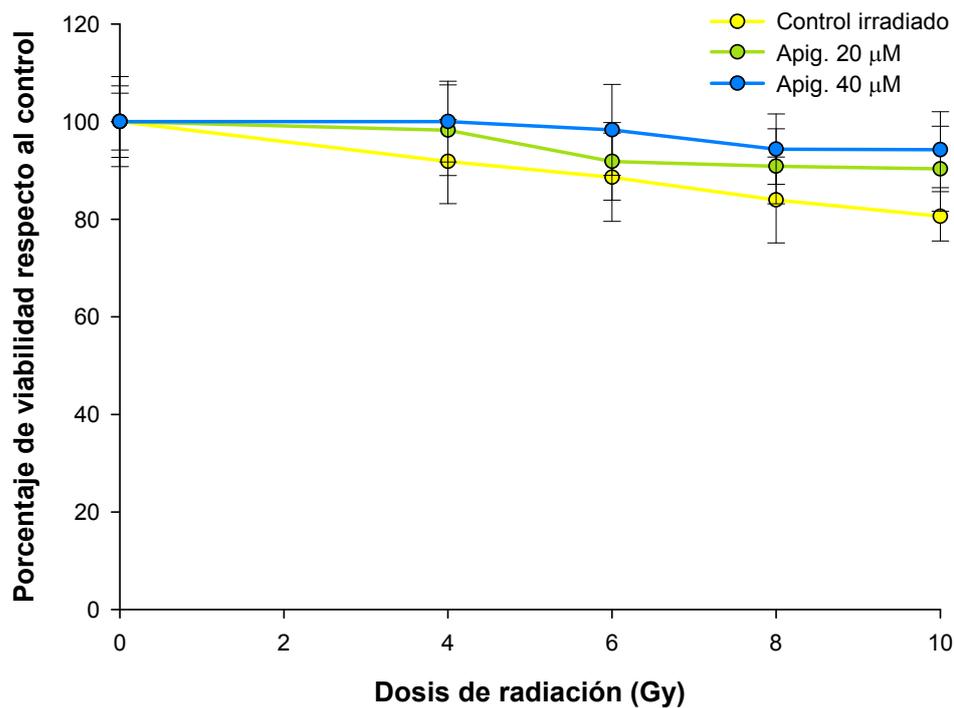
porcentaje de viabilidad con el tratamiento combinado tanto tras 24 horas de la exposición ( $p < 0,05$  para la combinación de la flavona 40  $\mu\text{M}$  con 4 o 6 Gy;  $p = 0,005$  para el tratamiento con apigenina 40  $\mu\text{M}$  y 8 Gy;  $p < 0,001$  para la combinación con 10 Gy), como tras 48 horas ( $p < 0,001$  en todos los casos) (Tablas 20 y 21, Figs. 60 y 61). El aumento de la supervivencia celular de la combinación de flavonoide y rayos X respecto a las células únicamente irradiadas fue de un 8,16-13,65 % y un 14,23-20,29 % a las 24 y 48 horas de la exposición, respectivamente.

Tras 24 horas de la irradiación, el factor de protección para la combinación de apigenina potásica 20 y 40  $\mu\text{M}$  con 10 Gy de rayos X, fue de 50,17% con la menor concentración del flavonoide y de 70,31% con la concentración mayor, tras 24 horas de la irradiación. Tras 48 horas del tratamiento con apigenina potásica y la irradiación con 10 Gy, el factor de protección fue de 65,65% (20  $\mu\text{M}$ ) y de 73,94% (40  $\mu\text{M}$ ) (Tabla 22, Fig. 62).

Tras 24 horas de la administración del flavonoide y la irradiación con 10 Gy, el factor reductor de dosis fue de 2,04 y de 3,44 para 20 y 40  $\mu\text{M}$ , respectivamente. A las 48 horas, el factor reductor de dosis fue de 3,46 para la menor concentración de apigenina potásica y de 4,93 para la mayor (Tabla 23, Fig. 63).

	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control irradiado	100 ± 5,83	91,84 ± 8,63	88,59 ± 9,05	83,95 ± 8,79	80,59 ± 5,05
Apig. 20 µM	100 ± 9,21	98,23 ± 9,28	91,85 ± 7,95	90,86 ± 7,69	90,33 ± 8,71
Apig. 40 µM	100 ± 7,33	100 ± 8,25	98,31 ± 9,32	94,34 ± 7,22	94,24 ± 7,79

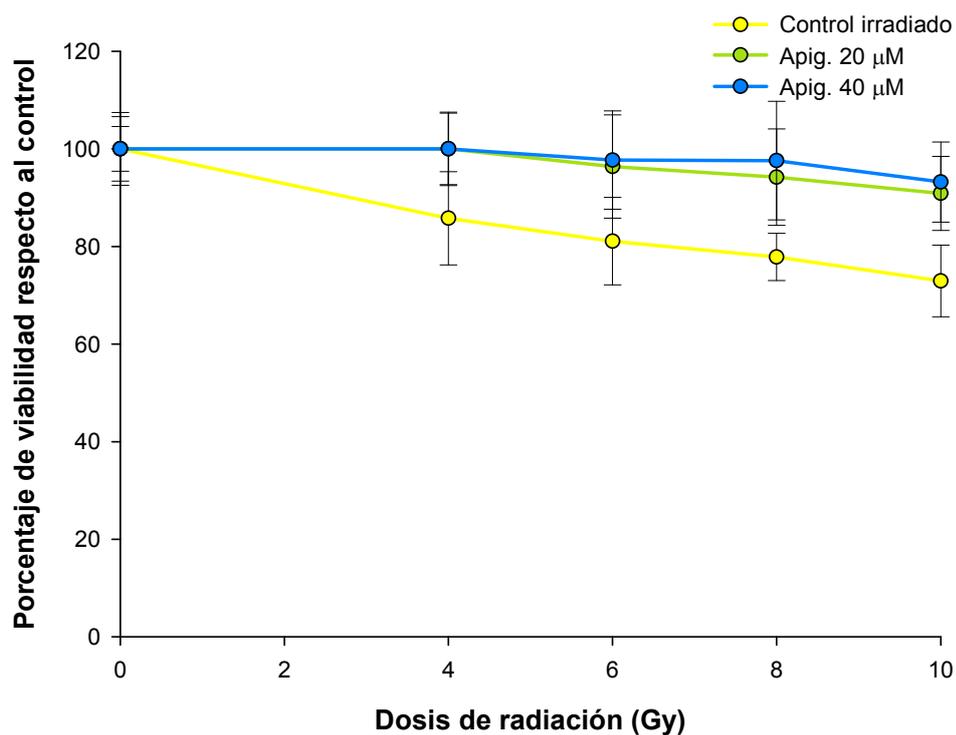
**Tabla 20.** Porcentaje de viabilidad de la línea PNT2 irradiada (0-10 Gy) y tratada con apigenina potásica (0-40 µM) durante 24 horas respecto al control (media ± desviación estándar); cada valor es la media de, al menos, 12 medidas. *Apig.*: apigenina potásica.



**Figura 60.** Comparación del porcentaje de viabilidad de la línea PNT2 irradiada con radiación X (0-10 Gy) y tratada con apigenina potásica (0-40 µM) durante 24 horas. Barra de error: desviación estándar. *Apig.*: apigenina potásica.

	0 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
Control irradiado	100 ± 4,59	85,77 ± 9,55	81,07 ± 8,95	77,85 ± 4,83	72,93 ± 7,34
Apig. 20 µM	100 ± 7,47	100 ± 7,53	96,39 ± 10,59	94,20 ± 9,89	90,88 ± 7,61
Apig. 40 µM	100 ± 6,62	100 ± 7,33	97,71 ± 10,07	97,59 ± 12,15	93,22 ± 8,22

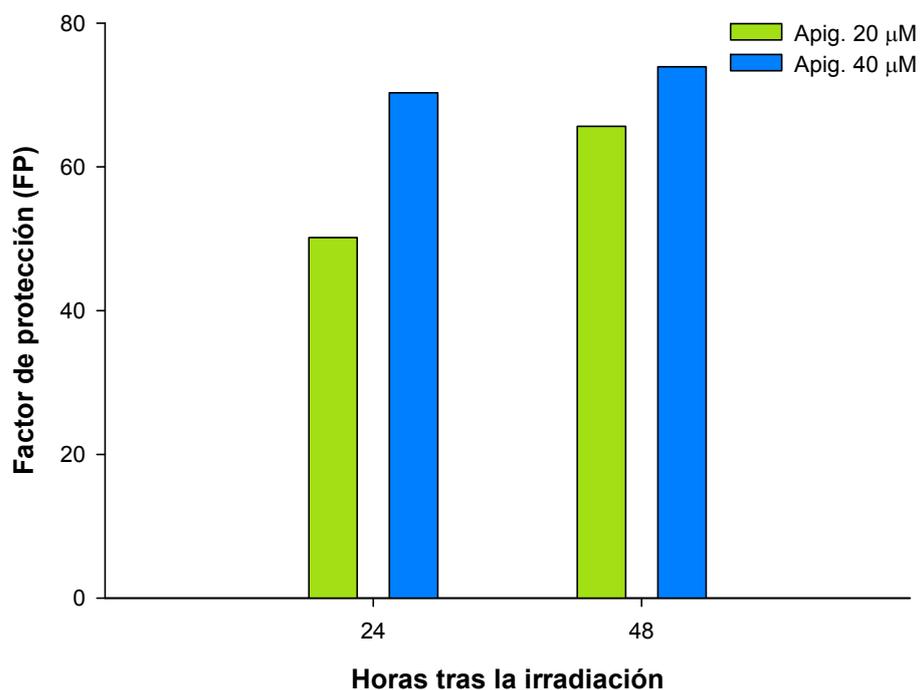
**Tabla 21.** Porcentaje de viabilidad de la línea PNT2 irradiada (0-10 Gy) y tratada con apigenina potásica (0-40 µM) durante 48 horas respecto al control (media ± desviación estándar); cada valor es la media de, al menos, 12 medidas. *Apig.*: apigenina potásica.



**Figura 61.** Comparación del porcentaje de viabilidad de la línea PNT2 irradiada con radiación X (0-10 Gy) y tratada con apigenina potásica (0-40 µM) durante 24 (arriba) y 48 horas (abajo). Barra de error: desviación estándar. *Apig.*: apigenina potásica.

	24 horas	48 horas
Apig. 20 $\mu$ M + 10 Gy	50,17%	65,65%
Apig. 40 $\mu$ M + 10 Gy	70,31%	73,94%

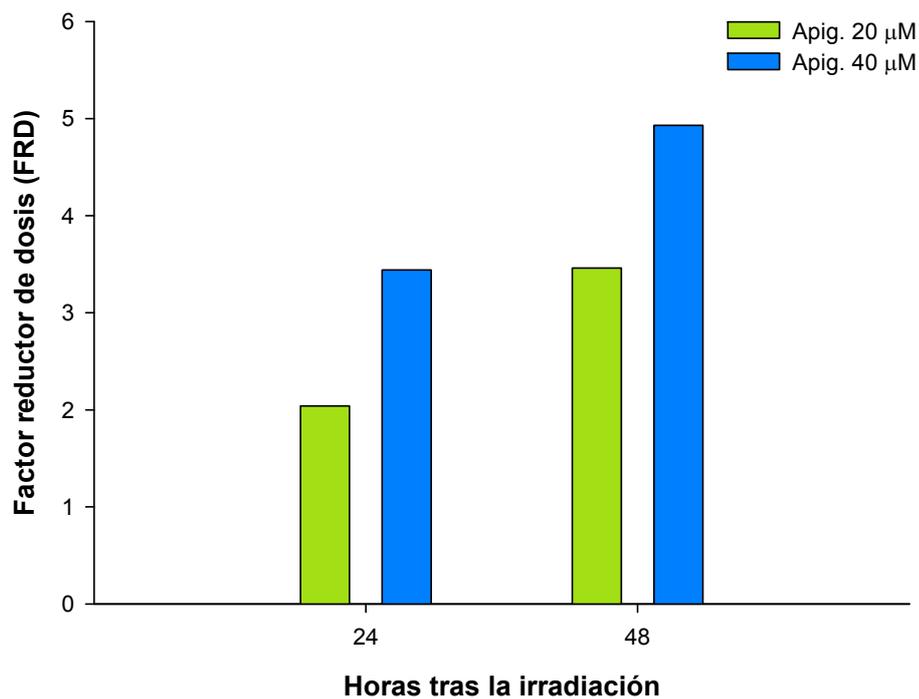
**Tabla 22.** Factor de protección de la combinación de apigenina potásica (20-40  $\mu$ M) con 10 Gy de radiación X sobre la línea PNT2, tras 24 y 48 horas de la irradiación. *Apig.*: apigenina potásica.



**Figura 62.** Comparación del factor de protección de la combinación de apigenina potásica (20-40  $\mu$ M) con 10 Gy de radiación X sobre la línea PNT2, tras 24 y 48 horas de la irradiación. Barra de error: desviación estándar. *Apig.*: apigenina potásica; *FP*: factor de protección.

	24 horas	48 horas
Apig. 20 $\mu$ M + 10 Gy	2,04	3,46
Apig. 40 $\mu$ M + 10 Gy	3,44	4,93

**Tabla 23.** Factor reductor de dosis de la combinación de apigenina potásica (20-40  $\mu$ M) con 10 Gy de radiación X sobre la línea PNT2, tras 24 y 48 horas de la irradiación. *Apig.*: apigenina potásica.



**Figura 63.** Comparación del factor reductor de dosis de la combinación de apigenina potásica (20-40  $\mu$ M) con 10 Gy de radiación X sobre la línea PNT2, tras 24 y 48 horas de la irradiación. Barra de error: desviación estándar. *Apig.*: apigenina potásica; *FRD*: factor reductor de dosis.

## Efecto protector de la apigenina potásica frente al fotoenvejecimiento inducido por radiación UV en ratones

**Estudio macroscópico.** El lomo de los ratones no expuestos a radiación UV presentaba una piel fina, lisa y sin arrugas visibles (Fig. 64).

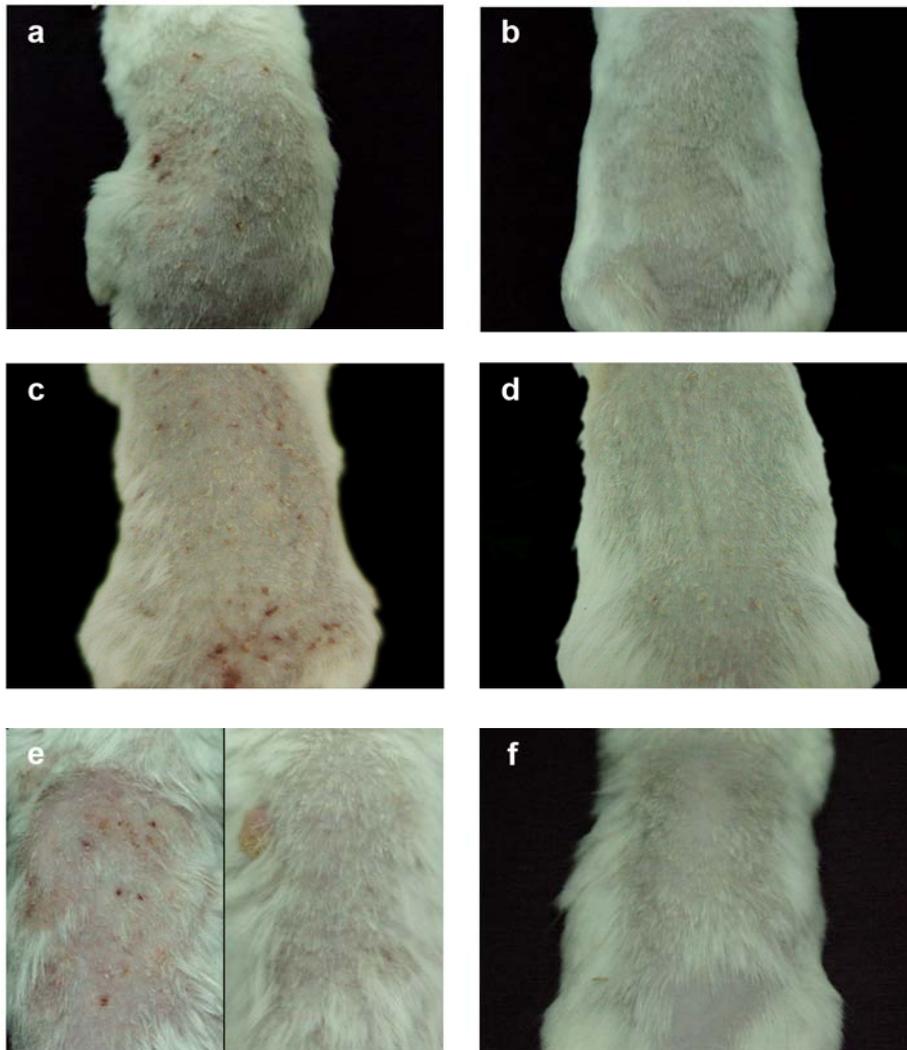


**Figura 64.** Aspecto macroscópico de la piel del lomo de un ratón Swiss no expuesto a radiación UV.

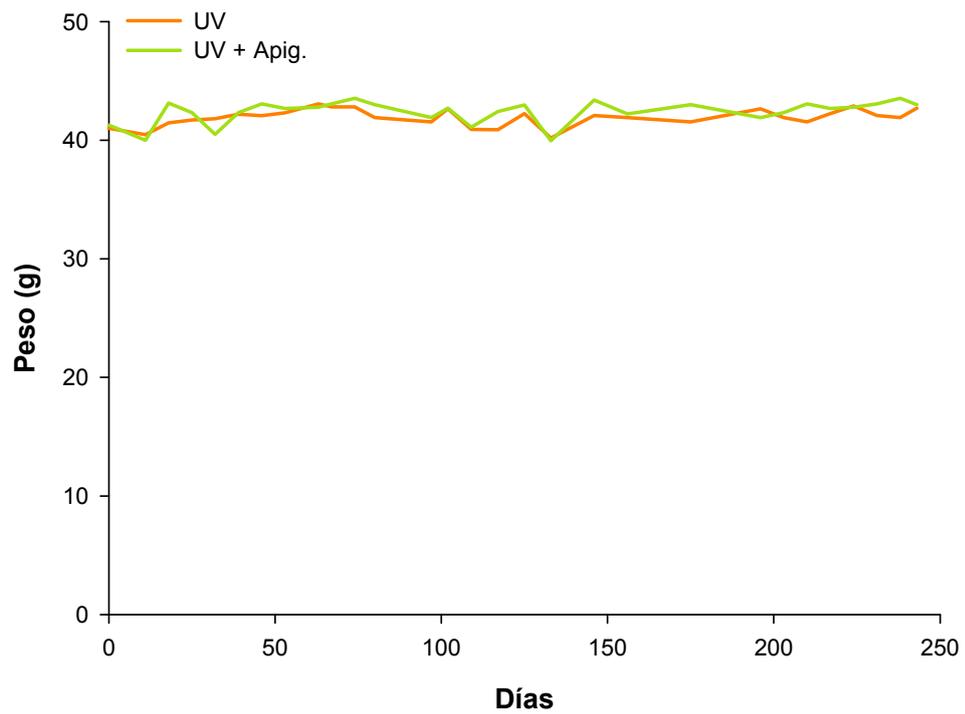
Los **animales expuestos a radiación UV** presentaban eritema en la piel del lomo tras la exposición, que desaparecía a las 2-3 horas; no obstante, pasadas 10-12 sesiones el eritema se hizo permanente. Entre las sesiones 20<sup>a</sup> y 30<sup>a</sup> se desarrollaron zonas de alopecia, con distribución y forma irregulares, a lo largo de toda la piel expuesta a la radiación. En ese periodo también aparecieron arrugas longitudinales, profundas, que recorrían gran parte del lomo de los animales, así como pequeñas lesiones engrosadas, de aspecto queratósico, en ocasiones cubiertas de costras escamosas o hemorrágicas (Fig. 65 a).

Tras 50 horas de exposición, las áreas de alopecia se habían extendido, ocupando la mayor parte de la piel expuesta del lomo; asimismo, las arrugas eran más prominentes. Las lesiones de aspecto queratósico se hicieron más abundantes al avanzar el experimento, aumentando de tamaño e, incluso, confluyendo para formar placas. En torno a la sesión 80<sup>a</sup>, en uno de los animales de este grupo comenzó a desarrollarse una lesión verrucosa en el flanco que llegó a alcanzar un volumen aproximado de 1 x 0,5 x 0,5 cm al final del experimento (Fig. 65 a, c y e).

Los **animales que recibieron apigenina potásica en la dieta** no mostraron variaciones en el peso o el consumo de pienso a lo largo del experimento, lo que indicó que el flavonoide no resultó tóxico (Fig. 66). A los ratones de este grupo, la radiación UV les provocó menos daños que a los del grupo anterior. Al igual que el grupo solamente expuesto, estos animales mostraban eritema tras la radiación que, en las primeras 10-12 sesiones, desaparecía tras unas horas y, posteriormente, se hizo permanente. Los ratones tratados con apigenina potásica también desarrollaron profundas arrugas longitudinales que recorrían todo el lomo, y áreas de alopecia irregulares (sesiones 20<sup>a</sup>-30<sup>a</sup>). Las zonas desnudas fueron aumentando de tamaño a lo largo del experimento de forma similar a lo ocurrido en los animales expuestos a radiación UV. No obstante, a diferencia del grupo irradiado, los animales tratados con apigenina potásica desarrollaron muy pocas lesiones engrosadas de aspecto queratósico, todas de pequeño tamaño, que resultaron visibles en torno a la sesión 50<sup>a</sup> (Fig. 65 b, d y f).



**Figura 65.** Aspecto macroscópico de la piel del lomo de ratones Swiss expuestos a radiación UV y tratados o no con apigenina potásica en la dieta (37,82 mg/kg/día). a) Ratón expuesto a 25 sesiones de radiación UV (1 hora de exposición/sesión; 3 sesiones/semana). b) Ratón expuesto a 25 sesiones de radiación UV y tratado con apigenina potásica. c) Ratón expuesto a 50 sesiones de radiación UV. d) Ratón expuesto a 50 sesiones de radiación UV y tratado con apigenina potásica. e) Ratones expuestos a 100 sesiones de radiación UV. f) Ratón expuesto a 100 sesiones de radiación UV y tratado con apigenina potásica.



**Figura 66.** Evolución del peso medio de los animales expuestos a radiación UV y tratados o no con apigenina potásica (37,82 mg/kg/día) a lo largo del experimento. *Apig.*: apigenina potásica.

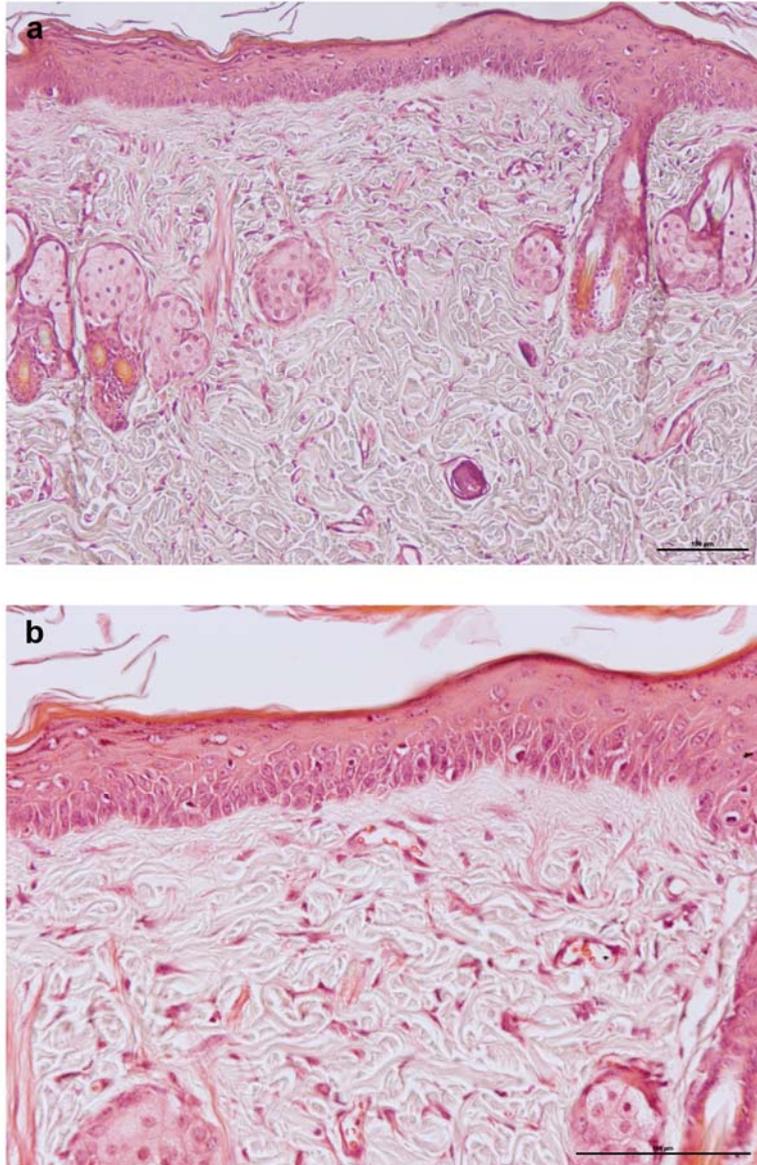
**Estudio microscópico.** Los **animales expuestos exclusivamente a radiación UV** mostraban todos los signos característicos del fotoenvejecimiento. La hiperplasia de las células basales, displasia epitelial de grado I y, en menor medida, de grado II, la hiperplasia de las células basales, la fibrosis de la dermis papilar y la elastosis solar fueron características frecuentes de los animales irradiados (Figs. 67-69).

Tras 25 sesiones, la piel de los animales irradiados mostraba atrofia de la epidermis, alternando con zonas puntuales de acantosis o de epitelio sin alteraciones relevantes; eran abundantes las áreas de hiperplasia de células basales, con displasia leve y pérdida de la polaridad celular (Tabla 24, Fig. 70). La dermis papilar presentaba agregados de fibras (fibrosis) en todo el tejido estudiado, mientras que, en la dermis reticular, las fibras elásticas estaban parcialmente desorganizadas (elastosis de grado I) en la mayor parte del tejido (Tabla 25, Fig. 71). Asimismo, algunos animales presentaban vasodilatación de los vasos sanguíneos dérmicos (Fig. 67).

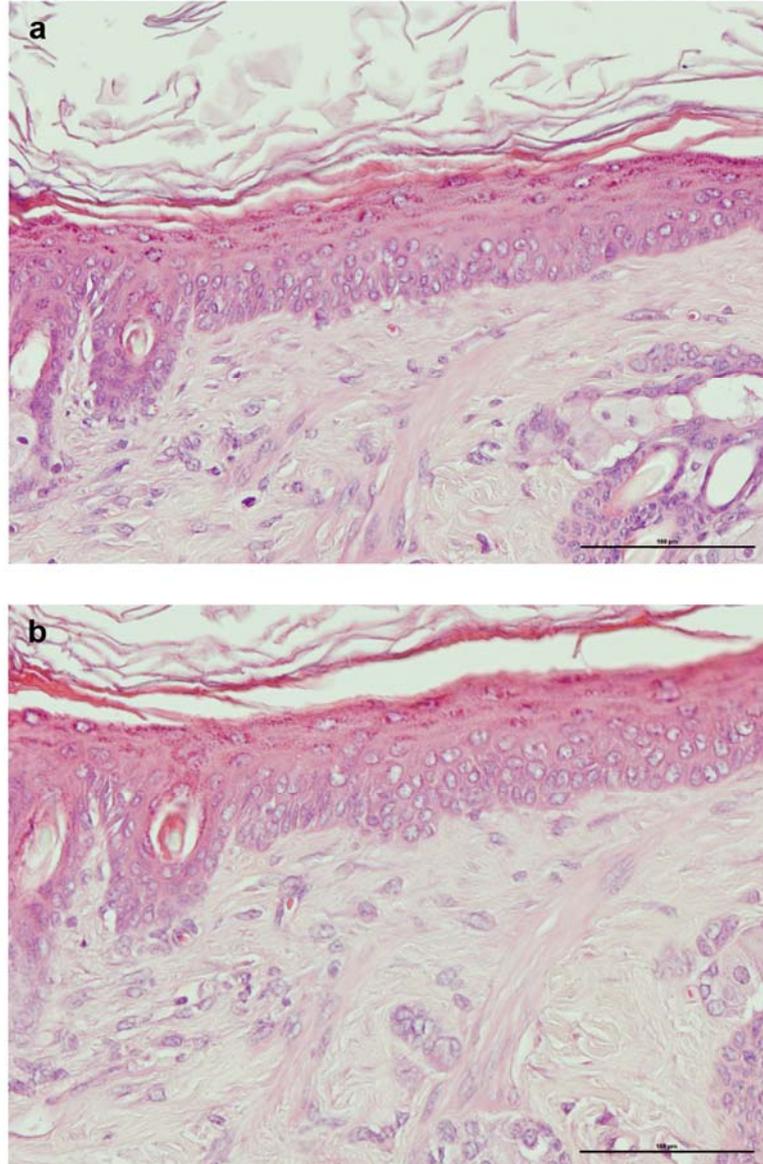
La epidermis de los animales irradiados durante 50 sesiones, al contrario que la de los animales expuestos durante 25 horas, presentaba grandes áreas de acantosis, que ocupaban alrededor de un 50% de la extensión del tejido, con pequeñas zonas de atrofia y de tejido sin alteraciones relevantes en el espesor. Además, al igual que en la sesión 25<sup>a</sup>, se encontraban grandes áreas de hiperplasia de células basales y de pérdida de la polaridad celular. Toda la epidermis mostraba displasia, bien de grado I, bien de grado II; la displasia moderada había aumentado respecto a la sesión 25<sup>a</sup>, ocupando, aproximadamente, un 35% del epitelio (Tabla 24, Fig. 70). De forma similar a lo descrito en los animales expuestos durante 25 horas, la dermis papilar mostraba fibrosis en toda su extensión, mientras que la dermis reticular estaba también alterada, con zonas de acúmulos de elastina (elastosis de grado II), que alternaban con

otras, más extensas, de elastosis de grado I (Tabla 25, Fig. 71). Además, muchos de los vasos sanguíneos dérmicos estaban dilatados (Fig. 68).

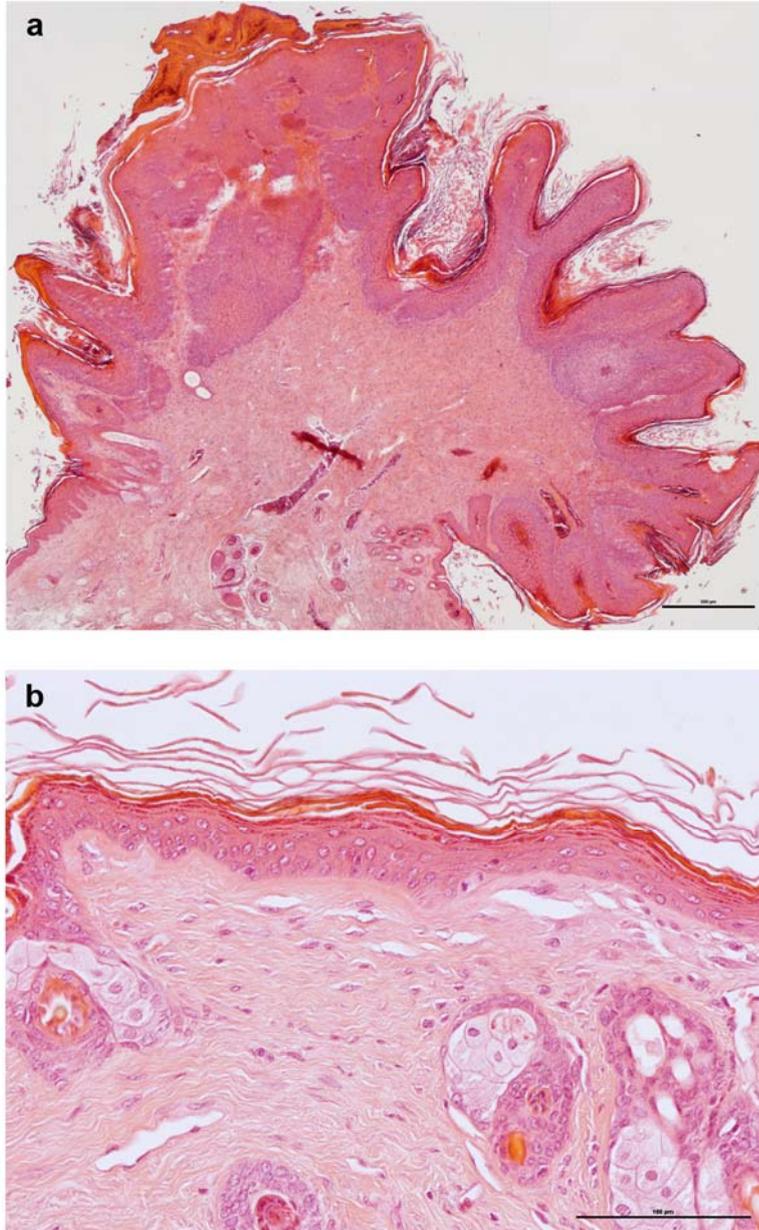
Tras la última sesión (100<sup>a</sup>), la epidermis de los animales expuestos exclusivamente a la radiación UV estaba parcialmente engrosada, con pequeñas zonas de atrofia o sin alteraciones relevantes. La epidermis presentaba amplias áreas de hiperplasia de células basales y, con mayor frecuencia, zonas en las que la polaridad celular se había perdido. Respecto a la displasia, en torno a la mitad del epitelio presentaba displasia moderada, y también era frecuente la displasia leve (Tabla 24, Fig. 70). Todo el tejido mostraba fibrosis de la dermis papilar, mientras que aproximadamente el 75% del tejido presentaba elastosis de grado II en la dermis, con acúmulos de fibras de elastina desorganizadas (Tabla 25, Fig. 71). En estos animales se encontraron zonas ulceradas, en las que no existía continuidad de la epidermis, asociadas a infiltrados inflamatorios, con costras fibrino-necróticas. Además, uno de los animales presentaba un papiloma, mientras que otro había desarrollado un fibroma (Fig. 69).



**Figura 67.** Aspecto microscópico de la piel de los ratones expuestos a 25 sesiones de radiación UV. a) Epitelio engrosado (hiperplasia de células basales, displasia leve, pérdida de polaridad) con fibrosis de la dermis papilar y elastosis de grado I, y dilatación de los capilares dérmicos (H.E., 100x). b) Epitelio engrosado con hiperplasia de células basales, displasia leve, pérdida de polaridad y fibrosis de la dermis papilar (H.E., 200x). Las escalas equivalen a 100  $\mu$ M.



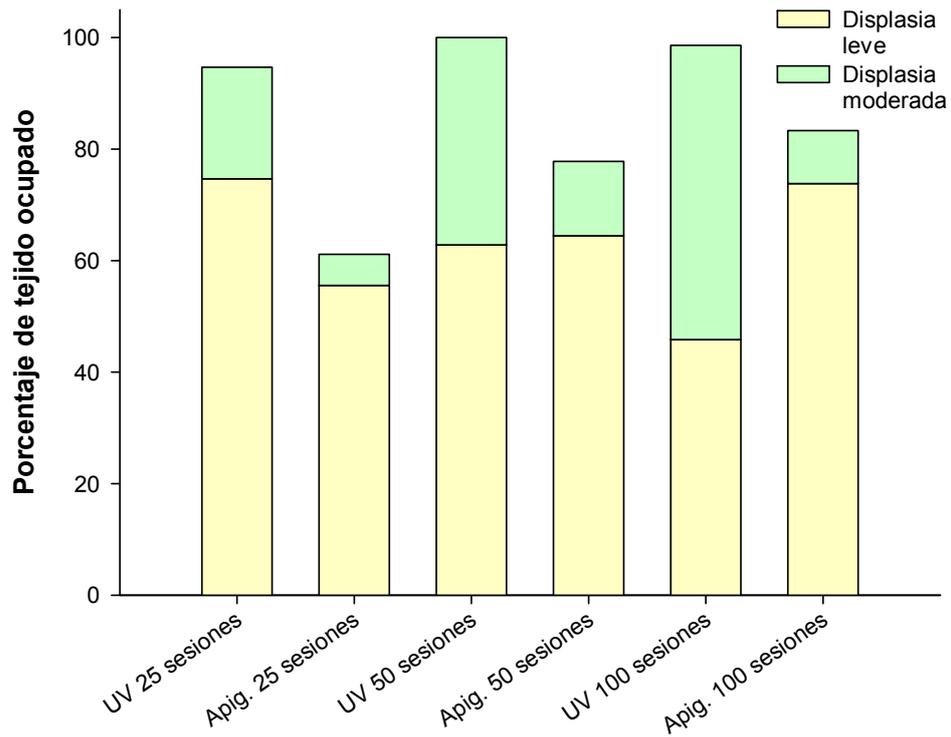
**Figura 68.** Aspecto microscópico de la piel de los ratones expuestos a 50 sesiones de radiación UV. a) Epitelio engrosado con displasia leve-moderada, pérdida de polaridad y fibrosis de la dermis papilar (H.E., 200x) b) Epitelio engrosado con hiperplasia de células basales, displasia leve-moderada, pérdida de polaridad, fibrosis de la dermis papilar y elastosis de grado I (H.E., 200x). Las escalas equivalen a 100 µM.



**Figura 69.** Aspecto microscópico de la piel de los ratones expuestos a 100 sesiones de radiación UV. a) Papiloma (H.E., 40x) b) Epitelio con displasia, pérdida de polaridad y fibrosis de la dermis papilar (H.E., 200x). Las escalas equivalen a 100  $\mu$ M.

		25 sesiones	50 sesiones	100 sesiones
<b>Control UV</b>	<b>Sin displasia</b>	<b>5,33</b>	<b>0</b>	<b>1,39</b>
	<b>Con displasia</b>	<b>94,67</b>	<b>100</b>	<b>98,61</b>
	Displasia I	74,67	62,82	45,83
	Displasia II	20	37,18	52,78
	Displasia III	0	0	0
<b>Apigenina potásica</b>	<b>Sin displasia</b>	<b>38,89</b>	<b>22,22</b>	<b>16,67</b>
	<b>Con displasia</b>	<b>61,12</b>	<b>77,78</b>	<b>83,33</b>
	Displasia I	55,56	64,44	73,81
	Displasia II	5,56	13,33	9,52
	Displasia III	0	0	0

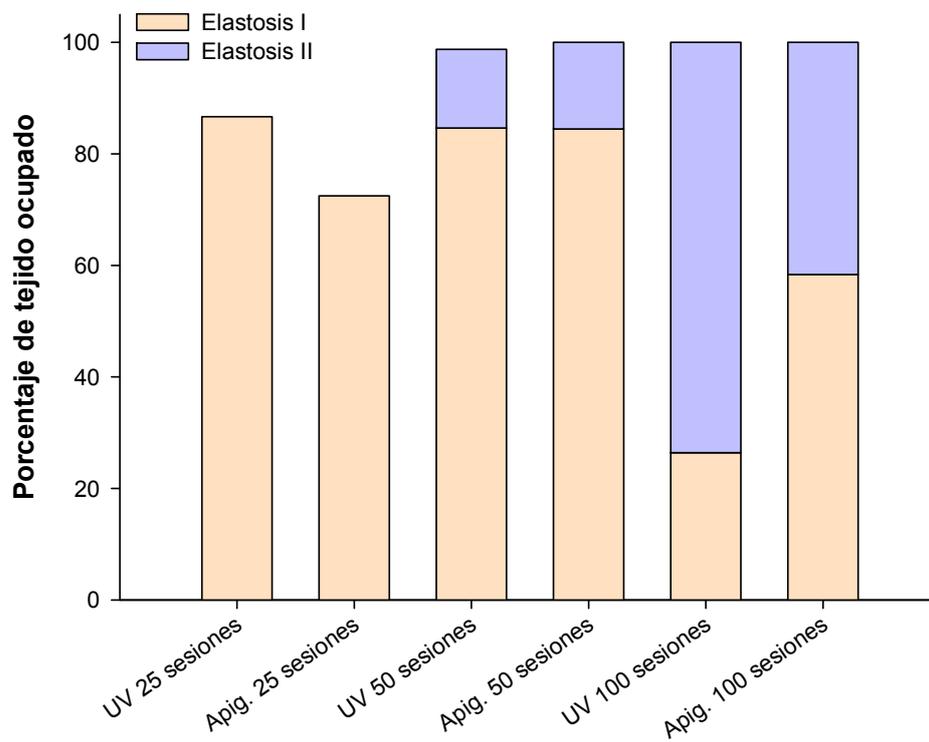
**Tabla 24.** Porcentaje de tejido ocupado por la displasia epitelial en los ratones tratados o no con apigenina potásica (37,82 mg/kg/día) tras 25, 50 y 100 horas de exposición a radiación UV; cada valor es la media de los valores observados en 5 animales, estudiando 5 preparaciones histológicas por cada animal.



**Figura 70.** Comparación del tejido ocupado por la displasia epitelial (grado I y II) en los ratones tratados o no con apigenina potásica (37,82 mg/kg/día) tras 25, 50 y 100 horas de exposición a radiación UV; cada valor es la media de los valores observados en 5 animales, estudiando 5 preparaciones histológicas por cada animal. *Apig.*: apigenina potásica.

		25 sesiones	50 sesiones	100 sesiones
<b>Control UV</b>	<b>Sin elastosis</b>	<b>13,33</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>Con elastosis</b>	<b>86,67</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
	Elastosis I	86,67	84,62	26,39
	Elastosis II	0	14,10	73,61
	Elastosis III	0	0	0
<b>Apigenina potásica</b>	<b>Sin elastosis</b>	<b>27,54</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>Con elastosis</b>	<b>72,46</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
	Elastosis I	72,46	84,44	58,33
	Elastosis II	0	15,56	41,67
	Elastosis III	0	0	0

**Tabla 25.** Porcentaje de tejido ocupado por la elastosis en los ratones tratados o no con apigenina potásica (37,82 mg/kg/día) tras 25, 50 y 100 horas de exposición a radiación UV; cada valor es la media de los valores observados en 5 animales, estudiando 5 preparaciones histológicas por cada animal.



**Figura 71.** Comparación del tejido ocupado por la elastosis solar (grado I y II) en los ratones tratados o no con apigenina potásica (37,82 mg/kg/día) tras 25, 50 y 100 horas de exposición a radiación UV; cada valor es la media de los valores observados en 5 animales, estudiando 5 preparaciones histológicas por cada animal. *Apig.*: apigenina potásica.

En los **animales que recibieron apigenina potásica en la dieta junto con la exposición a radiación UV** las alteraciones eran más leves, aunque mostraban también todo el espectro característico del fotoenvejecimiento (Figs. 72, 73 y 74).

Tras 25 sesiones de radiación UV, la epidermis de los animales tratados con la flavona, al contrario que en los animales irradiados, presentaba zonas engrosadas, de acantosis, y, únicamente en áreas muy pequeñas y aisladas, atrofia epitelial. La epidermis de estos animales también presentaba hiperplasia, con mayor frecuencia que los controles, y displasia leve o, en pocas ocasiones, moderada; tanto la displasia leve como la moderada eran mucho menos frecuentes que en los animales exclusivamente expuestos a radiación (Tabla 24, Fig. 70). La pérdida de polaridad del epitelio era igual de frecuente que en los animales del grupo irradiado. Todas las muestras, de forma similar a lo ocurrido en el grupo irradiado, presentaban fibrosis en la dermis papilar. La dermis reticular presentaba zonas de elastosis de grado I, aunque eran menos frecuentes que en los animales irradiados (Tabla 25, Fig. 71). En un pequeño porcentaje de las muestras, los vasos sanguíneos dérmicos se encontraban dilatados (Fig. 72).

En la sesión 50<sup>a</sup>, la epidermis de estos animales tenía zonas de acantosis y de atrofia, siendo estas más abundantes que tras 25 sesiones de radiación UV; la extensión de cada una de estas lesiones era similar a la que cubrían en los animales expuestos y no tratados. También existían áreas de hiperplasia de células basales, aunque eran menos extensas que en los animales expuestos a 25 sesiones y tratados con apigenina potásica, aunque más que en los animales irradiados. Respecto a la displasia epitelial, tanto de grado I como de grado II, era más frecuente que tras 25 sesiones de radiación; no obstante, aproximadamente un 20% del tejido no presentaba este tipo de alteración (Tabla 24, Fig. 70). Al

---

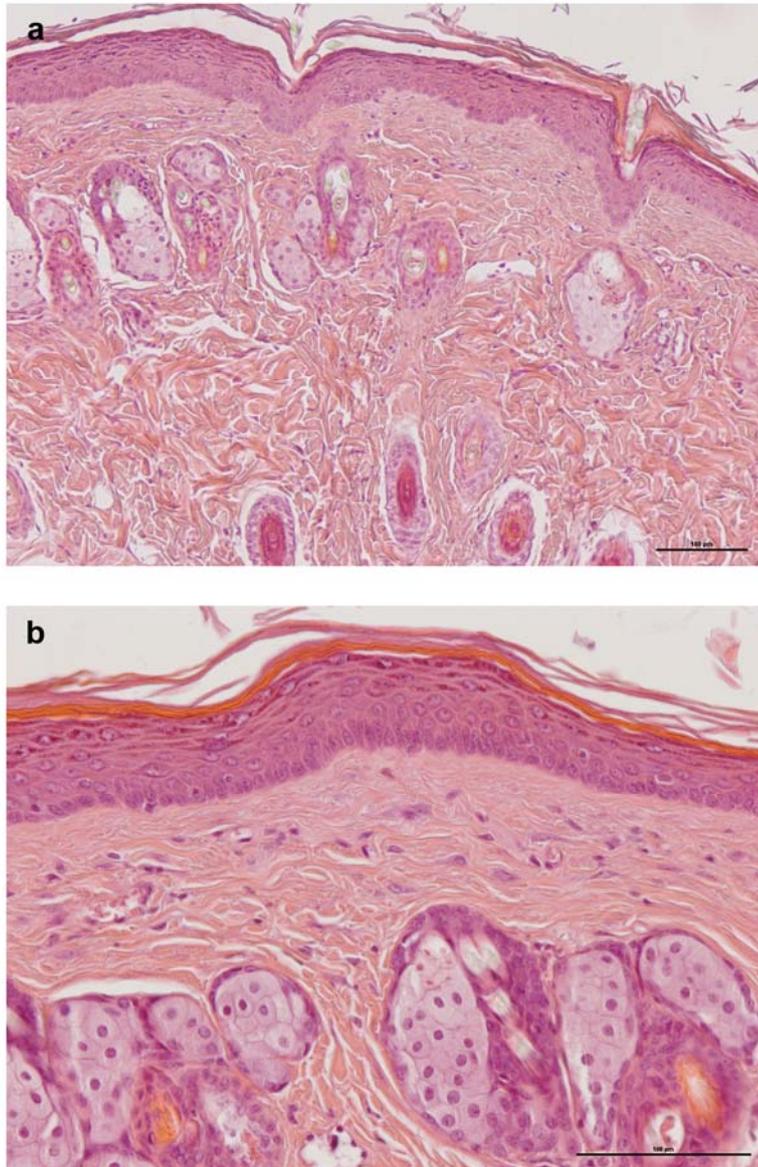
comparar con los ratones expuestos a 50 sesiones y no tratados, la displasia era menos extensa, y la displasia moderada era, aproximadamente, la mitad de frecuente.

Al igual que en los animales tratados con apigenina potásica y expuestos durante 25 horas o que en los ratones expuestos a 50 sesiones, la dermis papilar estaba completamente ocupada por agregados de fibras (fibrosis). Asimismo, la dermis papilar presentaba elastosis de grado I, con zonas de elastosis de grado II, ligeramente más abundantes que en los ratones únicamente irradiados durante 50 sesiones (Tabla 25, Fig. 71). Se observaba un aumento en la vasodilatación de los capilares sanguíneos dérmicos respecto a los animales expuestos a 25 sesiones de radiación y tratados con apigenina potásica (Fig. 73).

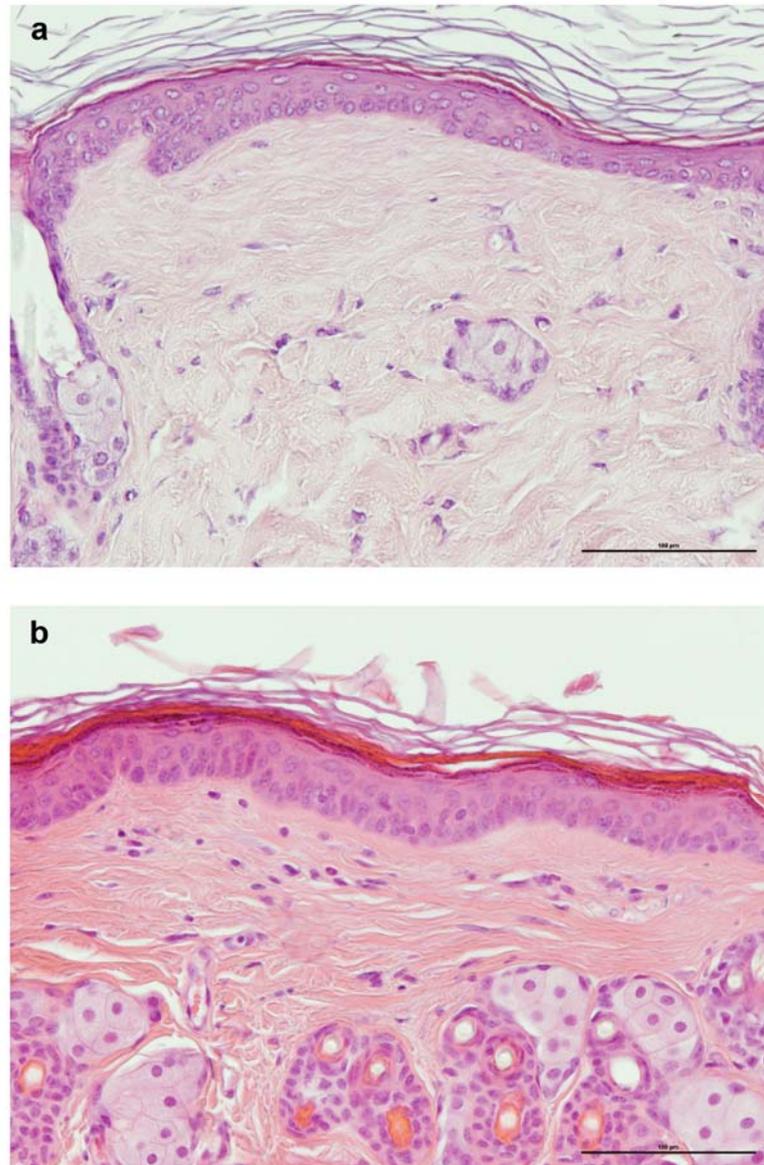
La epidermis de los animales tratados con apigenina potásica y sometidos a 100 sesiones de radiación UV presentaba, con mayor frecuencia, zonas de atrofia, intercaladas con pequeñas áreas de acantosis o de tejido sin alteraciones relevantes; también eran numerosas las regiones con hiperplasia de células basales, que ocupaban una extensión similar a la de los animales expuestos a 50 sesiones. Aunque la mayor parte del tejido, alrededor de un 75%, presentaba displasia, esta era, fundamentalmente, leve, al contrario que lo ocurrido en los animales exclusivamente irradiados (Tabla 24, Fig. 70). Destacaba que el porcentaje de tejido afectado por la displasia no sufrió cambios respecto a los animales tratados con apigenina potásica y expuestos a 50 sesiones, y que, incluso, la displasia moderada disminuyó al comparar con los datos de la sesión 50<sup>a</sup>. En la epidermis, además, existían grandes áreas con pérdida de polaridad celular.

La dermis papilar en este grupo presentaba, al igual que en el grupo únicamente irradiado, fibrosis en toda su extensión. Aunque todo el tejido

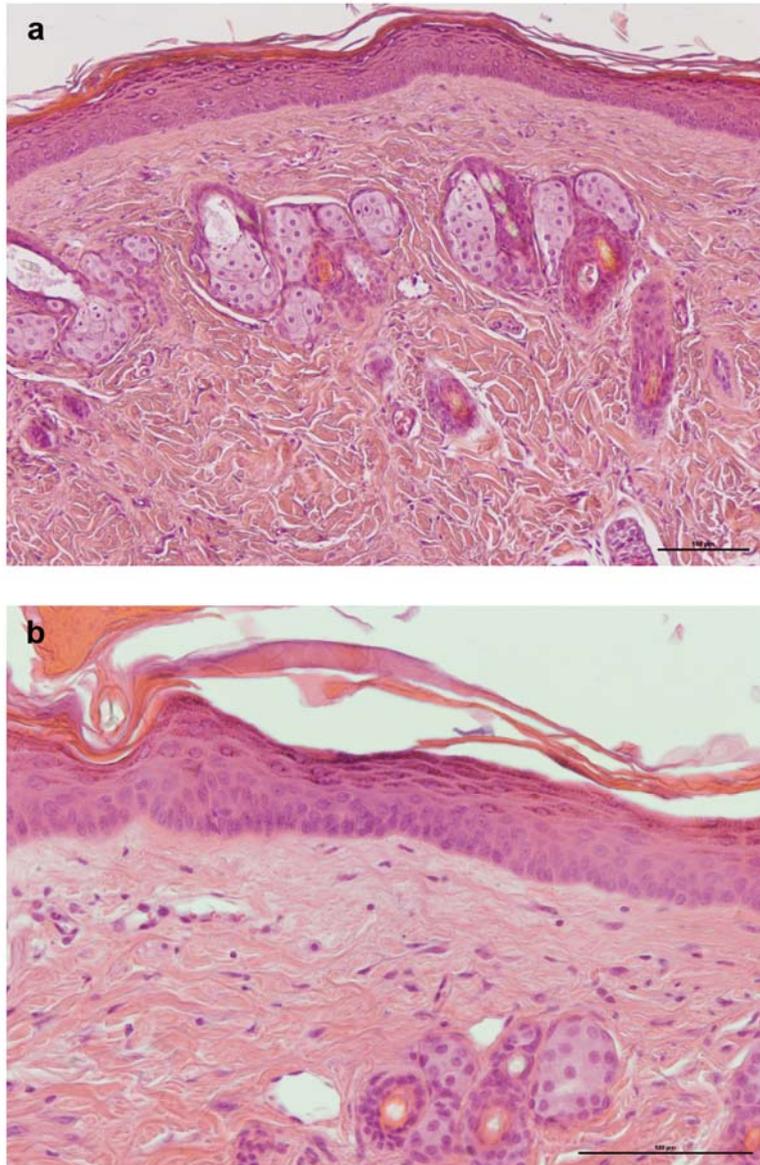
presentaba elastosis, la elastosis de grado II sólo abarcaba, aproximadamente, el 40% del tejido estudiado (Tabla 25, Fig. 71), un porcentaje de tejido mucho menor que el que ocupaba en los animales únicamente irradiados, aunque mayor que el observado en los ratones tratados con apigenina potásica y expuestos a 50 horas de radiación UV (Fig. 74).



**Figura 72.** Aspecto microscópico de la piel de los ratones expuestos a 25 sesiones de radiación UV y tratados con apigenina potásica (37,82 mg/kg/día). a) Epitelio engrosado, con hiperplasia de células basales, pérdida de polaridad, fibrosis de la dermis papilar y elastosis de grado I (H.E., 100x). b) Epitelio engrosado con hiperplasia de células basales, pérdida de polaridad y fibrosis de la dermis papilar (H.E., 200x). Las escalas equivalen a 100 μM.



**Figura 73.** Aspecto microscópico de la piel de los ratones expuestos a 50 sesiones de radiación UV y tratados con apigenina potásica (37,82 mg/kg/día). a) Epitelio con displasia leve y pérdida de polaridad, fibrosis de la dermis papilar y elastosis de grado I (H.E., 200x). b) Epitelio engrosado con hiperplasia de células basales, pérdida de polaridad y fibrosis de la dermis papilar (H.E., 200x). Las escalas equivalen a 100 µM.



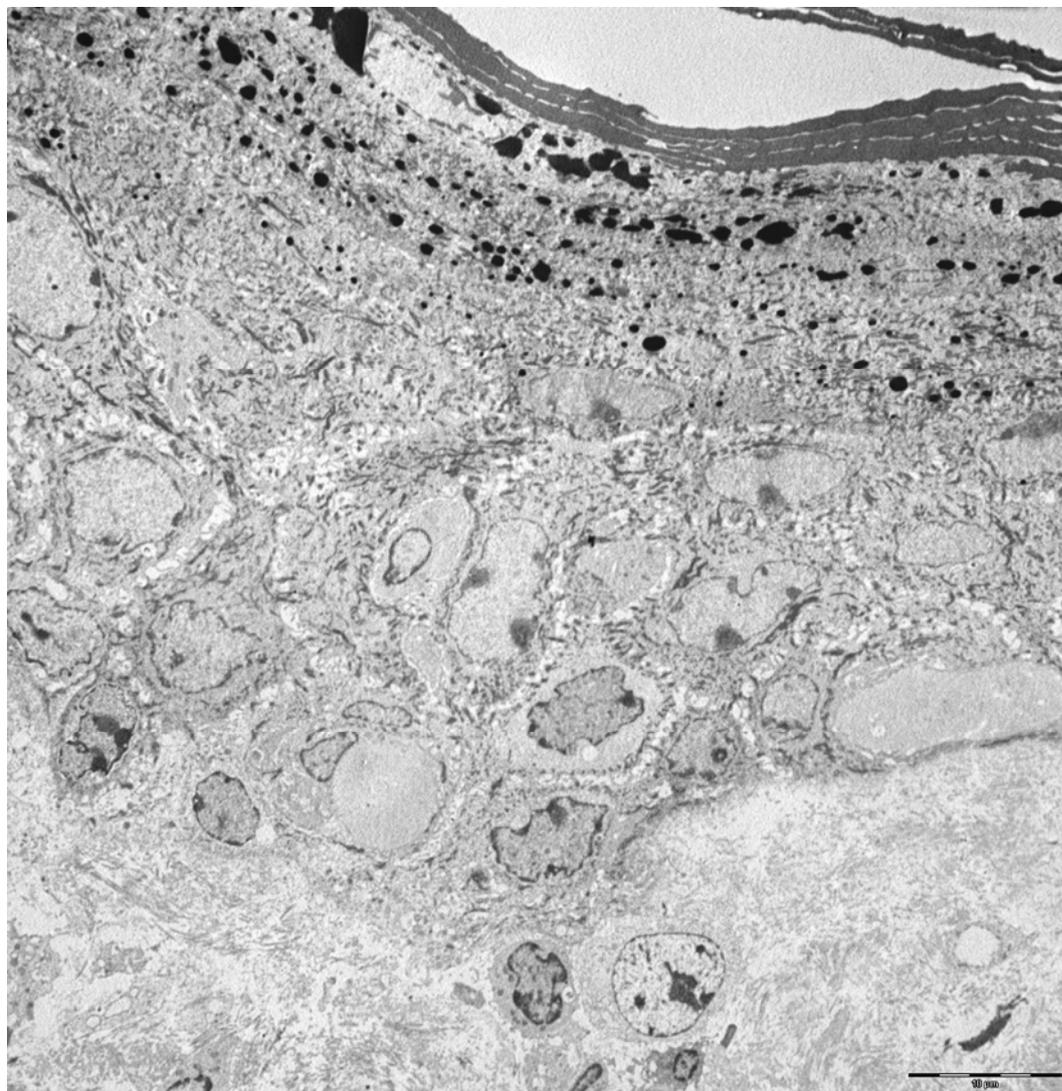
**Figura 74.** Aspecto microscópico de la piel de los ratones expuestos a 100 sesiones de radiación UV y tratados con apigenina potásica (37,82 mg/kg/día). a) Epitelio con hiperplasia de células basales y pérdida de polaridad, fibrosis de la dermis papilar y elastosis de grado I (H.E., 100x). b) Epitelio engrosado con hiperplasia de células basales, pérdida de polaridad, fibrosis de la dermis papilar y elastosis de grado II (H.E., 200x). Las escalas equivalen a 100  $\mu$ M.

**Estudio ultraestructural.** El estudio ultraestructural mediante MET de la piel de animales de ambos grupos mostró alteraciones similares a las observadas mediante microscopía óptica.

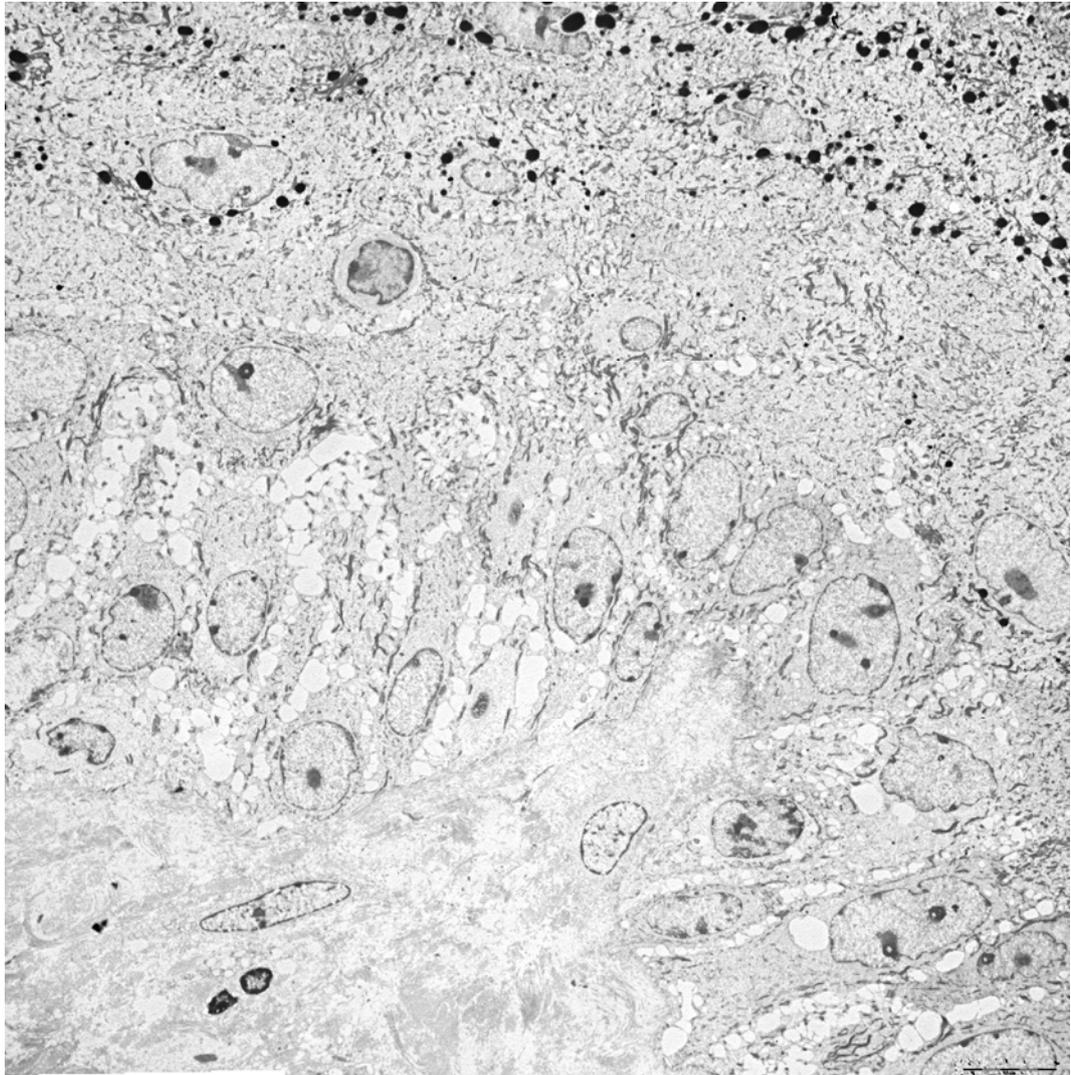
La epidermis de los **animales expuestos únicamente a radiación UV** durante 25 sesiones presentaba desorganización arquitectural y celular moderada. Los queratinocitos mostraban escaso pleomorfismo, con el contorno celular irregular. Los núcleos de las células epiteliales eran irregulares, con uno o dos nucléolos y engrosamiento focal de la heterocromatina (Figs. 75 y 76). El estrato córneo presentaba escasas irregularidades, aunque estaba ligeramente engrosado (Fig. 77).

La dermis mostraba muy pocas alteraciones. Las glándulas mostraban una estructura normal (Fig. 78), al igual que los fibroblastos, que eran abundantes; en ocasiones, se encontraban células sanguíneas adyacentes a ellos (Fig. 79 a). Era frecuente, también, la presencia de mastocitos próximos a otras estructuras (vasos, fibroblastos) o aislados entre las fibras colágenas (Fig. 79 b).

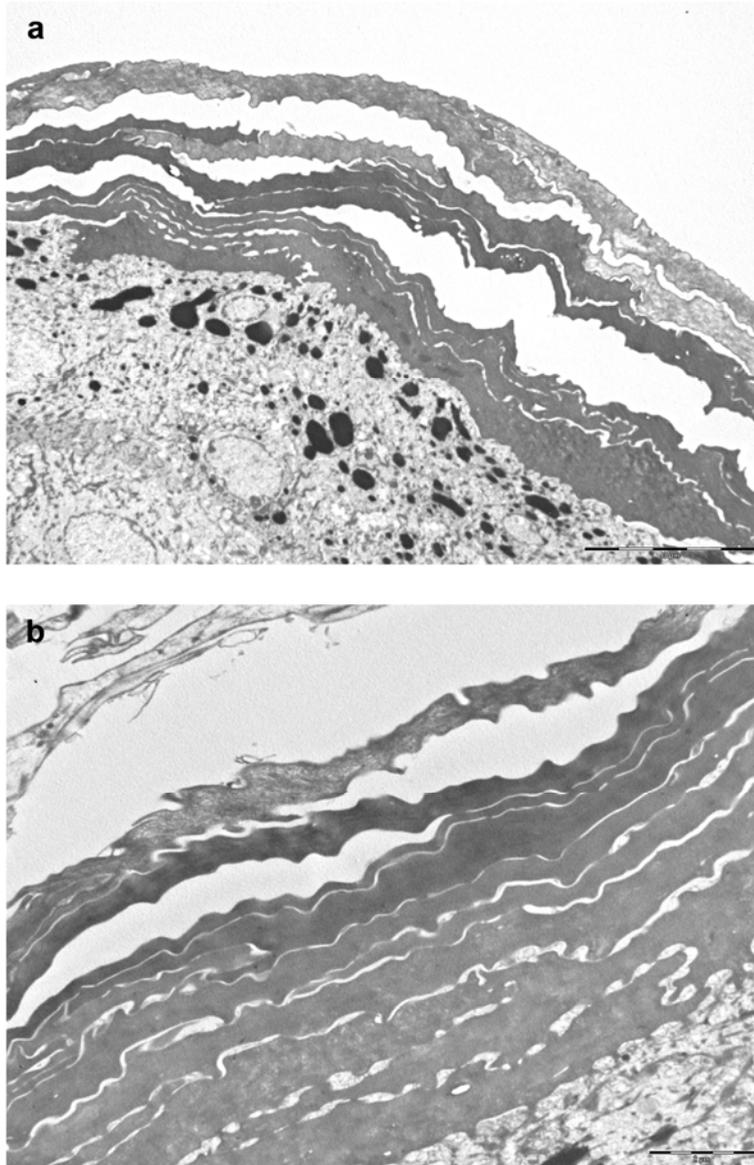
Los vasos sanguíneos dérmicos tampoco presentaban alteraciones estructurales relevantes (Fig. 80).



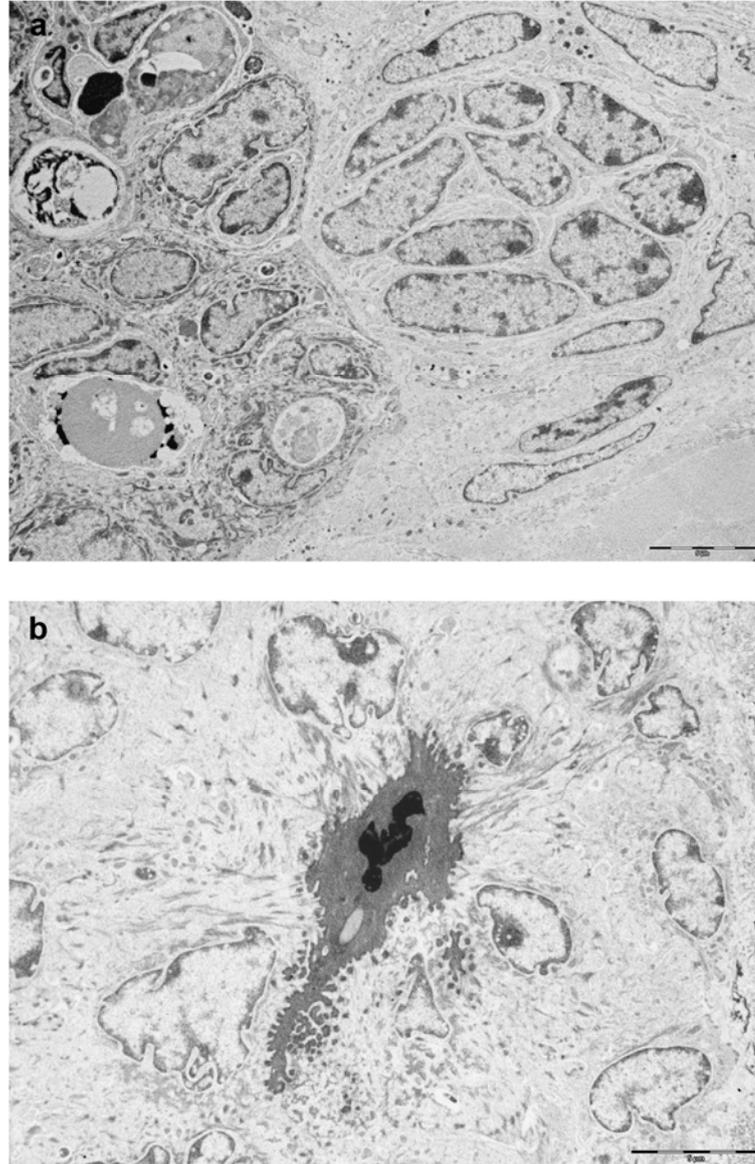
**Figura 75.** Imagen ultraestructural panorámica de la epidermis de los animales expuestos a 25 sesiones de radiación UV (MET, 1450x). La escala equivale a 10  $\mu$ m.



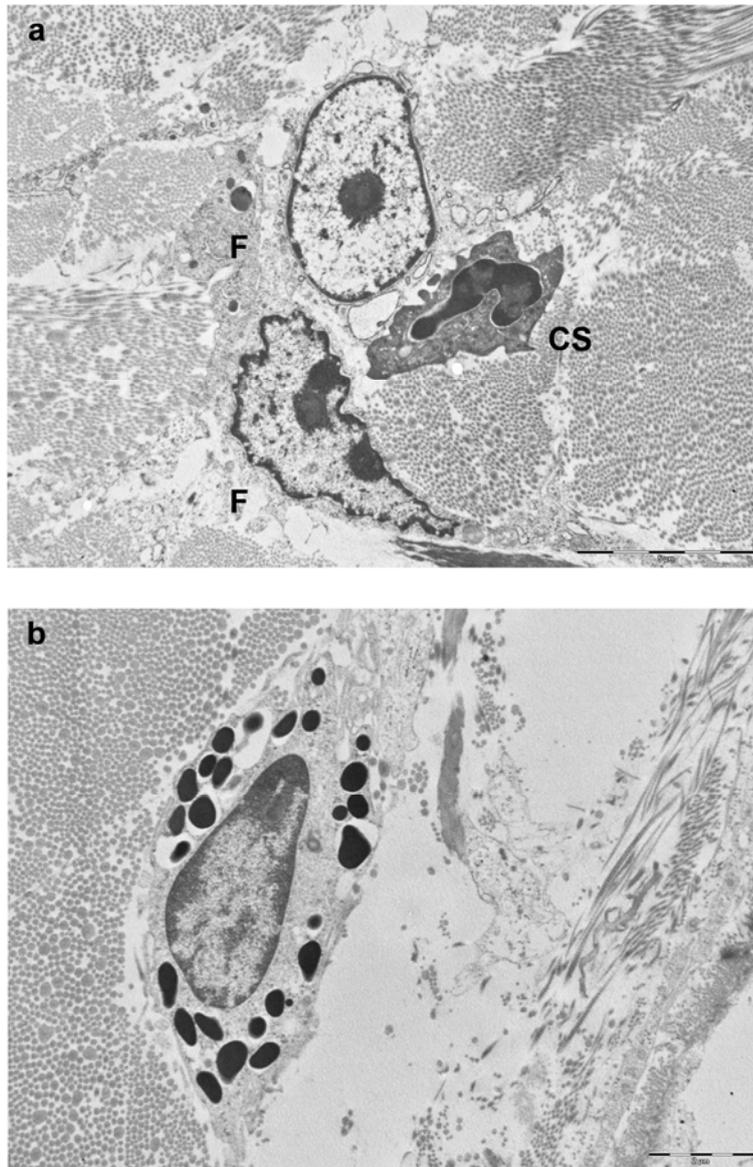
**Figura 76.** Ultraestructura de la epidermis, con mínimas alteraciones, de los animales expuestos a 25 sesiones de radiación UV (MET, 1850x). La escala equivale a 10  $\mu$ m.



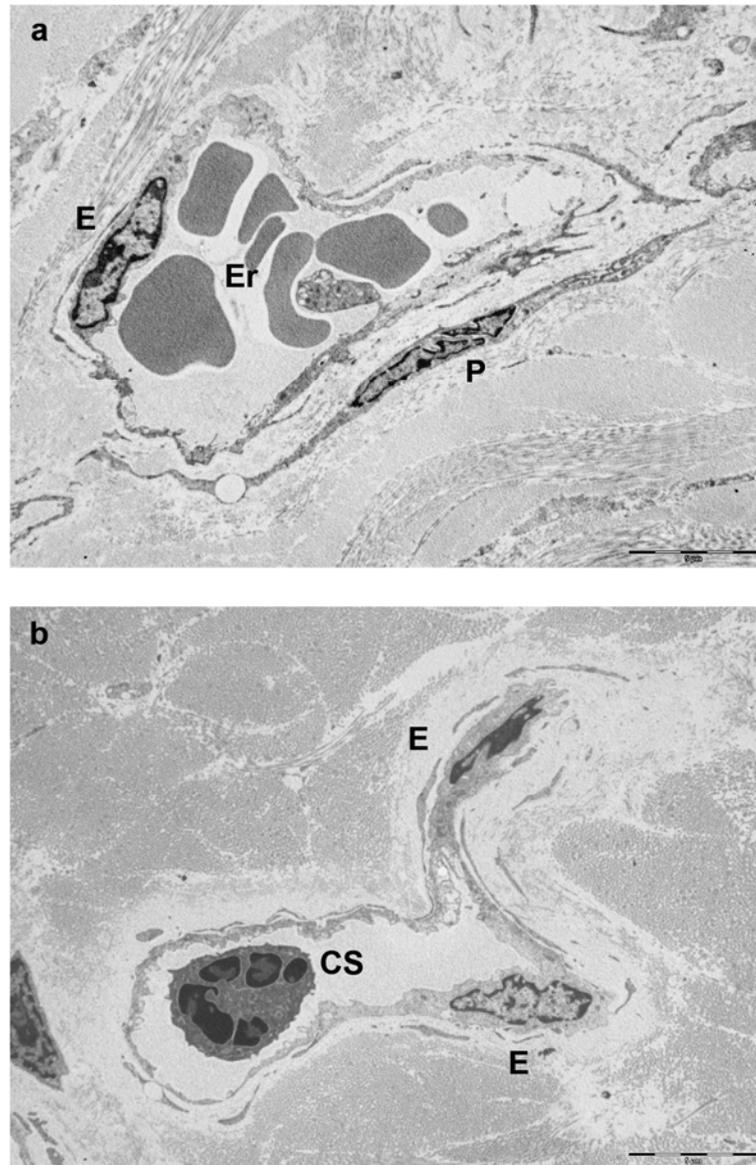
**Figura 77.** Ultraestructura de la epidermis de los animales expuestos a 25 sesiones de radiación UV. a) Estrato granuloso y córneo (MET, 1850x). b) Estrato córneo ligeramente engrosado (MET, 5800x). Las escalas equivalen a 10  $\mu\text{m}$  (a) y a 2  $\mu\text{m}$  (b).



**Figura 78.** Detalle de conductos glandulares, sin alteraciones relevantes, de los animales expuestos a 25 sesiones de radiación UV (MET, 2400x (a) y 2850x (b)). Las escalas equivalen a 5  $\mu$ m.



**Figura 79.** Ultraestructura de la dermis de los animales expuestos a 25 sesiones de radiación UV. a) Fibroblastos y célula sanguínea inmersos en fibras colágenas (MET, 3900x). b) Mastocito (MET, 5800x). CS: célula sanguínea; F: fibroblasto. Las escalas equivalen a 5  $\mu\text{m}$  (a) y a 2  $\mu\text{m}$  (b).



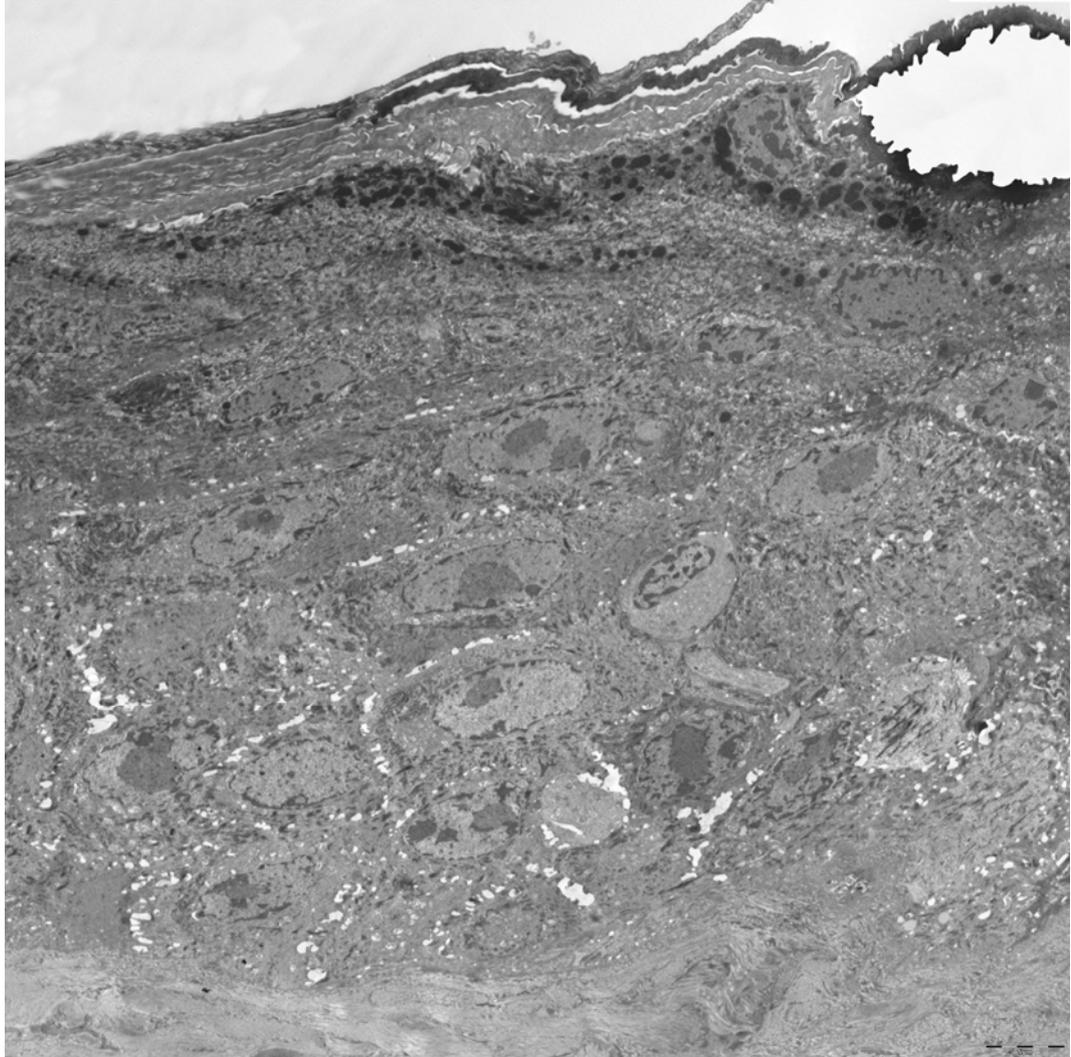
**Figura 80.** Ultraestructura de los vasos sanguíneos de la dermis reticular de los animales expuestos a 25 sesiones de radiación UV. a) Vaso con células endoteliales y pericito y eritrocitos en su interior (MET, 2850x). b) Vaso con células endoteliales y célula sanguínea en su interior (MET, 2850x). CS: célula sanguínea; E: célula endotelial; Er: eritrocitos; P: pericito. Las escalas equivalen a 5  $\mu$ m.

En contraste con la piel de los animales expuestos a 25 horas de radiación, la de los animales irradiados durante 50 sesiones mostraba mayores alteraciones.

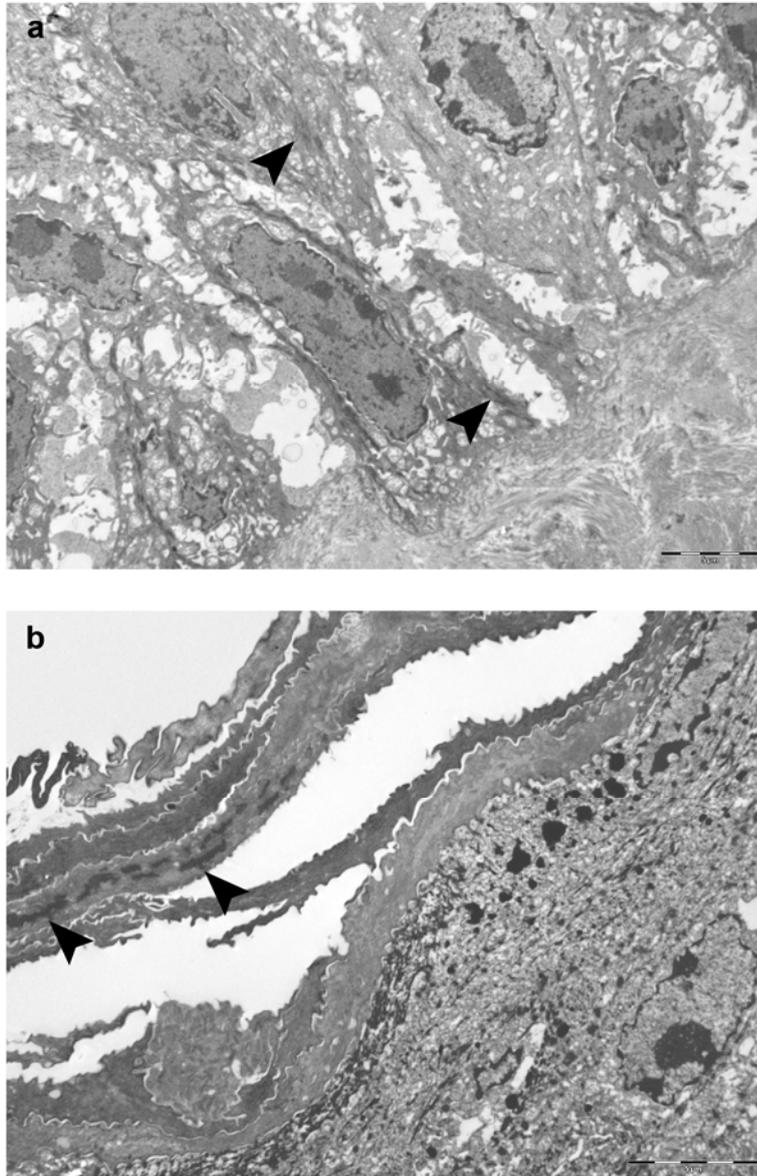
La epidermis de los animales expuestos durante 50 sesiones mostraba desorganización arquitectural y celular. La epidermis estaba engrosada y la polaridad del epitelio y las estructuras de unión intercelulares estaban alteradas (Fig. 81). Las células presentaban pleomorfismo celular y nuclear, además de vacuolización citoplasmática y acúmulos irregulares de tonofilamentos. Los núcleos de las células epiteliales eran lobulados, con nucléolos múltiples y voluminosos y engrosamiento focal de la heterocromatina (Fig. 82 a). El estrato córneo estaba engrosado y presentaba alteraciones de la maduración, como hiper- y paraqueratosis, o gránulos de queratohialina en las capas superiores (Fig. 82 b).

La dermis también se encontraba más alterada que la de los animales expuestos a 25 horas de radiación UV. Las glándulas sebáceas mostraban grandes áreas con rotura de las membranas de los gránulos de secreción intracitoplasmáticos, aunque también había zonas bien preservadas (Fig. 83). Los fibroblastos mostraban vacuolización de su citoplasma e irregularidad nuclear (Fig. 84 a), mientras que los haces de fibras colágenas estaban dispuestos de forma irregular o intensamente desorganizados (Fig. 84). En la dermis se encontraban células sanguíneas con mayor frecuencia que en los animales expuestos a 25 sesiones; sin embargo, los mastocitos eran mucho menos abundantes.

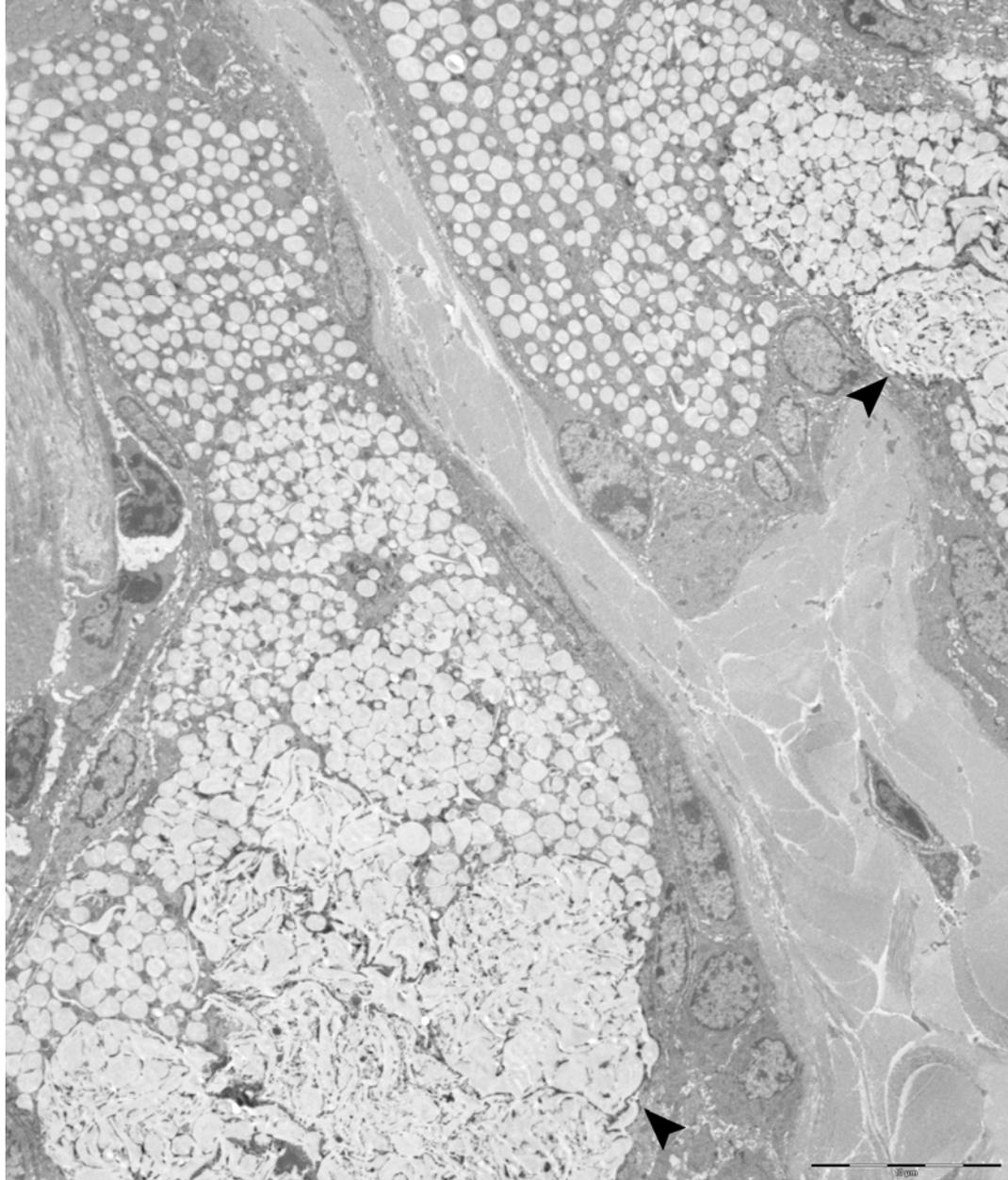
Los vasos sanguíneos dérmicos mostraban congestión e irregularidades de la membrana basal (Fig. 85).



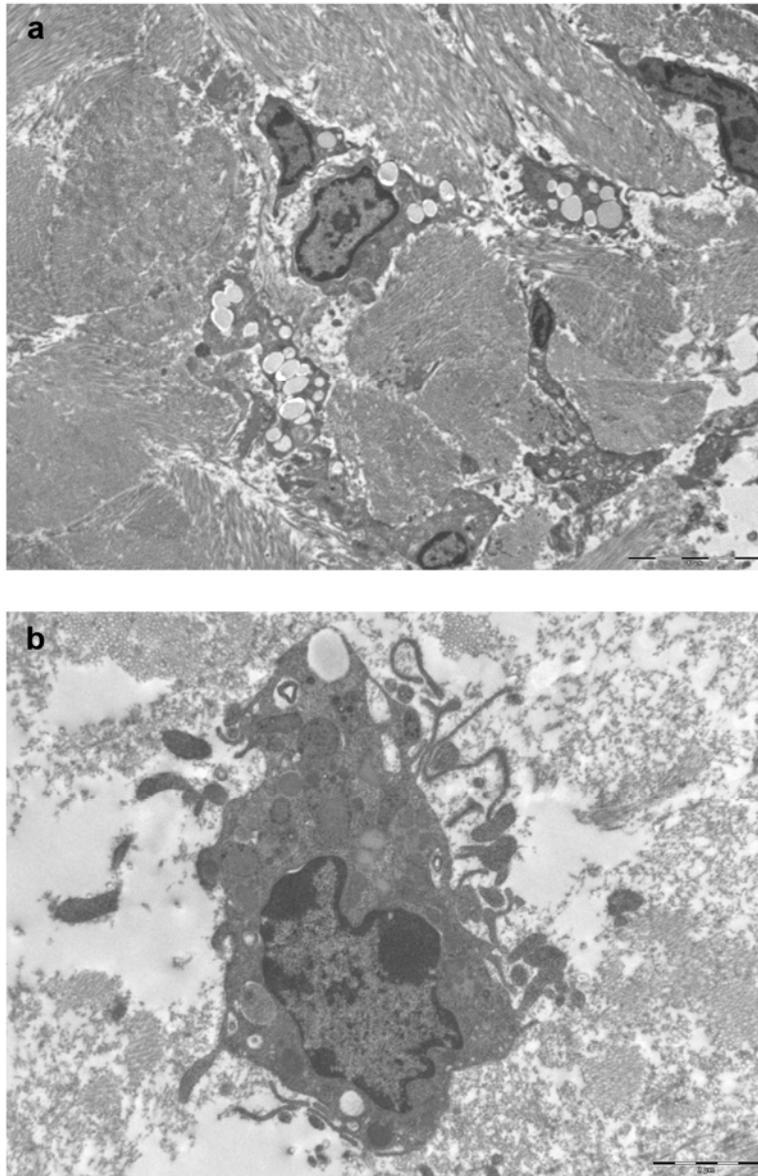
**Figura 81.** Ultraestructura de la epidermis de los animales expuestos a 50 sesiones de radiación UV (MET, 2400x). La escala equivale a 5  $\mu\text{m}$ .



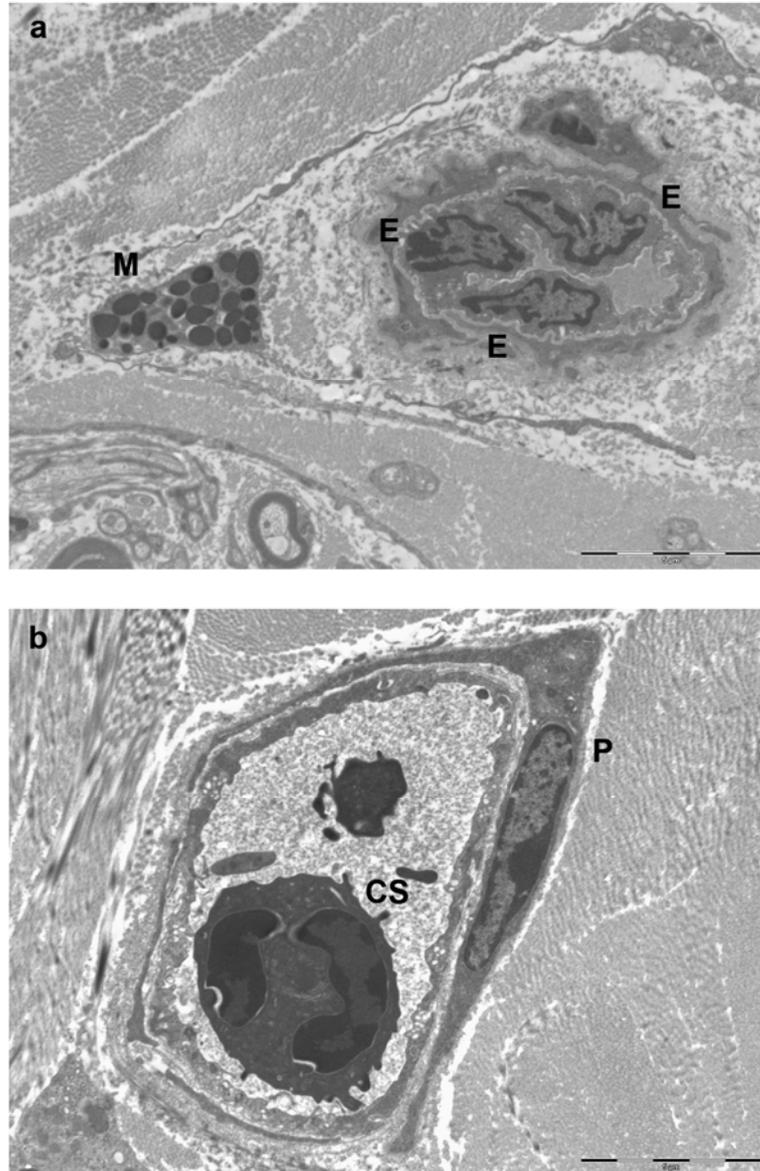
**Figura 82.** Ultraestructura de la epidermis de los animales expuestos a 50 sesiones de radiación UV. a) Queratinocitos del estrato basal de la epidermis (flechas: acúmulos de tonofilamentos) (MET, 2400x). b) Estrato granuloso y estrato córneo; el estrato córneo muestra trastornos de la maduración, con gránulos de queratohialina (flechas) en las láminas superiores (MET, 2850x). La escala equivale a 5 µm.



**Figura 83.** Ultraestructura de las glándulas dérmicas de los animales expuestos a 50 sesiones de radiación UV, con rotura de las membranas de los gránulos de secreción (flechas) (MET, 1450x). La escala equivale a 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 84.** Ultraestructura de la dermis de los animales expuestos a 50 sesiones de radiación UV. a) Fibroblastos con vacuolas citoplasmáticas, inmersos en fibras colágenas (MET, 1450x). b) Histiocito alterado (contorno y núcleo irregulares, varios nucléolos, tumefacción mitocondrial), inmerso en fibras colágenas desorganizadas (MET, 5800x). Las escalas equivalen a 10  $\mu\text{m}$  (a) y a 2  $\mu\text{m}$  (b).



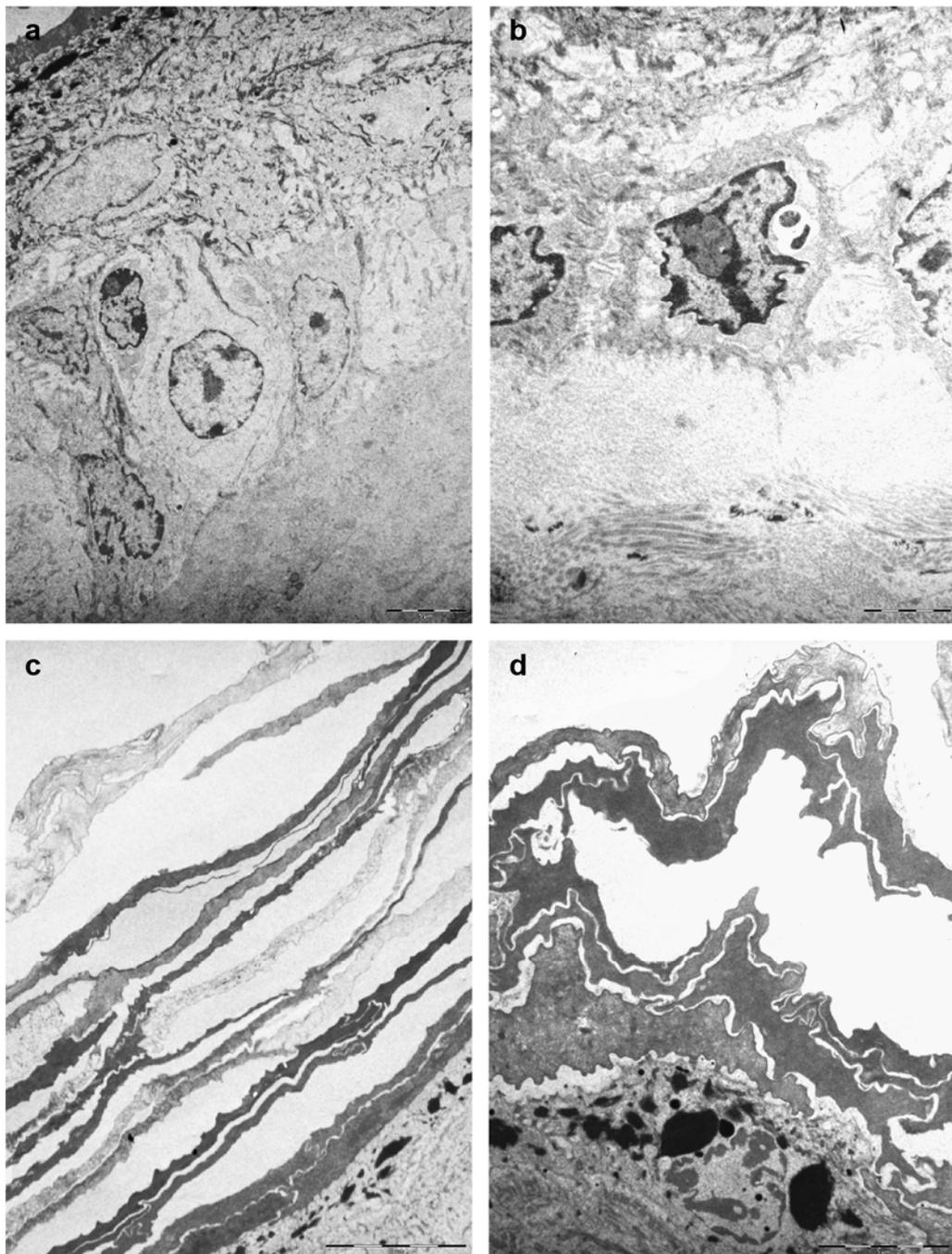
**Figura 85.** Ultraestructura de los vasos sanguíneos de la dermis reticular de los animales expuestos a 50 sesiones de radiación UV. a) Vaso con tres células endoteliales y pericito y mastocito (MET, 3900x). b) Vaso con pericito y célula sanguínea en su interior (MET, 3900x). CS: célula sanguínea; E: célula endotelial; M: mastocito; P: pericito. Las escalas equivalen a 5 µm.

La piel de los ratones del **grupo que recibió radiación y apigenina potásica** mostraba menos alteraciones ultraestructurales que la de los animales exclusivamente expuestos, al igual que lo observado mediante microscopía óptica.

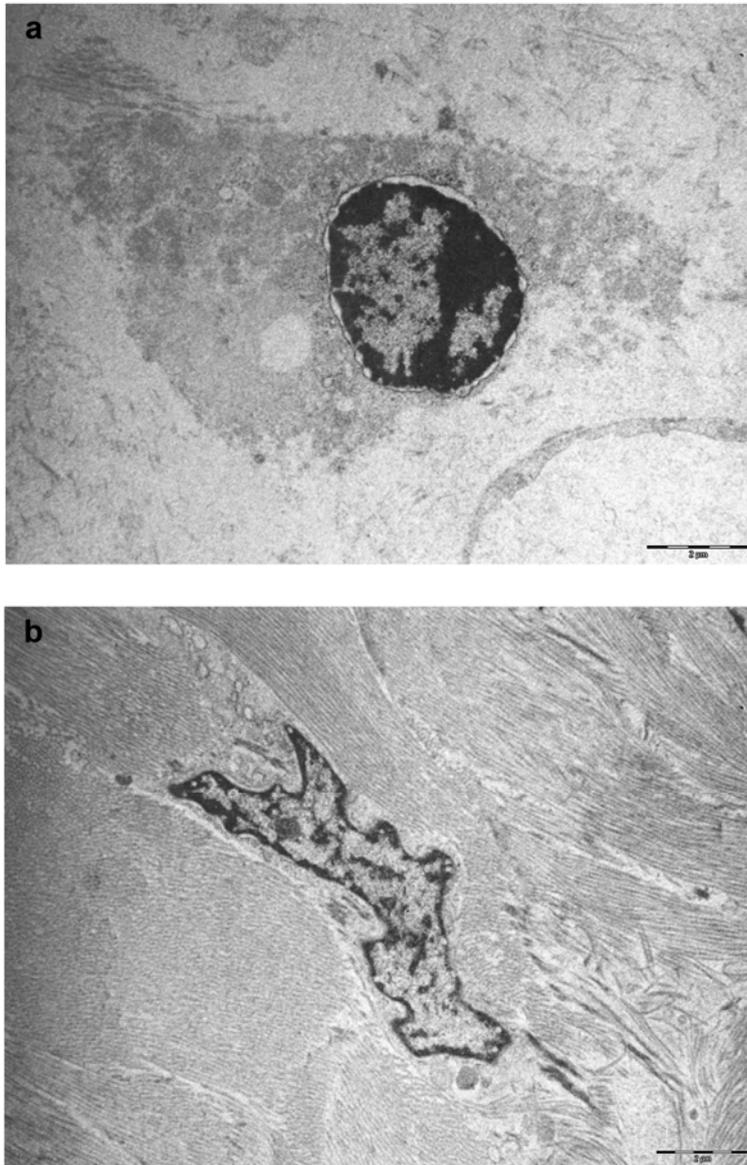
La epidermis de los animales irradiados durante 25 sesiones y tratados con apigenina potásica mostraba muy pocas alteraciones (Fig. 86 a); los queratinocitos tenían el contorno celular y nuclear levemente irregular (Fig. 86 b). Por su parte, el estrato córneo presentaba zonas con trastornos leves de la maduración (Fig. 86 c) alternando con otras sin alteraciones relevantes (Fig. 86 d).

Tampoco se observaban alteraciones relevantes en la dermis. Las glándulas sebáceas mostraban una estructura normal. Los fibroblastos no presentaban irregularidades relevantes, y estaban situados entre los haces de fibras colágenas, cuya disposición y arquitectura no mostraba variaciones relevantes (Fig. 87). Al igual que en los animales únicamente expuestos, los mastocitos eran abundantes y, en ocasiones, se localizaban cerca de vasos o de fibroblastos (Fig. 88).

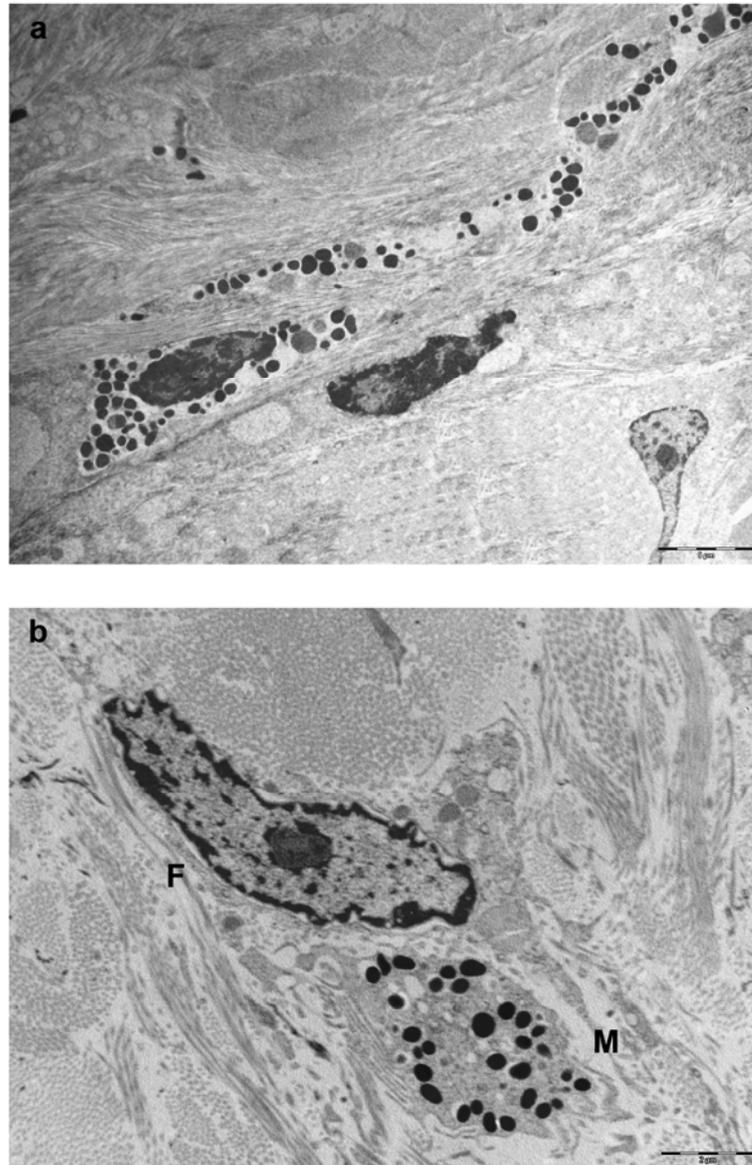
Los vasos sanguíneos también eran frecuentes y no presentaban alteraciones importantes (Fig. 89).



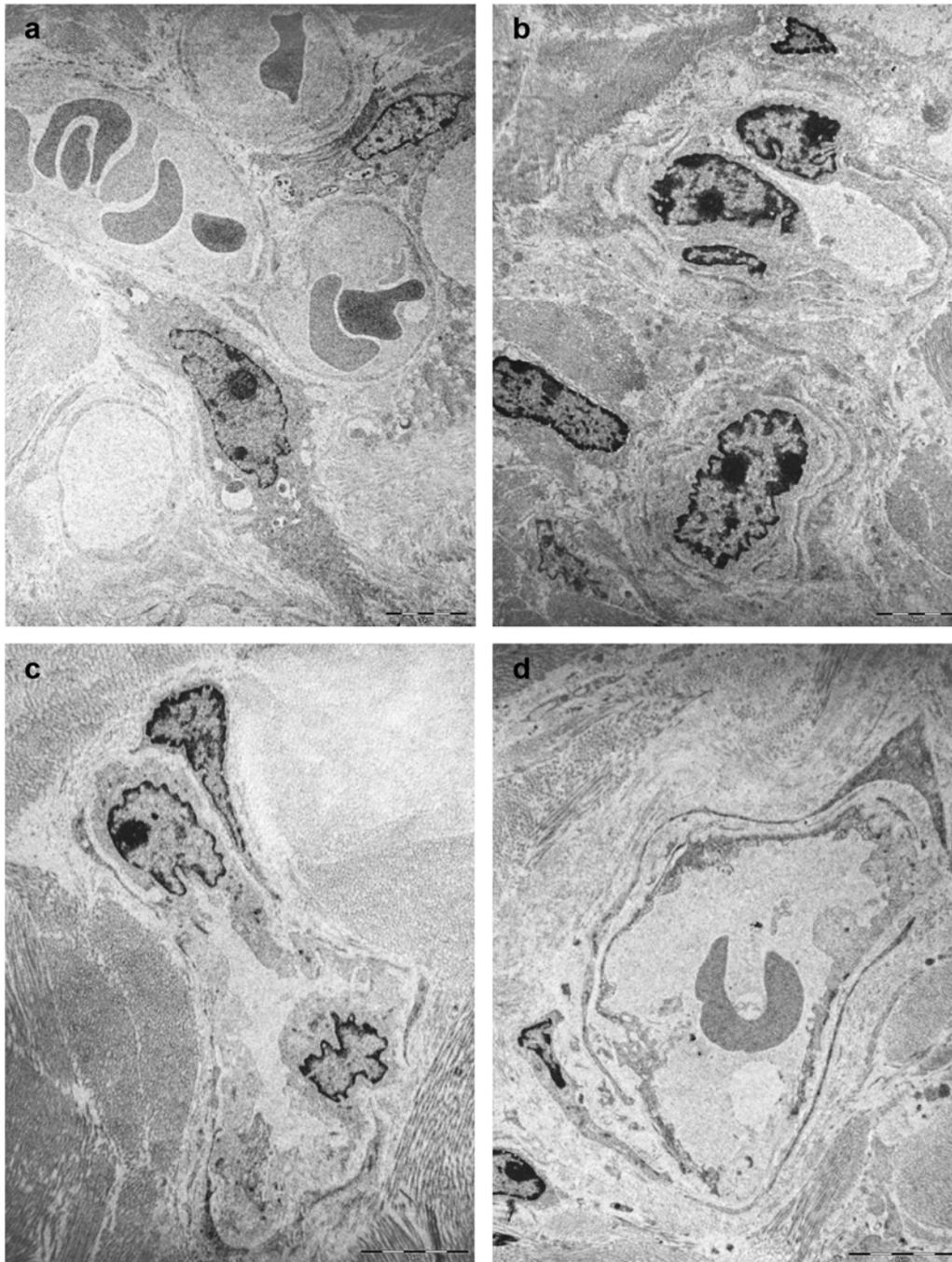
**Figura 86.** Ultraestructura de la epidermis de los animales expuestos a 25 sesiones de radiación UV y tratados con apigenina potásica (37,82 mg/kg/día). a) Epidermis (MET, 2400x). b) Detalle de células basales de la epidermis (MET, 5800x). c) Estrato granuloso y córneo con un trastorno leve de la maduración (MET, 1850x). d) Detalle de los estratos granuloso y córneo (MET, 3900x) Las escalas equivalen a 5  $\mu\text{m}$  (a, c, d) y a 2  $\mu\text{m}$  (b).



**Figura 87.** Ultraestructura de los fibroblastos de la dermis reticular de los animales expuestos a 25 sesiones de radiación UV y tratados con apigenina potásica (37,82 mg/kg/día). (MET, 5800x). Las escalas equivalen a 2 μm.



**Figura 88.** Ultraestructura de la dermis reticular de los animales expuestos a 25 sesiones de radiación UV y tratados con apigenina potásica (37,82 mg/kg/día). a) Mastocitos inmersos en las fibras colágenas (MET, 2400x). b) Fibroblasto junto a mastocito (MET, 5800x). *F*: fibroblasto. Las escalas equivalen a 5  $\mu$ m (a) y a 2  $\mu$ m (b).



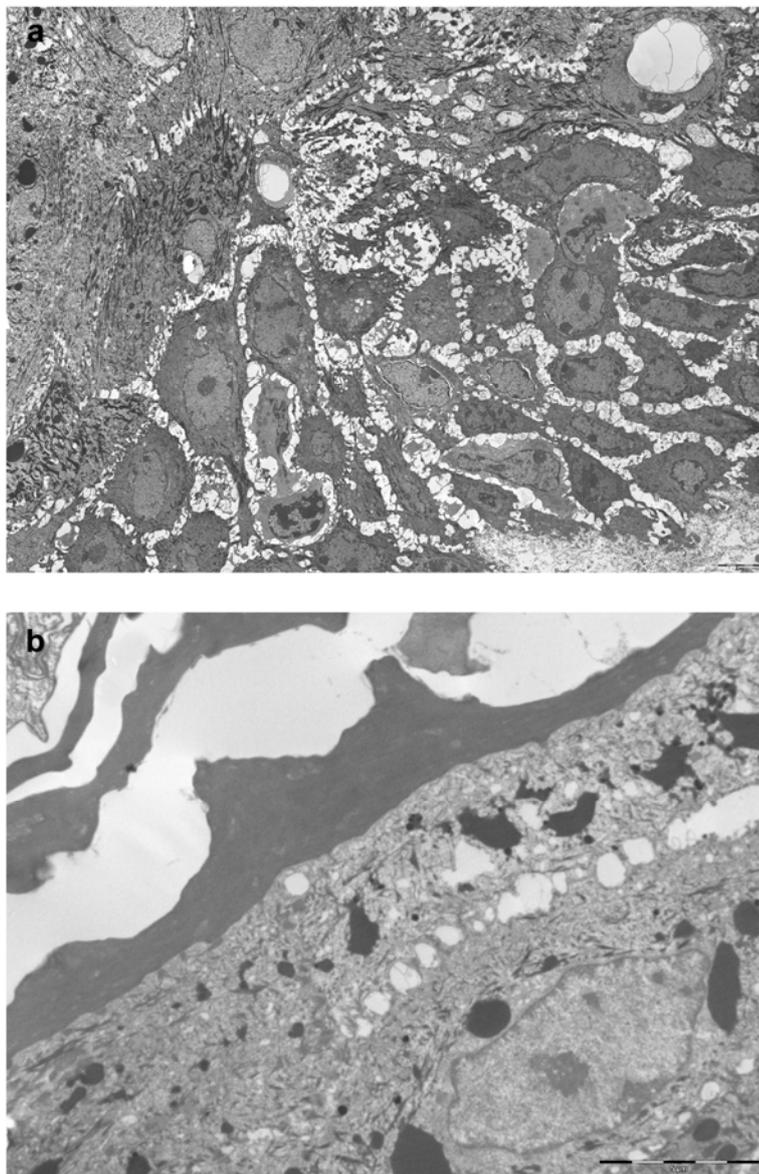
**Figura 89.** Ultraestructura de los vasos sanguíneos de la dermis reticular de los animales expuestos a 25 sesiones de radiación UV y tratados con apigenina potásica (37,82 mg/kg/día). a) Vasos con fibroblastos a su alrededor (MET, 2400x). b) Vaso con células endoteliales (MET, 2400x). c) Vaso con dos células endoteliales y pericito (MET, 2850x). d) Vaso con eritrocito en su interior y pericito (MET, 2850x). Las escalas equivalen a 5  $\mu\text{m}$ .

Tras 50 sesiones de radiación, la ultraestructura de la piel de los animales que recibieron apigenina potásica en la dieta se mostraba mejor preservada que la de los expuestos exclusivamente a radiación.

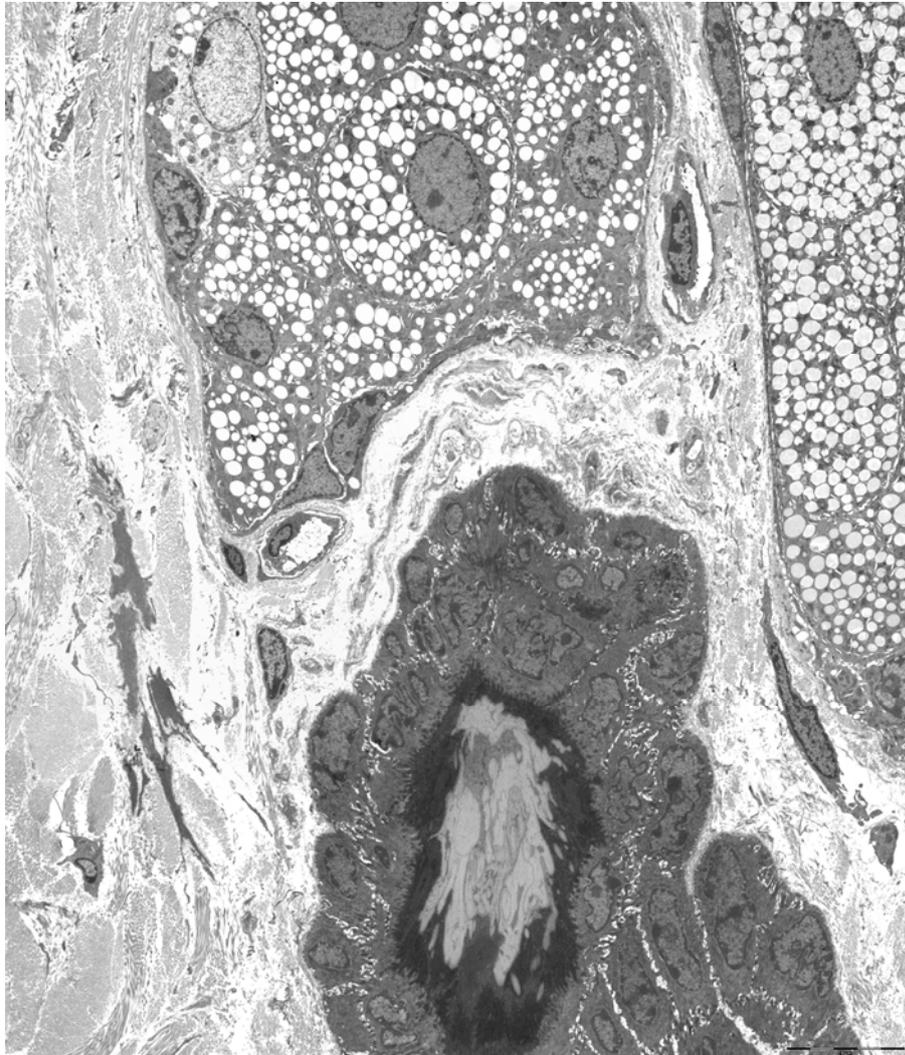
La epidermis, aunque ligeramente engrosada respecto a la de los animales tratados con apigenina potásica e irradiados durante 25 sesiones, no mostraba alteraciones importantes de la organización arquitectural y celular. Los queratinocitos presentaban escaso pleomorfismo, con núcleos bastante homogéneos y 1-2 nucléolos, y las estructuras de unión eran normales (Fig. 90 a). Tampoco el estrato córneo tenía grandes alteraciones de maduración (Fig. 90 b).

La dermis también estaba mejor conservada que en el grupo expuesto al mismo número de sesiones. Al contrario que las glándulas sebáceas de los animales que recibieron 50 horas de radiación, la ultraestructura de las de los animales que fueron tratados con apigenina potásica era normal (Fig. 91). Los fibroblastos no presentaban alteraciones relevantes o solo una ligera vacuolización del citoplasma, y, en ocasiones, se encontraban activos (Fig. 92). La orientación y características de los haces de fibras colágenas era normal (Fig. 92 b), aunque, en ciertas zonas, estaban ligeramente desorganizados (Fig. 92 a).

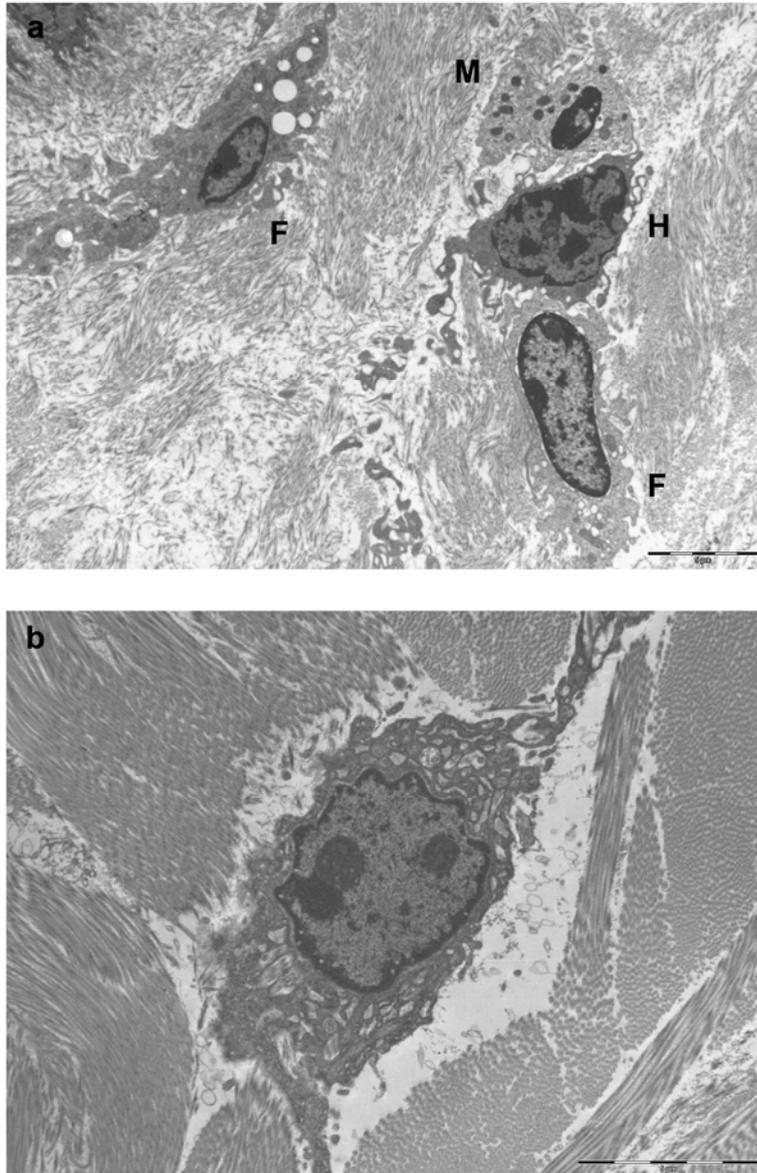
Por último, los vasos sanguíneos de la dermis no presentaban alteraciones relevantes (Fig. 93).



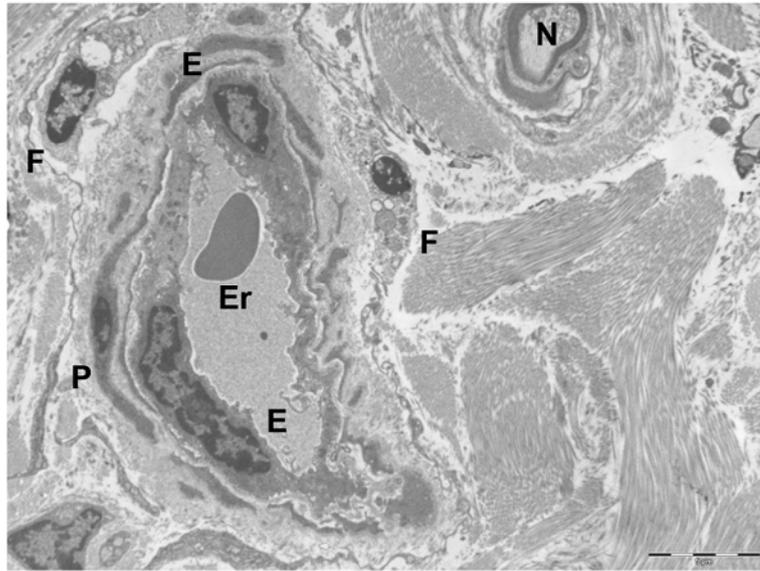
**Figura 90.** Ultraestructura de la epidermis de los animales expuestos a 50 sesiones de radiación UV y tratados con apigenina potásica (37,82 mg/kg/día). a) Epidermis (MET, 2400x). b) Estrato granuloso y córneo (MET, 3900x) Las escalas equivalen a 5  $\mu$ m.



**Figura 91.** Ultraestructura de los complejos pilosebáceos de los animales expuestos a 50 sesiones de radiación UV y tratados con apigenina potásica (37,82 mg/kg/día) (MET, 1850x). La escala equivale a 10  $\mu$ m.



**Figura 92.** Ultraestructura de los fibroblastos de la dermis reticular de los animales expuestos a 50 sesiones de radiación UV y tratados con apigenina potásica (37,82 mg/kg/día). a) Fibroblastos junto a histiocito y mastocito (MET, 2400x). b) Fibroblasto activo (MET, 3900x). *F*: fibroblasto; *H*: histiocito; *M*: mastocito. Las escalas equivalen a 5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 93.** Ultraestructura de los vasos sanguíneos de la dermis reticular de los animales expuestos a 50 sesiones de radiación UV y tratados con apigenina potásica (37,82 mg/kg/día). Vaso con células endoteliales y pericito, y nervio adyacente (MET, 2400x). *E*: célula endotelial; *Er*: eritrocitos; *F*: fibroblasto; *N*: nervio; *P*: pericito. La escala equivale a 5  $\mu$ m.

**Estudio cromatográfico.** Por último, se estudió la distribución de la apigenina potásica en los distintos tejidos de los animales que recibieron el flavonoide en la dieta mediante HPLC (Tabla 26). Este estudio mostró que, tras 25 sesiones de radiación, es decir, aproximadamente 10 semanas de ingestión del flavonoide, el nivel plasmático de apigenina había llegado a su máximo, manteniéndose más o menos constante en las medidas posteriores. Sin embargo, en otros tejidos (hígado, cerebro) la concentración de apigenina fue aumentando a lo largo del estudio. Así, la concentración de apigenina en el hígado se triplicó desde el primer muestreo (25 sesiones) hasta el último (100 sesiones; aproximadamente 35 semanas de ingesta del compuesto), mientras que en el cerebro se multiplicó por 2 o 2,5 veces en el mismo periodo.

	25 sesiones	50 sesiones	100 sesiones
<b>Plasma</b>	0,13 - 0,38	0,18 - 0,25	0,17 - 0,22
<b>Hígado</b>	0,30 - 0,49	0,88 - 0,94	1,33 - 1,64
<b>Cerebro</b>	0,25 - 0,42	0,47 - 0,60	0,63 - 0,89

**Tabla 26.** Distribución de la apigenina ( $\mu\text{M}$ ) evaluada por HPLC en diferentes tejidos de ratones expuestos a 25-100 sesiones de radiación UV y tratados con apigenina potásica en la dieta (37,82 mg/kg/día).

## **DISCUSIÓN**

---



La apigenina, flavonoide perteneciente al grupo de las flavonas, está presente, en cantidades muy variables, en numerosos vegetales utilizados en la alimentación humana. Así, se encuentra tanto en condimentos y hierbas aromáticas como el perejil, el tomillo o el orégano (Justesen, 2001; Manach, 2004; Harnly, 2006; Kulisic, 2007; Usda, 2007), y, en menor proporción, en el apio, las lechugas, las alcachofas o las cebollas rojas (Usda, 2007); como en bebidas e infusiones, tales como la manzanilla, el vino tinto, y el té verde (McKay, 2006; Usda, 2007).

Este compuesto natural presenta numerosas propiedades biológicas de gran interés. Tiene actividad antioxidante, tanto directa (Kim, 2004b; Nagai, 2005; Patel, 2007), como indirecta (Khan, 2006; Patel, 2007); es antimutagénico (Khan, 2006; Patel, 2007; Siddique, 2008;

Siddique, 2009) y radioprotector (Rithidech, 2005a); regula la carcinogénesis en todas sus etapas (Gupta, 2002; Shenouda, 2004; Wang, 2004; Way, 2004; Czyz, 2005; Liu, 2005; Rithidech, 2005a; Torkin, 2005; McKay, 2006; Shukla, 2006; Chen, 2007a; Fang, 2007; Chen, 2008; Hu, 2008; Lee, 2008; Meeran, 2008a; Li, 2009; Zhang, 2009); y tiene actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora (Gerritsen, 1995; Hougee, 2005; Kowalski, 2005; Comalada, 2006). Debido a estos efectos saludables, ha sido utilizada durante siglos por la medicina tradicional en el tratamiento de diversas patologías como el asma, herpes zóster, gastritis, distintas patologías inflamatorias cutáneas, etc. (McKay, 2006; Patel, 2007).

La elección de la apigenina para el desarrollo de este estudio fue debida a las propiedades beneficiosas para la salud mostradas por este compuesto. Sin embargo, en nuestro trabajo utilizamos un derivado de este flavonoide, obtenido mediante la adición de potasio a la apigenina aislada de extracto de pomelo; el producto de esta reacción, la apigenina potásica, al contrario que su precursor, es soluble en agua. Esta mejora facilita el manejo de la molécula, dado que puede disolverse en los medios de cultivo o en vehículos acuosos (suero salino) o adicionarse a dietas directamente, sin necesidad de utilizar otros disolventes, como el etanol o el DMSO, necesarios para la apigenina sin modificar.

Para el estudio de las **propiedades antiinflamatorias** de la apigenina potásica, se ha utilizado el modelo de edema inducido por carragenato en pata de ratón, descrito por Winter *et al.* (1962), y empleado para evaluar los efectos antiinflamatorios de diversos compuestos, desde extractos y compuestos vegetales a fármacos sintéticos.

Aunque desarrollado con ratas, cada vez se utiliza más en ratones, debido a las ventajas que presenta este animal respecto a las ratas: requieren menos espacio, tienen un menor coste, se pueden utilizar más animales en cada experimento, etc. En la cepa de ratón Swiss, usada en nuestro estudio, la respuesta inflamatoria inducida por este modelo es más acusada que en otras (Silván, 1997).

Se ha descrito que este ensayo induce una respuesta inflamatoria en dos fases: en la primera, el edema es de baja intensidad, mientras que en la segunda fase (a partir de las 24 horas) el edema es de mayor intensidad (Posadas, 2004). Los resultados de nuestro estudio coinciden con esta respuesta bifásica, con un pico a la hora de causar la inflamación y otro, todavía mayor, a las 24 horas, que se correspondió con el máximo de infiltración inflamatoria en el tejido, según el estudio microscópico.

Los mediadores más importantes de la inflamación, la histamina, la bradiquinina, la serotonina, las prostaglandinas y el NO, intervienen en la respuesta inflamatoria desencadenada en este modelo (Posadas, 2004). El nivel de NO tiene el máximo a las 2 horas, mientras que las prostaglandinas se liberan principalmente entre las 2 horas y media y las 5 horas tras la inyección de carragenato (Nantel, 1999; Rotelli, 2003).

Se ha demostrado que, en este modelo, la inyección de carragenato provoca cambios en los niveles de COX-2, con dos máximos de concentración, uno en la etapa temprana (1 hora tras la inyección) y otro entre las 24 y 72 horas de provocar la inflamación (Nantel, 1999; Posadas, 2004). Estudios realizados en un modelo de pleuritis inducida por carragenato demostraron que los niveles de COX-2 tienen, también, dos picos similares, uno en torno a las 2 horas tras provocar la inflamación, y otro a las 48 horas. El aumento a las 2 horas está relacionado con la infiltración de neutrófilos y el edema. El incremento tras las 48 horas

parece estar implicado en la resolución de la inflamación, ya que produce prostaglandina D<sub>2</sub> y otros tipos de prostaglandinas que son ligandos de PPAR $\gamma$  y tienen efecto antiinflamatorio (Willoughby, 2000; Colville-Nash, 2005).

En nuestro trabajo, la apigenina potásica ha demostrado tener actividad antiinflamatoria, logrando una inhibición de la inflamación del 54-61% cuando se administraban 50 mg/kg, y del 54-78% con la dosis mayor del flavonoide (100 mg/kg). Por tanto, el tratamiento de ratones Swiss con apigenina potásica, además de no mostrar toxicidad, redujo la inflamación entre 2 y 4 veces, al comparar con los controles. Asimismo, el tratamiento con apigenina potásica redujo considerablemente la intensidad del edema y de la infiltración inflamatoria del tejido afectado, con mejores resultados cuanto mayor fuera la concentración de flavonoide.

Gerritsen *et al.* (1995) estudiaron el efecto antiinflamatorio de la apigenina, no de su derivado potásico, en el modelo de edema inducido por carragenato en pata de rata, demostrando que la dosis más alta estudiada (50 mg/kg) redujo significativamente el volumen de la pata y la infiltración leucocitaria a las 3 horas de provocar la inflamación. Nuestro estudio comprobó los resultados de este autor, demostrando que el efecto antiinflamatorio de la apigenina potásica se mantuvo durante 48 horas. Además, nuestro estudio demostró que la dosis de 100 mg/kg produjo efectos más prolongados que la dosis de 50 mg/kg, puesto que, en el grupo tratado con esta concentración, el porcentaje de edema aumentó a las 48 horas respecto a las 24 horas.

Por otra parte, en nuestro estudio, la apigenina potásica causó una mayor inhibición del edema que la provocada por dosis más elevadas de varios flavonoides (hesperidina, quercetina) en otros estudios similares (Rotelli, 2003).

Los efectos antiinflamatorios de la apigenina pueden estar relacionados con su actividad antioxidante (Jeyabal, 2005; Nagai, 2005; Duarte-Almeida, 2006) y con sus propiedades inmunomoduladoras.

La producción de pequeñas cantidades de ROS durante el proceso inflamatorio aumenta la expresión de quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión, potenciando la reacción inflamatoria (García-Lafuente, 2009). La apigenina podría inhibir, en parte, la inflamación gracias a su capacidad de eliminar ROS (Kim, 2004b; Nagai, 2005; Patel, 2007).

Además, este flavonoide ha demostrado inhibir la expresión de moléculas de adhesión (Gerritsen, 1995; Chen, 2004; Lotito, 2006b; Yano, 2006; Lee, 2007) y de RANTES (Yano, 2006), una quimioquina implicada en diversas etapas de la iniciación de la inflamación fisiológica (Yano, 2006), dificultando así la infiltración leucocitaria en la zona afectada. Además, la apigenina inhibe la producción de importantes citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8 o TNF- $\alpha$  (Gerritsen, 1995; Smolinski, 2003; Hougee, 2005; Kowalski, 2005; Comalada, 2006; Funaguchi, 2007; Kawai, 2007; Nicholas, 2007; Yano, 2007; Shanmugam, 2008; Choi, 2009a; Yano, 2009; Huang, 2010), lo que reduciría la atracción de células del sistema inmune hacia la región inflamada.

Por otra parte, la apigenina inhibe la expresión de enzimas clave en el metabolismo del ácido araquidónico, como son PLA<sub>2</sub> (Kim, 2004a; Van Dross, 2005; Yoon, 2005; Kawai, 2007), que libera ese compuesto de las membranas celulares; COX-2 (Van Dross, 2005; Van Dross, 2007; Ha, 2008), productora de prostaglandinas y tromboxanos; y 5-LOX (Van Dross, 2005; Kim, 2006; Patel, 2007), que genera leucotrienos. Los productos de estas enzimas actúan sobre la permeabilidad vascular, la agregación de plaquetas y la vasoconstricción, además de ser agentes quimiotácticos que atraen a los leucocitos (Yoon, 2005; García-Lafuente, 2009). La

apigenina, al inhibir la actividad o la expresión de todas estas enzimas (Liang, 1999; Olszanecki, 2002; Kim, 2004a; Van Dross, 2005; Comalada, 2006; Kim, 2006), bloquea algunos de los compuestos más importantes en el desarrollo de la inflamación, y de este modelo en particular.

Además, este flavonoide bloquea la expresión de iNOS (Liang, 1999; Olszanecki, 2002; Kim, 2004a; Comalada, 2006; Ha, 2008) y, por tanto, la liberación de NO, un potente vasodilatador y reductor de la agregación plaquetaria (Olszanecki, 2002).

Los efectos de la apigenina sobre la expresión de enzimas implicadas en la inflamación se deben a su actividad sobre distintas rutas de transducción de señales como las cascadas de MAPK (O'Prey, 2003; Chen, 2004; Sawatzky, 2006; Patel, 2007; Ha, 2008), de PKC (Liang, 1999; Kim, 2004a; Rithidech, 2005a; Lotito, 2006b; Patel, 2007) o de STAT (Rezai-Zadeh, 2008), todas ellas implicadas en distintas etapas de la inflamación, como en la producción de interleuquinas y quimioquinas. También se explican por su efecto sobre factores de transducción tales como NF- $\kappa$ B (Liang, 1999; Gupta, 2002; Chen, 2004; Shukla, 2004a; Shukla, 2004b; Comalada, 2006; Ruiz, 2006; Chen, 2007b; Nicholas, 2007); o sobre receptores nucleares como PPAR (O'Leary, 2004; Yano, 2006).

En resumen, la apigenina potásica ha demostrado propiedades antiinflamatorias, reduciendo la inflamación hasta en un 78% en el modelo de edema inducido por carragenato en la pata de ratón.

El cáncer es una de las principales causas de muerte y uno de los principales problemas sanitarios mundiales, sobre todo en países

desarrollados (Yabroff, 2007; Jemal, 2009). Sin contar los cánceres cutáneos, el **cáncer de próstata** es uno de los principales tumores, tanto por su gran incidencia (25%) como por las muertes que provoca (9%) (Berkow, 2007; Assinder, 2009; Jemal, 2009). Las neoplasias de próstata se consideran como una excelente diana para el uso de compuestos quimiopreventivos, por su largo periodo de latencia y su alta incidencia (Gupta, 2001; Patel, 2007); por ello, en este estudio realizamos diversos ensayos para estudiar el efecto de la apigenina potásica sobre este tumor, así como para intentar desentrañar los principales mecanismos subyacentes.

La línea celular TRAMP-C1 deriva de un tumor de próstata de un ratón TRAMP (Foster, 1997). Los ratones TRAMP son animales transgénicos diseñados para expresar un fragmento del material genético del virus SV40 específicamente en el epitelio de la próstata mediante el promotor del gen de la probasina de rata (Greenberg, 1994; Greenberg, 1995). Estos animales desarrollan todo el espectro tumoral de la próstata, desde la hiperplasia intraepitelial leve a la neoplasia multinodular, reflejando la patogenia humana (Greenberg, 1995). Los tumores se desarrollan preferentemente en la próstata dorsolateral, detectándose a partir de las 10 semanas de edad (Greenberg, 1995), y, al igual que ocurre con los cánceres de próstata humanos, los de estos animales pueden convertirse en independientes de andrógenos desde una edad tan temprana como las 12 semanas (Gingrich, 1997). Además, a partir de esa edad, comienza la invasión metastásica, especialmente en los ganglios linfáticos periaórticos y pulmones, aunque también en los riñones, las glándulas adrenales y los huesos. A las 28 semanas de edad, todos los animales presentan metástasis, durante la cual, al igual que ocurre en humanos, los tumores de los ratones pierden la expresión de cadherina E (Gingrich, 1996).

La línea TRAMP-C1 es tumorigénica en los ratones C57Bl/6, la cepa usada para establecer los ratones TRAMP (Foster, 1997). Elegimos esta línea celular para este trabajo ya que, dada su capacidad de desarrollar tumores al ser inoculada en ratones, permitía combinar fácilmente estudios *in vitro* con el desarrollo de modelos animales del mismo tumor. Así, los estudios que no se pudieran realizar *in vitro* por las limitaciones impuestas por el trabajo con líneas celulares, fundamentalmente debidas a la falta de interacciones con otros tipos celulares y órganos, típicas de un organismo completo, podrían ser realizados en el modelo murino.

La línea celular PNT2, por su parte, deriva de epitelio prostático normal, aunque para su inmortalización se transfectó con un fragmento del virus SV40. Son células altamente diferenciadas, que expresan citoqueratina 19, un marcador de diferenciación en el epitelio prostático; esta línea no es capaz de desarrollar tumores al ser inoculada en ratones durante un periodo de estudio de 12 meses (Berthon, 1995). Debido a su origen no tumoral, se ha usado en este trabajo como referencia para comprobar si los efectos de la apigenina potásica sobre la línea tumoral (TRAMP-C1) se repetían en células no tumorales (PNT2).

El estudio de los **cambios morfológicos** causados por la apigenina potásica mostró que este flavonoide alteraba ligeramente la morfología en cultivo de la línea celular TRAMP-C1. En esta línea, los tratamientos con una concentración elevada (100  $\mu$ M) a largo plazo, además de disminuir la densidad celular y aumentar los restos celulares, provocaron la aparición de vacuolas en el citoplasma. Estos efectos están relacionados con la inhibición de la viabilidad observada mediante la técnica del MTT, pues reflejan la toxicidad del compuesto. El estudio ultraestructural mostró que

las células tratadas eran más irregulares, con núcleos con más invaginaciones y más nucléolos. Estos resultados indican, al igual que los obtenidos mediante microscopía de contraste de fases, el daño celular causado por la apigenina potásica en esta línea celular.

Sin embargo, aunque los estudios específicos de apoptosis mostraron que el tratamiento con apigenina potásica 100  $\mu$ M durante 48 horas inducía un aumento significativo de la apoptosis (un 46,1% más respecto a los controles), la observación mediante MET no mostró ninguna célula con características típicas de apoptosis (Kiechle, 2002; Huerta, 2007). Probablemente, esto se deba a que el número de células apoptóticas era muy bajo (un 5,79% del total) y a que, durante las numerosas etapas de la preparación de las muestras, se perdió una parte de la muestra celular, por lo que las preparaciones tenían pocas células. Así, el que no se encontrase ninguna célula apoptótica no contradiría los resultados obtenidos en los ensayos más específicos de apoptosis.

En la línea celular no tumoral (PNT2) los cambios morfológicos originados por la apigenina potásica fueron menos importantes. Mediante microscopía óptica con contraste de fases solamente era destacable una pequeña disminución de la densidad celular y un ligero aumento de los restos celulares, ambos resultados que reflejan que la toxicidad del compuesto sobre esta línea era menor que sobre la tumoral. Tampoco la MET mostró grandes modificaciones en la ultraestructura de las células, confirmando también la menor afectación de estas células.

Para el estudio de los efectos de la apigenina potásica sobre la **viabilidad celular** se empleó el test del MTT, descrito por Carmichael *et al.* (1987a; 1987b) y Alley *et al.* (1988). Esta técnica se basa en la capacidad de las células viables, mediante deshidrogenasas

mitocondriales, de reducir el MTT, una sal de tetrazolio amarilla, a un producto de formazano de color azul (Carmichael, 1987a; Carmichael, 1987b; Alley, 1988; Talorete, 2006). Esta técnica tiene la ventaja de que puede realizarse de forma semiautomática, utilizando placas de 96 pocillos, ya que el producto de formazano se puede cuantificar mediante un espectrofotómetro de placas. Esta ventaja, junto a que sus resultados son similares a los de otras técnicas empleadas para evaluar la viabilidad celular (Carmichael, 1987a; Carmichael, 1987b; Schroeterova, 2009), lo convierten en una de las técnicas más utilizadas para este tipo de ensayos.

Aunque esta técnica está aceptada para estudios de viabilidad y es muy utilizada en todo el mundo, existen estudios que cuestionan su uso para el análisis de los efectos sobre la viabilidad celular de extractos vegetales o compuestos polifenólicos (Bernhard, 2003; Shoemaker, 2004; Peng, 2005; Talorete, 2006). Estos estudios demuestran que flavonoides como la luteolina, la quercetina o la rutina son capaces de reducir el MTT en ausencia de células, probablemente debido a su actividad antioxidante (Peng, 2005; Talorete, 2006). Así, Talorete *et al.* (2006) mostraron que, de todos los flavonoides ensayados, la quercetina produjo la máxima reducción del MTT, mientras que el efecto de la apigenina fue nulo.

Aunque los resultados de Talorete *et al.* (2006) parecen indicar que la técnica del MTT se podría utilizar con la apigenina, en nuestro trabajo se incluyeron, en todos los ensayos, pocillos sin células pero con apigenina potásica, para comprobar si el flavonoide reducía por sí mismo el MTT. En ninguno de los ensayos estos pocillos mostraron un aumento de la absorbancia respecto al medio sin células (blanco), indicando que la apigenina potásica a las concentraciones empleadas no reduce por sí misma el MTT. Por tanto, este procedimiento es totalmente adecuado para

el estudio de los efectos de la apigenina sobre la viabilidad celular, tal y como indican Talorete *et al.* (2006).

En nuestro estudio, hemos tomado varios tiempos de incubación con la apigenina potásica (24-72 horas) para poder evaluar tanto su efecto citotóxico como antiproliferativo. Varios autores han establecido que en el tratamiento durante periodos cortos de tiempo, tales como 24 horas, los cambios de viabilidad celular están debidos, fundamentalmente, a la muerte celular directa (Hansson, 1987; Rodríguez-Vicente, 1998; Yáñez, 2004); otros autores, sin embargo, proponen la incubación con concentraciones muy elevadas durante periodos muy cortos (3 horas) para estudiar la citotoxicidad (Kuntz, 1999). Los ensayos durante 72 horas, por otra parte, permiten evaluar el poder antiproliferativo del compuesto, ya que dan tiempo a que se produzcan fenómenos de apoptosis, de parada del ciclo celular, etc. (Hansson, 1987; Rodríguez-Vicente, 1998; Yáñez, 2004).

En este trabajo, la apigenina potásica disminuyó significativamente la viabilidad celular de la línea de carcinoma de próstata TRAMP-C1, que se mantuvo entre un 36,10% y un 8,54% tras incubaciones de 24 y 72 horas, respectivamente, con la dosis mayor empleada (200  $\mu$ M). La reducción de la viabilidad fue dependiente tanto de la concentración utilizada, como del tiempo de incubación. La obtención de la máxima inhibición de la viabilidad tras 72 horas de tratamiento parece indicar que los efectos de la apigenina potásica se deben en parte a que presenta actividad citotóxica, ya que también redujo la viabilidad con la incubación durante 24 horas, pero asimismo a otros efectos antiproliferativos.

La posterior realización de los estudios de apoptosis y ciclo celular en nuestro trabajo permitieron descubrir que, al menos, los procesos de muerte celular programada estaban implicados en esta reducción de la

viabilidad. No obstante, los resultados obtenidos en estos ensayos, en los que se detectó un aumento ligero (de entre un 15,64% y un 43,24%), aunque significativo, de la apoptosis respecto a los controles tras, tan solo, 24 horas de tratamiento, contrastan con lo descrito por otros autores, que afirman que, durante ese periodo de tiempo, las disminuciones de viabilidad únicamente se deben a la citotoxicidad del compuesto (Hansson, 1987; Rodríguez-Vicente, 1998; Yáñez, 2004).

De forma llamativa, la reducción de la viabilidad provocada por la apigenina potásica sobre la línea no tumoral (PNT2) fue mucho menos marcada que sobre la línea TRAMP-C1. La viabilidad con la máxima concentración (200  $\mu\text{M}$ ) quedó, en este caso, entre un 76,43% (24 horas) y un 45,1% (72 horas). La comparación mediante el cálculo de la IC50 y la IC90 de la apigenina potásica para ambas líneas celulares refleja mejor este comportamiento. Así, mientras que para la línea TRAMP-C1 dichos valores eran de 104,88 y 200,3  $\mu\text{M}$ , respectivamente, para una incubación de 48 horas, para la línea PNT2 eran de 251,92 y 464,56  $\mu\text{M}$ , respectivamente, tras 48 horas de tratamiento; de forma similar, tras 72 horas de incubación los valores eran de 74,46 y 137,83  $\mu\text{M}$  (TRAMP-C1) y de 136,94 y 266,45  $\mu\text{M}$  (PNT2). Estos resultados indican que, en estas dos líneas celulares, la apigenina potásica resulta el doble de tóxica para la línea tumoral que para la no tumoral.

Aunque no existen estudios sobre los efectos citotóxicos o antiproliferativos de la apigenina potásica, la apigenina sí ha sido ampliamente estudiada. Así, numerosos autores han demostrado que este flavonoide inhibe la proliferación y viabilidad celular en distintas líneas celulares tumorales, tales como cáncer de mama, de próstata, de cuello de útero, de ovario, de pulmón, de tiroides, de estómago, de esófago, de colon, hepatocelular y neuroblastoma (Gupta, 2001; Lindenmeyer, 2001; Gupta, 2002; Shukla, 2004a; Shukla, 2004b; Mak, 2006; Shukla, 2006;

Chen, 2007a; Patel, 2007; Czernik, 2008; Lee, 2008; Shukla, 2008; Li, 2009; Zhang, 2009).

Los estudios sobre los efectos de la apigenina sobre la viabilidad celular de líneas de cáncer de próstata han empleado gran cantidad de líneas celulares de este tumor: 22Rv1, CA-HPV-10, DU145, LNCaP, etc. (Gupta, 2001; Gupta, 2002; Shukla, 2004a; Morrissey, 2005; Kaur, 2008; Shukla, 2008). Dado que en estos estudios se utilizaron concentraciones y tiempos de incubación dispares, y solamente uno de ellos (Gupta, 2001) calculó la IC50, resulta complicado compararlos entre sí y con los resultados obtenidos en nuestro trabajo. Además, se observa claramente la influencia de la línea celular escogida. Así, con la misma concentración de apigenina (80  $\mu$ M) la viabilidad celular es de aproximadamente un 20% (LNCaP), de un 30% (Du145) o de un 50% (22Rv1) tras 24 horas de incubación, o de entre el 5% (LNCaP) y el 30% (22Rv1) tras 48 horas (Gupta, 2002; Shukla, 2004a; Shukla, 2008), lo que demuestra que cada línea celular muestra una sensibilidad distinta a la apigenina. Algo similar, aunque estudiando otros compuestos polifenólicos sobre varias líneas celulares de melanoma, ha sido descrito previamente por nuestro grupo (Yáñez, 2004).

Comparando los datos obtenidos en nuestro estudio con los trabajos mencionados, se observa que el efecto de la apigenina potásica fue más leve en la línea celular TRAMP-C1, quizás debido a las variaciones en la sensibilidad a agentes tóxicos entre líneas celulares.

Quizás el resultado más importante de estos ensayos sea el efecto tan dispar provocado por la apigenina potásica en ambas líneas. Gupta *et al.* (2001) realizaron un estudio similar, comparando una línea tumoral con una no tumoral, aunque empleando otras líneas celulares (CA-HPV-10 y PZ-HPV-7) y la apigenina, en lugar de su derivado potásico, con

resultados que muy parecidos a los de este estudio; en el trabajo mencionado, la IC50 de la apigenina en la línea tumoral (CA-HPV-10) fue de 35  $\mu\text{M}$ , mientras que en la no tumoral (PZ-HPV-7) era de 110  $\mu\text{M}$ , es decir, aproximadamente tres veces mayor. En ese trabajo también compararon una línea de carcinoma epidermoide con otra de queratinocitos normales, con resultados similares.

Aunque los efectos de la apigenina sobre la viabilidad celular, tanto en el cáncer de próstata, como en otros tumores, han sido frecuentemente explicados por su capacidad de inducir apoptosis (Gupta, 2001; Gupta, 2002; Shukla, 2004a; Shukla, 2004b; Morrissey, 2005; Mak, 2006; Shukla, 2006; Chen, 2007a; Patel, 2007; Chen, 2008; Kaur, 2008; Choi, 2009c; Choi, 2009b; Li, 2009; Zhang, 2009; Das, 2010) y de provocar la parada de la división celular (Gupta, 2002; Shukla, 2004a; Shukla, 2006; Patel, 2007; Shukla, 2007a; Choi, 2009a; Li, 2009; Zhang, 2009), también afecta a muchas vías promotoras de supervivencia.

A pesar de que la relación de los procesos inflamatorios con el cáncer de próstata es controvertida, numerosos estudios han puesto de manifiesto la importancia de algunas citoquinas como factores de crecimiento de los tumores de próstata; entre ellas destacan las IL-1, -6, -8 y el TNF- $\alpha$  (Lin, 2007b; Haverkamp, 2008; Markowski, 2008). Estas citoquinas son inhibidas por la apigenina (Gerritsen, 1995; Smolinski, 2003; Kim, 2004a; Hougee, 2005; Kowalski, 2005; Comalada, 2006; Funaguchi, 2007; Nicholas, 2007; Shanmugam, 2008), lo que provocaría el bloqueo de las señales a favor de la supervivencia que activan estas moléculas.

La PGE<sub>2</sub> actúa sobre el cáncer de próstata como otro factor que favorece la supervivencia celular; además de actuar como factor de crecimiento, inhibe la apoptosis y estimula la angiogénesis y la metástasis

(Liu, 2000; Ghosh, 2007; Harris, 2007b; Assinder, 2009). Este compuesto se produce durante el metabolismo del ácido araquidónico por la acción secuencial de PLA<sub>2</sub> y de COX-2, enzima que se sobreexpresa en el cáncer de próstata (Kirschenbaum, 2000; Ghosh, 2007). Además, la expresión de COX-2 es inducida por el NO, producto de la enzima iNOS, también sobreexpresada en las neoplasias de próstata (Sciarra, 2007). La apigenina es un conocido inhibidor de estas enzimas (PLA<sub>2</sub>, COX-2 e iNOS), tanto en líneas celulares de cáncer de próstata (Shukla, 2004b) como en otros tipos celulares (Liang, 1999; Olszanecki, 2002; Kim, 2004a; Van Dross, 2005; Comalada, 2006; Kim, 2006; Van Dross, 2007; Benavente-García, 2008; Ha, 2008; Meeran, 2008a). La inhibición de la síntesis de PGE<sub>2</sub> en el cáncer de próstata mediante la apigenina se traduciría, así, en la pérdida de otra ruta promotora de supervivencia. Respaldo este efecto están ciertos estudios que demuestran que el uso de inhibidores de COX-2 reduce la incidencia de cáncer de próstata entre un 39% y un 55% (Harris, 2007a; Harris, 2007b), además de inhibir el crecimiento y aumentar la apoptosis en células tumorales de próstata (Liu, 2000; Harris, 2007a; Sciarra, 2007; Haverkamp, 2008).

Por otro lado, una de las estrategias de los cánceres, entre ellos el de próstata, para aumentar su proliferación y su capacidad de supervivencia es aumentar los receptores para distintos factores de crecimiento, como el del EGF; estos receptores tienen asociada actividad tirosín quinasa, por lo que la unión a su ligando provoca, directamente, la activación de vías de señalización intracelular que favorecen la supervivencia (Corcoran, 2006). Shukla *et al.* (2006) demostraron que la apigenina es capaz de bloquear uno de estos receptores, el de EGF, deteniendo, así, las señales promotoras de la supervivencia y la proliferación celular.

Dado que la regulación de las moléculas mencionadas (EGF-R, COX-2, iNOS) está alterada en el cáncer de próstata respecto al tejido prostático normal, el efecto inhibitorio de la apigenina sobre ellas podría ser responsable de que este flavonoide reduzca más la viabilidad en la línea tumoral que en la no tumoral.

Sin embargo, probablemente la principal señal de proliferación en el cáncer de próstata proceda del receptor de andrógenos, también implicado en la invasión y la metástasis (Tomlins, 2006; Hara, 2008; Crawford, 2009). La apigenina inhibe la expresión de este receptor (Gupta, 2002; Lin, 2007a) y disminuye los niveles de PSA (Gupta, 2002), que parece implicado en la activación de factores de crecimiento. De esta forma, la apigenina afectaría a otra ruta más de señalización promotora de la supervivencia del cáncer.

Por último, la apigenina también regula negativamente una serie de moléculas clave de rutas de señalización relacionadas con la supervivencia del cáncer de próstata, entre ellas, NF- $\kappa$ B (Shukla, 2004b) y Akt (Kaur, 2008).

Para estudiar más a fondo el efecto de la apigenina potásica sobre la viabilidad celular de las líneas TRAMP-C1 y PNT2, llevamos a cabo ensayos para comprobar si tenía efectos sobre la apoptosis y el ciclo celular de esas líneas celulares.

Durante la **apoptosis** se producen cambios morfológicos en las células que no se observan en la necrosis. Estas alteraciones afectan tanto al citoplasma como al núcleo y son fácilmente reconocibles. Las transformaciones más características son la disminución del tamaño y de

los puntos de adhesión (adquisición de forma redondeada) de la célula, la vacuolización del citoplasma, la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo y del citoplasma (Kiechle, 2002).

Existen diversos procedimientos para detectar la apoptosis, desde el análisis de la activación de proteínas relacionadas con la apoptosis, como las caspasas, hasta el estudio de la fragmentación del DNA; estos métodos utilizan gran variedad de técnicas: microscopía de fluorescencia, citometría de flujo, reacciones inmunohistoquímicas, *Western blot*, etc. (Huang, 2005; Huerta, 2007).

En la literatura científica es frecuente encontrar la utilización de tinciones del DNA con fluorocromos para evaluar los cambios producidos en el núcleo (fragmentación o condensación de la cromatina). Aunque existen varios compuestos fluorescentes capaces de unirse al DNA, las bisbenzimidias Hoechst 33342 y 33258 son muy usadas (Kiechle, 2002; Huerta, 2007). Estos fluorocromos se unen a regiones ricas en pares AT en los surcos menores del DNA y emiten una fluorescencia muy intensa, facilitando la identificación de células apoptóticas. La elección del Hoechst 33258 para nuestro estudio se debe a que, a pesar de que ambos son aproximadamente igual de utilizados en la literatura científica, se ha descrito que el Hoechst 33342 induce apoptosis en distintas líneas celulares (Kiechle, 2002).

En este estudio hemos utilizado la estaurosporina como inductor de apoptosis, para, en primer lugar, disponer de un control positivo que facilitara el reconocimiento de las células apoptóticas, y, en segundo lugar, para poder usarlo como referencia. Este compuesto es un alcaloide aislado de cultivos de *Streptomyces spp.* que actúa como un potente inhibidor de PKC e inductor de la apoptosis en numerosas líneas celulares

(Bertrand, 1994); se usa frecuentemente en estudios de apoptosis como control positivo.

En nuestro trabajo, la apigenina potásica ha demostrado aumentar significativamente el porcentaje de células apoptóticas en la línea celular de cáncer de próstata TRAMP-C1; este aumento ha sido dependiente tanto de la duración de la incubación como de la dosis del flavonoides usada. Así, la apigenina potásica incrementó el número de células apoptóticas respecto a las células no tratadas entre un 30% (50  $\mu$ M, 24 horas) y un 380% (200  $\mu$ M, 72 horas). Sin embargo, la apigenina potásica no mostró efecto proapoptótico sobre la línea celular no tumoral PNT2.

Estos resultados son, por tanto, similares a los obtenidos en el estudio de la viabilidad. En aquellos ensayos, la apigenina potásica también tuvo un efecto mucho más marcado sobre la viabilidad de la línea tumoral que sobre la de la no tumoral. La inhibición de la viabilidad causada por la apigenina potásica en la línea TRAMP-C1 puede ser, al menos en parte, debida al aumento de la apoptosis que provocó en esas células. Sobre la línea PNT2 (no tumoral), por otro lado, la apigenina potásica no tuvo efecto proapoptótico, con lo que esta actividad no contribuyó a disminuir la viabilidad de las células.

La apigenina y muchos flavonoides han demostrado ser inductores de apoptosis en un gran número de líneas celulares (Gupta, 2001; Hillman, 2001; Gupta, 2002; Shukla, 2004a; Shukla, 2004b; Morrissey, 2005; Mak, 2006; Shukla, 2006; Chen, 2007a; Patel, 2007; Chen, 2008; Kaur, 2008; Meeran, 2008b; Nandakumar, 2008; Choi, 2009b; Li, 2009; Zhang, 2009). Sin embargo, en la bibliografía no se encuentran trabajos con el derivado potásico de la apigenina, utilizado en nuestro estudio.

Se han realizado diversos estudios que, al igual que el nuestro, demuestran la capacidad de la apigenina de inducir apoptosis en células de distintas líneas de cáncer de próstata (22Rv1, CA-HPV-10, DU145, LNCaP, PC-3, PWR-1E) (Gupta, 2001; Gupta, 2002; Shukla, 2004b; Morrissey, 2005; Shukla, 2006; Shukla, 2008). Los resultados de estos estudios varían en función de la línea celular; así, Morrissey *et al.* (2005) demostraron que el porcentaje de células apoptóticas con una misma dosis de apigenina (50  $\mu$ M; incubación durante 48 horas) podía variar entre un 15% (PC-3) y un 30% (PWR-1E); no obstante, al comparar con el porcentaje de células apoptóticas de los controles no tratados, la apigenina inducía, en ambos casos, que el número de células apoptóticas se triplicara respecto al control.

Otros estudios muestran aumentos de entre el 8% (Shukla, 2006) y el 600% (Shukla, 2008), con distintas concentraciones y tiempos de incubación, diferentes líneas celulares, e, incluso, diferentes técnicas de medida. Sin embargo, los trabajos mencionados no incluyen, en ningún caso, controles positivos con inductores de apoptosis reconocidos, lo que facilitaría la comparación con los resultados obtenidos en nuestro estudio. Aún así, los porcentajes de inducción de apoptosis obtenidos en la línea TRAMP-C1 a lo largo del presente trabajo se encuentran en el rango de estudios anteriores, a pesar de no ser tan espectaculares como los obtenidos por otros autores; esto podría deberse al uso de diferentes líneas celulares y a una posible mayor resistencia a la apoptosis de la línea TRAMP-C1 frente a otras utilizadas en la bibliografía.

Por otro lado, en nuestro estudio la apigenina potásica ha demostrado tener efecto proapoptótico en la línea tumoral (TRAMP-C1), pero no en la línea no tumoral (PNT2). Este efecto tan interesante ha sido descrito previamente por Gupta *et al.* (2001). Estos autores compararon el efecto proapoptótico de la apigenina, no de su derivado potásico, en una

línea de carcinoma de próstata (CA-HPV-10) y en células de próstata no tumorales (PZ-HPV-7), encontrando que el flavonoide inducía apoptosis de forma significativa en células tumorales pero no en las normales. La inducción selectiva de apoptosis únicamente en células tumorales pero no en las células no tumorales correspondientes se ha observado también en líneas de glioblastoma tratadas con apigenina (Das, 2010).

Se han desarrollado numerosos estudios para desentrañar los mecanismos moleculares que subyacen bajo el efecto proapoptótico de la apigenina. Se ha comprobado que este flavonoide afecta a la mayoría de etapas clave de este proceso. Activa las dos vías de apoptosis, la intrínseca, que conduce a la activación secuencial de las caspasas 9 y 3, y la vía extrínseca, que conlleva el funcionamiento de la caspasa 8 (Way, 2004; Morrissey, 2005; Torkin, 2005; Way, 2005; Mak, 2006; Shukla, 2006; Patel, 2007; Choi, 2009b; Das, 2010). Además, aumenta la expresión y actividad de la proteína supresora tumoral p53, que, a su vez, regula las proteínas fundamentales de la apoptosis (McVean, 2000; Gupta, 2002; Torkin, 2005; Shukla, 2008). También modula el equilibrio entre otras proteínas Bax y Bcl-2, inclinándolo hacia la inducción de apoptosis (Gupta, 2002; Garg, 2005; Morrissey, 2005; Torkin, 2005; Shukla, 2006; Chen, 2007a; Patel, 2007; Shukla, 2008) e induce la salida al citoplasma de citocromo c (Shukla, 2004b; Way, 2004; Morrissey, 2005; Way, 2005; Patel, 2007; Choi, 2009b) y de calcio (Das, 2010), ambas moléculas reguladoras de la muerte celular programada.

Además, la PGE<sub>2</sub> sintetizada mediante COX-2 es capaz de inhibir la apoptosis en el cáncer de próstata (Liu, 2000; Ghosh, 2007; Harris, 2007b; Assinder, 2009), por lo que la inhibición de COX-2 y de iNOS, cuyo producto, el NO, aumenta la expresión de COX-2 (Sciarra, 2007) gracias a la apigenina sensibilizaría las células frente a la apoptosis. Dado que estas enzimas están sobreexpresadas en los tumores de próstata respecto al

epitelio prostático normal, este mecanismo de actuación podría explicar, al menos en parte, el distinto efecto de la apigenina sobre la apoptosis en células tumorales y no tumorales.

Desde el desarrollo de las técnicas de citometría de flujo, esta metodología se ha convertido en la preferida para el estudio del **ciclo celular**; esta técnica tiene grandes ventajas, como requerir una muestra relativamente pequeña, su rapidez y el gran volumen de datos analizados, y que es cuantitativa (D'Urso, 2010). Aunque la citometría de flujo permite la tinción con numerosos fluorocromos, probablemente la metodología estándar sea la tinción del DNA con yoduro de propidio o con otro tipo de fluorocromo con afinidad por el DNA (método univariante), que permite distinguir, según el contenido en DNA de cada célula, si se encuentra en las fases G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>, en la fase S, o en las fases G<sub>2</sub>-M (Darzynkiewicz, 2004; D'Urso, 2010).

No obstante, existen en la actualidad métodos que permiten diferenciar entre las fases G<sub>0</sub> y G<sub>1</sub>, y entre G<sub>2</sub> y M, basados bien en el uso de fluorocromos metacromáticos (naranja de acridina), o bien en la combinación de los métodos univariantes con la detección de ciclinas u otras proteínas implicadas en el ciclo celular o con el análisis de la incorporación al DNA de 5' bromodeoxiuridina, un análogo de la timidina (Darzynkiewicz, 2004; D'Urso, 2010).

En nuestro estudio, el tratamiento de células de la línea TRAMP-C1 con apigenina potásica (100 µM) durante 24, 48 y 72 horas no provocó cambios significativos en las poblaciones en las distintas fases del ciclo celular, indicando que no indujo la parada del ciclo celular en ninguno de

los puntos de control. Dado que no tuvo efecto en la línea tumoral, la técnica no se realizó con la línea no tumoral.

A pesar de que, de nuevo, no existen trabajos previos en este ámbito que hayan utilizado la apigenina potásica, varios autores han demostrado que la apigenina bloquea el ciclo celular en distintas líneas celulares, tales como células de cáncer de cuello de útero, de mama, de ovario, de próstata, y carcinoma escamoso de esófago (Gupta, 2001; Gupta, 2002; Kobayashi, 2002; Shukla, 2004a; Shukla, 2006; Patel, 2007; Shukla, 2007b; Choi, 2009c; Li, 2009; Zhang, 2009). En distintas líneas de cáncer de próstata la apigenina causa la parada del ciclo celular en G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> (Gupta, 2002; Shukla, 2004a; Shukla, 2007a), desde concentraciones tan bajas como 10 µM durante 24 horas en las líneas 22Rv1 y PC-3. En este caso, al igual que ocurría al estudiar la viabilidad y la apoptosis, la sensibilidad de las diferentes líneas celulares al bloqueo del ciclo por la apigenina varía (Gupta, 2002; Shukla, 2006).

Quizás la ausencia de efecto de la apigenina potásica se deba a la línea celular empleada, la TRAMP-C1, que ninguno de los autores mencionados han usado; sin embargo, Shukla *et al.* (2007b) demostraron que la apigenina es capaz de detener el ciclo celular en ratones TRAMP, de los que procede la línea TRAMP-C1 utilizada en este estudio. Así, a pesar de que no se puede descartar la posibilidad de que los tumores *in vivo* sean lo suficientemente heterogéneos como para presentar distintas poblaciones celulares con distinta sensibilidad, y que la línea TRAMP-C1, aislada de un único tumor, sea más resistente, el efecto podría deberse a alguna ligera diferencia entre la apigenina y la apigenina potásica. En cualquier caso, esto debería ser investigado en futuros estudios.

Como conclusión de esta serie de ensayos, el efecto antiproliferativo de la apigenina potásica encontrado en nuestro estudio se

debe, al menos parcialmente, a la inducción de apoptosis, pero no al bloqueo del ciclo celular. No obstante, también podrían estar implicados otros mecanismos (regulación de factores de crecimiento y transcripción, de vías de señalización, etc.) ya expuestos, por lo que sería conveniente profundizar en los mecanismos subyacentes a este efecto.

La técnica del *wound healing* ha sido ampliamente utilizada para estudios de **migración**, y consiste en cuantificar cómo las células ocupan una zona, linear o circular, despejada previamente a lo largo del tiempo (Valster, 2005; Kam, 2008). Aunque es fácil de realizar y permite medir la distancia recorrida a distintos tiempos, su principal defecto consiste en que no proporciona un microambiente similar al fisiológico. Por ello, se han desarrollado numerosos ensayos de invasión que incluyen geles de proteínas derivadas de la matriz extracelular. Uno de los más usados son las cámaras de Boyden, que usan filtros cubiertos de proteínas derivadas de la matriz extracelular; es una técnica cuantitativa, pero que sólo permite analizar los resultados a tiempo final (Albini, 2004; Valster, 2005; Kam, 2008; Brekhman, 2009).

Otros métodos consisten en cultivar las células en el interior de geles de componentes de la matriz extracelular y monitorizar su migración dentro del gel, pero son métodos más lentos y es difícil cuantificar el movimiento, puesto que no se dispone de un origen bien definido (Demou, 2002; Brekhman, 2009). Un tercer tipo de técnicas, muy similares a las cámaras de Boyden, parten de una monocapa de células sobre una capa de gel y, mediante varios métodos, recogen el movimiento unidireccional de las células a través de la matriz (Brekman, 2009). Una mezcla de estos dos últimos tipos, desarrollada hace poco tiempo, permite estudiar el

movimiento en todas direcciones, contando con un origen claro de las células (Brekhman, 2009).

Recientemente Kam *et al.* (2008) han desarrollado una modificación de la técnica del *wound healing* que incluye la adición de una barrera de componentes de la matriz extracelular, acercando las condiciones a la situación *in vivo*.

La técnica del *wound healing* utilizada en nuestro estudio cuantifica cómo las células ocupan una zona despejada previamente a lo largo del tiempo. Para evitar la posible interferencia de la proliferación celular, puesto que el área despejada podría ser ocupada por células procedentes de la división de las células del borde de la región sin células, en lugar de por el movimiento de las células de los bordes, los cultivos se dejaron llegar a confluencia, estado en el que se mantuvieron 24 horas. Dado que las células adherentes presentan inhibición del crecimiento por contacto, esta estrategia limita o bloquea el mencionado posible artefacto.

Por otro lado, las concentraciones empleadas en estos ensayos se mantuvieron por debajo de la IC50 para 48 horas, duración máxima de los experimentos, para evitar que el efecto antiproliferativo de la apigenina potásica pudiera influir en los resultados. A pesar de esta medida, la capacidad antiproliferativa de la apigenina potásica pareció no influir apenas en el ensayo, puesto que el flavonoide a la máxima concentración usada (100  $\mu$ M) inhibió de forma similar la migración en las líneas TRAMP-C1 (reducción del 59,82% respecto al control) y PNT2 (disminución del 40,89% respecto al control), a pesar de las grandes diferencias existentes en el efecto del compuesto sobre la viabilidad en ambas líneas (los porcentajes de viabilidad tras 48 horas de tratamiento fueron de un 46,25% en la línea TRAMP-C1 y de un 80,67% en la PNT2).

Si el efecto de la apigenina potásica sobre la proliferación celular hubiera influido, sería esperable una gran diferencia en la migración de ambas líneas celulares. Además, nuestro grupo realizó un estudio semejante con otro compuesto polifenólico, el ácido carnósico; este compuesto mostró alta capacidad citotóxica, pero, a pesar de ese efecto, no alteró significativamente la migración celular en comparación con los controles. Estos datos indican, por tanto, la adecuación del ensayo para estudiar la migración de estas dos líneas celulares.

En nuestro estudio, la apigenina potásica provocó la inhibición de la migración de la línea TRAMP-C1. Aunque en el estudio piloto previo, realizado para comprobar los intervalos de medida y las concentraciones empleadas, se encontraron diferencias significativas respecto a las células no tratadas con la concentración más baja (25  $\mu\text{M}$ ), en el posterior estudio, que incluyó más muestras, los resultados de esta concentración no fueron más que una tendencia. Así, en este estudio la concentración más alta de apigenina potásica (100  $\mu\text{M}$ ) provocó la inhibición de la migración celular, con un valor de inhibición máximo de 58,78%; con esta concentración nunca se llegó a ocupar completamente la zona libre de células.

La adición de la apigenina potásica desde 12 horas antes del inicio del experimento mostró una tendencia a reducir aún más la migración celular, aunque sin diferencias significativas.

Sobre la línea celular no tumoral PNT2, la apigenina potásica inhibió significativamente la migración celular a todas las concentraciones empleadas (25-100  $\mu\text{M}$ ), principalmente al comienzo del ensayo; las máximas reducciones producidas respecto a los controles fueron de entre un 18,65% y un 40,89% con la concentración más baja y la más alta, respectivamente. Solamente con la concentración más elevada, 100  $\mu\text{M}$ , las células no llegaron a cubrir por completo la zona despejada, mientras

que con el resto de concentraciones (20 y 50  $\mu\text{M}$ ) la inhibición de la migración duró, como máximo 12-15 horas.

La preincubación de las células PNT2 con apigenina potásica desde 12 horas antes del comienzo del experimento mostró una tendencia a inhibir todavía más la migración celular a todas las concentraciones ensayadas, aunque la diferencia únicamente resultó significativa con la apigenina potásica 100  $\mu\text{M}$ .

A pesar de que los resultados obtenidos en nuestro estudio son prometedores, sería conveniente profundizar en este aspecto mediante el uso de otras técnicas, tales como la cámara de Boyden. Esto permitiría, además de corroborar estos datos, analizar el efecto de la apigenina potásica sobre la capacidad invasora de las células tumorales, que ha quedado fuera de este trabajo.

Aunque no existen estudios de migración o invasión de células tumorales tratadas con apigenina potásica, algunos autores sí han comprobado que la apigenina inhibe la migración de células de cáncer de ovario, de mama, de cuello de útero y de próstata (Lindenmeyer, 2001; Patel, 2007; Czernik, 2008; Hu, 2008; Lee, 2008; Franzen, 2009). Además, la apigenina bloquea los cambios del citoesqueleto que se producen durante el movimiento celular (Lee, 2008). Sin embargo, ningún estudio previo parece haber comparado el efecto de la apigenina sobre la migración celular en líneas tumorales y no tumorales.

El efecto de la apigenina sobre la migración celular parece mediado por la inhibición de la quinasa FAK, que participa en la adhesión celular y en la motilidad celular (Hu, 2008; Franzen, 2009), aunque otros autores proponen también la implicación del bloqueo de la vía de PI3K y Akt (Lee, 2008).

Existen numerosos trabajos en los que la inoculación subcutánea de células de la línea TRAMP-C1 a ratones provoca el **desarrollo de tumores**. Así, Foster *et al.* (1997) demostraron que, tras la inoculación de  $5 \times 10^6$  células TRAMP-C1 subcutáneamente en el flanco de ratones C57Bl/6, todos los animales desarrollaban tumores. Posteriormente, otros grupos han realizado modelos similares, inoculando desde  $1,3 \times 10^6$  hasta  $5 \times 10^6$  células de esta línea en ratones C57Bl/6 (Ciavarra, 2003; Oh, 2004; Sartor, 2004; Bertilaccio, 2008; Chen, 2009; Hu, 2009; Kim, 2009; Klyushnenkova, 2009) o en ratones atímicos (Xiao, 2005; Rayburn, 2006).

Sin embargo, este modelo no resultó válido en nuestro trabajo. A pesar de inocular varias densidades celulares, nunca se desarrollaron tumores en todos los animales (la tasa de éxito se mantuvo en torno a un 30%) y el periodo de latencia resultó muy variable. Por ello, utilizamos uno de los pocos tumores obtenidos por inoculación subcutánea para implantar pequeños fragmentos en ratones sanos, de forma similar a lo realizado por otros autores (Ozerdem, 2006). Este método mostró una eficacia máxima (100%) y gran reproducibilidad; los tumores en todos los animales fueron palpables entre los días 20 y 21 tras el trasplante, permitiendo realizar el estudio de los efectos de la apigenina sobre la supervivencia de estos ratones.

En nuestro trabajo, la apigenina potásica provocó un aumento de la supervivencia media de los animales tratados; este incremento fue de un 45,24% respecto a los ratones control. Asimismo, el tratamiento produjo una ligera mejora en la vida máxima, de un 4,88% respecto a los animales no tratados. No obstante, el pequeño tamaño muestral disponible provocó que las diferencias no fueran significativas.

La apigenina ha mostrado efectos quimiopreventivos similares en distintos modelos de cáncer. Así, en un modelo de carcinogénesis oral en

hámsters realizado por nuestro grupo, la apigenina potásica redujo significativamente la incidencia, el tamaño y agresividad de los tumores, además de aumentar el periodo de latencia (Gómez García, 2009). Además, provoca la reducción del tamaño de tumores primarios de distintos cánceres (de pulmón, de piel, de cuello de útero, de ovario, de próstata, leucemia...) (Shukla, 2006; Chen, 2007a; Li, 2009); en los que también induce apoptosis (Chen, 2007a; Chen, 2008; Kaur, 2008).

En modelos murinos de cáncer de próstata se ha descrito que, de forma similar a nuestros resultados, la apigenina reduce el peso y volumen tumorales y aumenta la supervivencia de los animales (Shukla, 2005; Shukla, 2006; Shukla, 2009).

El aumento de la supervivencia de los animales portadores de tumores y tratados con apigenina potásica puede relacionarse con los resultados obtenidos *in vitro*. En nuestro estudio, la apigenina potásica redujo la viabilidad celular, aumentó la apoptosis e inhibió la migración celular. La disminución de la viabilidad y el incremento de la apoptosis podrían retardar el crecimiento de los tumores; en este sentido, Shukla *et al.* (2005; 2006; 2007b; 2009) demostraron que la apigenina reduce el peso y volumen tumorales, en parte por el aumento de la apoptosis (duplicación o triplicación del número de células apoptóticas) en los tumores (Shukla, 2006).

Por otra parte, la inhibición de la migración celular, en combinación con los efectos antiproliferativos y proapoptóticos, podría limitar la extensión del tumor, que permanecería más confinado y, quizás, sería más fácil de controlar por las defensas del organismo. Hu *et al.* (2008) demostraron que la apigenina inhibe *in vivo* la expresión de la FAK, una quinasa implicada en la movilidad celular y la invasión, en tumores de una

línea celular de carcinoma ovárico, lo que relacionaron con su efecto antimetastásico.

Asimismo, la apigenina ha demostrado inhibir la angiogénesis tanto *in vitro* (Trochon, 2000; Kim, 2003; Liu, 2005; Shukla, 2006; Benavente-García, 2008; Mirzoeva, 2008) como *in vivo* (Shukla, 2008). La capacidad de este flavonoide de bloquear la creación de nuevos vasos para alimentar al tumor limitaría de forma muy efectiva el crecimiento de los mismos, aumentando de este modo la supervivencia de los animales. Por otra parte, la actividad antiangiogénica de la apigenina está parcialmente implicada, también, en otra de sus propiedades: este flavonoide ha demostrado inhibir las metástasis en distintos modelos animales (Benavente-García, 2008; Hu, 2008; Lee, 2008), incluyendo uno de melanoma metastásico pulmonar desarrollado por nuestro grupo (Martínez Conesa, 2004).

El efecto antimetastásico de la apigenina también se fundamenta en su capacidad de controlar la secreción de MMP y de sus reguladores, TIMP-1 y -2 y uPA (Lindenmeyer, 2001; Kim, 2003; Benavente-García, 2008). Aunque en nuestro estudio no se ha realizado la evaluación de la presencia de metástasis, sí está descrito que los tumores TRAMP, de los que procede la línea celular TRAMP-C1, establecen metástasis rápidamente (Gingrich, 1996). Así, el efecto antimetastásico de la apigenina podría conllevar un aumento de la supervivencia de los animales.

Por último, cabe destacar el efecto de la apigenina sobre muchos compuestos que funcionan como factores de crecimiento del cáncer de próstata, tales como citoquinas proinflamatorias (Gerritsen, 1995; Smolinski, 2003; Kim, 2004a; Hougee, 2005; Kowalski, 2005; Comalada, 2006; Funaguchi, 2007; Nicholas, 2007; Shanmugam, 2008),

prostaglandinas (Liang, 1999; Olszanecki, 2002; Kim, 2004a; Shukla, 2004b; Van Dross, 2005; Comalada, 2006; Kim, 2006; Van Dross, 2007; Benavente-García, 2008; Ha, 2008; Meeran, 2008a); sobre receptores de factores de crecimiento (Shukla, 2006); o vías de señalización como la del receptor de andrógenos (Gupta, 2002; Lin, 2007a), la de NF- $\kappa$ B (Shukla, 2004b) o la de Akt (Kaur, 2008).

En resumen, nuestro estudio ha demostrado el potencial de la apigenina potásica como agente quimiopreventivo frente al cáncer de próstata, puesto que este compuesto inhibió la viabilidad celular y provocó apoptosis en mayor medida en células neoplásicas que en las no tumorales, redujo la migración celular y aumentó la supervivencia de animales con tumores.

La exposición accidental o no a la **radiación ionizante** (durante técnicas de diagnóstico médico o aplicaciones industriales, vuelos, etc.) y los daños genéticos causados por ella aumentan por el auge de su aplicación en la sociedad actual. Sin embargo, no se dispone de radioprotectores seguros, ya que los utilizados presentan toxicidad a dosis radioprotectoras (Bogo, 1985; Nair, 2001; Hosseinimehr, 2003; Hosseinimehr, 2006; Song, 2006; Alcaraz, 2009). Dado el reciente interés en el uso de compuestos polifenólicos como radioprotectores, en este trabajo hemos estudiado el efecto de la apigenina potásica para disminuir los daños causados por la radiación ionizante.

La radiación ionizante puede inducir la formación de fragmentos acéntricos de cromosomas y la segregación errónea de cromosomas; si

cualquiera de esas estructuras no interacciona con el huso mitótico, quedan en el citoplasma formando un pequeño núcleo (micronúcleo) aislado del principal (IAEA, 2001; Fenech, 2007). La técnica desarrollada por Fenech *et al.* (1985) para cuantificar la aparición de micronúcleos, conocida como ensayo de micronúcleos bloqueados durante la citoquinesis, se ha convertido en el método preferido para la cuantificación de este tipo de daños (IAEA, 2001; Fenech, 2007) y en una de las técnicas citogenéticas más utilizadas para estudiar los daños genotóxicos en mamíferos (Fenech, 2007). El ensayo de micronúcleos es uno de los métodos más sensibles para medir el daño al DNA causado por distintos agentes genotóxicos, entre ellos la radiación ionizante, el peróxido de hidrógeno, el radical superóxido o los neutrófilos activados (Fenech, 1985; Fenech, 1986; Fenech, 1991; Fenech, 1993; Odagiri, 1994; Fenech, 1997; Umegaki, 2000), siendo, incluso, más sensible que la detección de 8-oxo-dG por HPLC (Kobus, 1993).

Existen, además, otra serie de técnicas utilizadas para cuantificar el daño causado en el DNA, bien por la radiación ionizante, o bien por otros agentes genotóxicos. Otras técnicas citogenéticas analizan la presencia de cromosomas dicéntricos, anillos, exceso de fragmentos, o la condensación prematura de la cromatina (IAEA, 2001; Terzoudi, 2006); asimismo, el desarrollo de las técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) ha permitido estudiar daños más persistentes, como translocaciones (Terzoudi, 2006). Además, también se utilizan técnicas bioquímicas, como el estudio del bloqueo en la fase G<sub>2</sub>, que se produce cuando la célula ha sufrido daños cromosómicos, o la actividad de cdk 1 y de la ciclina B en la transición G<sub>2</sub>-M (Terzoudi, 2006). La técnica de Cometa, o la versión alcalina del ensayo de electroforesis en gel de una sola célula, es una técnica rápida para detectar daño en el DNA, y permite estimar la cinética de reparación de las lesiones (Kumaravel, 2006).

En nuestro estudio, la apigenina potásica (25  $\mu\text{M}$ ) demostró no poseer actividad genotóxica, puesto que no aumentó la frecuencia basal de aparición de **micronúcleos en linfocitos humanos bloqueados con citochalasina B**, lo que demuestra, por tanto, la ausencia de capacidad mutagénica de este compuesto. Diversos autores han descrito que la apigenina no tiene efectos genotóxicos a concentraciones similares a la usada en este estudio (Rithidech, 2005a; Siddique, 2008). No obstante, a dosis elevadas (90-100  $\mu\text{M}$ ) la apigenina ha demostrado cierto efecto genotóxico (Snyder, 2002; Rithidech, 2005a) que parece relacionado con su capacidad de intercalarse en el DNA (Snyder, 2002; Nafisi, 2008).

Además, la administración de apigenina potásica tanto antes de la radiación ionizante, como después, causó la reducción del número esperado de micronúcleos, mostrando así una capacidad genoprotectora significativa. Esta actividad antimutagénica alcanzó el 30% de protección, mientras que el factor reductor de dosis indicó que el daño causado por la radiación ionizante cuando se administraba apigenina potásica se redujo entre 2,5 y 3 veces. Aunque las diferencias no resultaron significativas, la adición del compuesto tras la irradiación mostró una tendencia a proteger más que la incubación previa a la irradiación.

Únicamente Rithidech *et al.* (2005a) estudiaron el efecto de la apigenina (no de la apigenina potásica) como radioprotector utilizando la misma técnica de bloqueo citoquinético en linfocitos humanos irradiados. En su estudio, el tratamiento preirradiación redujo considerablemente, aproximadamente en un 32%, la frecuencia de aparición de micronúcleos en linfocitos irradiados con la misma dosis (2 Gy) que la empleada en nuestro estudio; el efecto, además, resultó ser dosis dependiente, siendo máximo a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$ . En comparación, la apigenina potásica ha resultado más eficaz, puesto que los resultados obtenidos con ella son similares a los de Rithidech *et al.* (2005a), y la concentración

usada para lograr ese efecto es menor (25  $\mu\text{M}$  frente a, aproximadamente, 37  $\mu\text{M}$ ).

Sin embargo, la apigenina no se limita a proteger frente a la radiación ionizante. La apigenina, a dosis similares o menores que la utilizada en nuestro trabajo, ha demostrado reducir el daño genético inducido por distintos compuestos genotóxicos (ciclofosfamida, etinilestradiol, mitomicina C, etc.) en linfocitos (Siddique, 2008; Siddique, 2010) o *in vivo* (Khan, 2006; Siddique, 2009).

La radiación ionizante provoca la formación masiva de ROS en las células afectadas (Benavente-García, 2002; Rithidech, 2005a; Alcaraz, 2009). La generación de enormes cantidades de radicales libres sobrepasa la capacidad antioxidante de la célula, y el ataque oxidativo a distintas moléculas puede provocar daños cromosómicos y mutaciones, o, incluso, la muerte celular (Rithidech, 2005a).

Numerosos extractos o compuestos vegetales con actividad antioxidante (extractos de cítricos, de té rojo o negro, de soja; crisina, genisteína, hesperidina, luteolina, naringina, orientina, polifenoles del vino, quercetina, vicenina) disminuyen los daños inducidos por la radiación ionizante utilizando tanto diferentes versiones del test de micronúcleos (*in vitro* e *in vivo*) y el test Cometa (Shimoi, 1994; Shimoi, 1996; Parshad, 1998; Uma Devi, 2000; Vrinda, 2001; Greenrod, 2003; Hosseinimehr, 2003; Zhou, 2005; Hosseinimehr, 2006; Song, 2006; Benkovic, 2009b; Benkovic, 2009a). Nuestro grupo ha demostrado, asimismo, la actividad radioprotectora de extractos ricos en polifenoles y flavonoides, como extractos de olivo, de semilla de uva y de té verde (Castillo, 2000; Castillo, 2001; Benavente-García, 2002; Del Baño, 2006; Alcaraz, 2009; Castillo, 2010) y de polifenoles y flavonoides, como los ácidos carnósico, rosmarínico, gálico y elágico, el carnosol o el hidroxitirosol (Alcaraz, 2006;

Del Baño, 2006; Alcaraz, 2009), la rutina y la diosmina (Castillo, 2000; Benavente-García, 2002). Por otro lado, muchos otros compuestos con actividad antioxidante, como compuestos con grupos sulfidrilo, como la cisteína o la amifostina, vitaminas antioxidantes, etc., también se han empleado como radioprotectores (Bogo, 1985; Nair, 2001; Song, 2006; Alcaraz, 2009).

Dada la síntesis masiva de radicales libres inducida por la radiación ionizante y la actividad radioprotectora de muchos compuestos antioxidantes, numerosos autores han considerado que su capacidad antigenotóxica se basa, fundamentalmente, en la eliminación de ROS por los antioxidantes (Devi, 1999; Castillo, 2000; Uma Devi, 2000; Castillo, 2001; Benavente-García, 2002; Del Baño, 2006; Alcaraz, 2009). Por tanto, la actividad radioprotectora de la apigenina se justificaría por su capacidad del flavonoide de capturar radicales libres (Kim, 2004b; Nagai, 2005; Patel, 2007) e inhibir el estrés oxidativo (Jeyabal, 2005; Duarte-Almeida, 2006; Patel, 2007); y, quizás, por la protección de los sistemas antioxidantes endógenos (Khan, 2006).

Por otro lado, la actividad protectora mostrada por la apigenina potásica al ser administrada tras la irradiación indica su capacidad para estabilizar la membrana citoplasmática frente a los daños causados por los radicales libres, así como la reducción de la cascada de generación de radicales libres post irradiación (Alcaraz, 2009).

El estudio de la **capacidad radioprotectora de la apigenina potásica sobre líneas celulares** mostró resultados similares a los del test de micronúcleos. En nuestro estudio, la apigenina potásica (20 y 40  $\mu\text{M}$ ) mostró una toxicidad sobre la línea celular TRAMP-C1 similar a la presentada en el estudio de viabilidad celular. Al igual que en el estudio de

viabilidad previo, estas concentraciones de flavonoide resultaron menos tóxicas sobre la línea PNT2 que sobre la línea tumoral.

Además, la adición de apigenina potásica a las células TRAMP-C1 antes de la exposición a radiación X (4-10 Gy) aumentó significativamente la viabilidad celular respecto a las células irradiadas, demostrando su capacidad radioprotectora. Sobre esta línea celular, la apigenina potásica 20  $\mu\text{M}$ , que mostró la mayor actividad antígenotóxica, presentó un efecto protector de entre un 58% y un 86% con la concentración de 20  $\mu\text{M}$ ; el factor reductor de dosis señaló que la adición del flavonoide a esta concentración reducía los daños de la radiación ionizante entre 2,6 y 9,6 veces.

En la línea PNT2, al contrario, fue la mayor concentración, 40  $\mu\text{M}$ , la que presentó mayor capacidad protectora. En este caso, la capacidad protectora de la flavona estuvo entre un 50% (apigenina potásica 20  $\mu\text{M}$  y 10 Gy, tras 24 horas de la irradiación) y un 74% (apigenina potásica 40  $\mu\text{M}$  y 10 Gy, tras 48 horas de la irradiación). El factor reductor de dosis indicó que el daño causado por la radiación ionizante al administrar la apigenina potásica era entre 2 y 4,9 veces menor que cuando no se añadía el flavonoide.

Estos resultados, por tanto, indican la actividad radioprotectora y antígenotóxica de la apigenina potásica sobre las líneas celulares, al igual que lo descrito en nuestro estudio con linfocitos humanos. En este sistema, la apigenina potásica posee, incluso, una capacidad protectora mayor que la mostrada en el ensayo de micronúcleos en linfocitos humanos bloqueados citoquinéticamente. Así, mientras que el factor de protección obtenido en el ensayo de micronúcleos era de, aproximadamente, un 30%, sobre estas dos líneas celulares alcanzó hasta un 74% en la línea PNT2 y un 86% en la línea TRAMP-C1.

Sin embargo, varios estudios han encontrado que varios flavonoides, entre ellos la apigenina, aumentan la sensibilidad de distintas líneas celulares a la radiación (van Rijn, 1997; Hillman, 2001; Zhang, 2006; Watanabe, 2007; Shin, 2008). En estos estudios, la apigenina ha demostrado efectos radiosensibilizantes en células de hepatoma (van Rijn, 1997; Shin, 2008) y de carcinoma escamoso de pulmón (Watanabe, 2007). Nuestros resultados, por tanto, contrastan con los descritos por otros autores en estudios similares, ya que nuestros datos indican una clara actividad radioprotectora de la apigenina potásica.

En conclusión, la apigenina potásica ha demostrado tener efecto protector frente a los daños inducidos por la radiación ionizante en linfocitos humanos, mostrando un factor de protección de entre un 27 y un 35 %, y en dos líneas celulares de próstata, con un factor de protección de un 50-86 %.

La exposición de la piel a la **radiación UV** causa el 90% de los tumores de piel (Filip, 2009; Nichols, 2010), que, el año pasado en EEUU, supusieron más de un millón de casos nuevos de cánceres cutáneos no melanoma y, aproximadamente, 53 000 de melanoma (Jemal, 2009). Por otro lado, también es responsable del envejecimiento prematuro de la piel, o fotoenvejecimiento, que ha cobrado tal interés social que las ventas de productos o tratamientos relacionados con él suponen unos 10 000 millones de dólares anuales (Yaar, 2007).

Al igual que en otros campos de investigación, se está produciendo un auge en el estudio de las propiedades de los polifenoles frente a la

fotocarcinogénesis y el fotoenvejecimiento (Svobodova, 2003; Yaar, 2007; González, 2008).

El estudio de los posibles efectos fotoprotectores de la apigenina potásica se realizó en un modelo de fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis similar al desarrollado por nuestro grupo (Gómez García, 2007) y utilizado previamente para demostrar el efecto del ácido rosmarínico frente a la fotocarcinogénesis (Sánchez-Campillo, 2009). En el presente trabajo, en lugar de sacrificar a todos los animales al final del experimento, igual que se realizó en los estudios comentados, se realizaron sacrificios a lo largo del ensayo (tras 25 y 50 horas de exposición) y al final (tras 100 horas de exposición) para poder evaluar, además del efecto final, la evolución de los daños causados por la radiación UV.

La acción de la radiación UV sobre la piel provoca fotoenvejecimiento, que conlleva cambios en todas las capas de la piel. Macroscópicamente, la piel aparece más seca y rugosa y menos elástica, presenta arrugas, elastosis y cambios de pigmentación y desarrolla lesiones queratósicas y, en último término, neoplásicas (Rabe, 2006; Yaar, 2007). Todos estos cambios reflejan las alteraciones histológicas: la compactación del estrato córneo y el engrosamiento irregular de la capa granular están relacionados con la sequedad y la rugosidad; los acúmulos desorganizados de elastina y de material amorfo en la dermis son responsables de la elastosis y la falta de elasticidad; las atipias y la pérdida de la polaridad de los queratinocitos y la hiperplasia epidérmica causan las queratosis actínicas, mientras que los cambios de pigmentación se relacionan con los cambios en abundancia y actividad de los melanocitos (Svobodova, 2006; Yaar, 2007).

En este trabajo, los animales irradiados con radiación UV mostraron progresivamente todas estas características: arrugas, alopecia, zonas engrosadas y lesiones queratósicas, macroscópicamente; y, microscópicamente, alteraciones del grosor (atrofia, acantosis), hiperplasia y displasia en la epidermis, y acumulación de material fibroso y de elastina desorganizada en la dermis papilar y reticular, respectivamente. Nuestro grupo había descrito todas esas alteraciones previamente en este modelo (Gómez García, 2007); sin embargo, a diferencia de ese estudio, en el presente trabajo, incluso en los animales expuestos a 100 horas, no se encontraron zonas de displasia severa o de grado III, ni se desarrollaron carcinomas. Quizás, las diferencias se deban a que en este estudio la irradiación máxima fue de 100 horas, frente a las 120 del experimento de Gómez García (2007).

En este trabajo, la apigenina potásica ha demostrado proteger frente a la radiación UV. Macroscópicamente, la piel del lomo de los animales que recibieron el flavonoide en la dieta estaba menos dañada que la de los ratones únicamente expuestos a radiación UV, aunque presentaba lesiones características del fotoenvejecimiento (alopecia, arrugas, etc.). Microscópicamente, las mayores diferencias entre ambos grupos se mostraban en cuanto a la displasia epitelial y a la elastosis actínica dérmica. El grupo tratado presentaba zonas de displasia epitelial de una extensión hasta un 34% menor que en el grupo irradiado, así como una menor frecuencia (hasta un 43% menos) de lesiones displásicas de grado II o moderado. También había diferencias en cuanto a la presencia de elastosis; tras 25 sesiones de radiación UV la elastosis era un 28% menos frecuente en los animales tratados con la apigenina potásica que en los solo irradiados, mientras que tras 100 sesiones, aunque todo el tejido estaba afectado en ambos grupos, en el tratado con el compuesto la elastosis de grado II era un 32% menos frecuente que en el otro grupo.

Aunque existen numerosos trabajos sobre el efecto fotoprotector de distintos compuestos fenólicos, como extractos vegetales ricos en polifenoles (extractos de *Polypodium leucotomos*, de *Sylibum marianum* o de té verde) o compuestos (genisteína, resveratrol, curcumina, silimarina, quercetina, EGCG, epicatequina, silibina, ácidos rosmarínico, cafeico, ferúlico y carnósico, etc.) (Lepley, 1997; Svobodova, 2006; Tong, 2007; Yaar, 2007; Dinkova-Kostova, 2008; González, 2008; Filip, 2009; Meeran, 2009; Sánchez-Campillo, 2009; Nichols, 2010; Sharma, 2010), son pocos los desarrollados sobre la apigenina, y ninguno sobre su derivado potásico, utilizado en este trabajo. Además, ninguno de los estudios existentes sobre la apigenina ha evaluado su efecto sobre los parámetros histológicos alterados por el fotoenvejecimiento, aspecto en el que se centra el presente trabajo.

Birt *et al.* (1997) demostraron que la aplicación tópica de apigenina reducía a la mitad el desarrollo de tumores por la exposición a radiación UVB, y aumentaba la supervivencia libre de tumores respecto a los animales únicamente expuestos. En nuestro estudio no llegaron a desarrollarse tumores, pero sí otro tipo de lesiones relacionadas con aquellos: queratosis actínicas, displasia epitelial y elastosis. Así, las queratosis actínicas se consideran actualmente como carcinomas escamosos *in situ* muy tempranos (Roewert-Huber, 2007). Asimismo, diversos autores han demostrado la relación entre la elastosis solar y el cáncer cutáneo; esta alteración se correlaciona con un aumento del riesgo de padecer cáncer cutáneo no melanoma (Chuang, 1999; Moon, 2001) y también de la mortalidad por melanoma (Berwick, 2005). La apigenina potásica redujo el desarrollo de las lesiones queratósicas y la elastosis solar, fundamentalmente la de grado II o moderado, además de disminuir la displasia epitelial, principalmente la de grado II. Estos datos demuestran su actividad antineoplásica frente a la fotocarcinogénesis en este modelo.

En un estudio de nuestro grupo similar al presente, el ácido rosmarínico mostró también efecto fotoprotector (Sánchez-Campillo, 2009). Los animales tratados con ácido rosmarínico y expuestos a 120 horas de radiación UV apenas presentaron displasia epitelial, siempre de grado I o leve, frente a los animales únicamente expuestos, que mostraban displasia moderada o severa. El ácido rosmarínico, además, demostró actividad antioxidante y antimutagénica, además de aumentar la expresión y actividad de la tirosinasa, enzima clave de la síntesis de melanina, lo que contribuiría a su capacidad protectora.

La piel presenta diversos tipos de moléculas capaces de absorber radiación UV, aunque los ácidos nucleicos son los cromóforos más importantes en la respuesta cutánea a la luz UV (Svobodova, 2006; González, 2008). Cuando los ácidos nucleicos captan radiación UVB se forman fotoproductos que pueden causar mutaciones muy características (Svobodova, 2006; de Gruijl, 2008; González, 2008; Rundhaug, 2008; Filip, 2009). Se ha propuesto que uno de los mecanismos de actuación de los compuestos fitoquímicos es actuar como cromóforos, absorbiendo la radiación UV directamente (Dinkova-Kostova, 2008). Sin embargo, en su estudio, Birt *et al.* (1997) sugieren que la apigenina no reduce directamente los daños en el ADN por absorción directa de la radiación UV.

Los fotoproductos inducidos por la radiación UV en el DNA pueden ser detectados y eliminados; estas rutas de reparación activan a quinasas como ATM o ATR, que, a su vez, activan a otras proteínas como p53, bloqueando el ciclo celular para permitir la reparación del DNA. En el caso de que el daño no pudiera ser corregido, la célula entra en apoptosis (Svobodova, 2006; Rundhaug, 2008; Nakanishi, 2009). La apigenina es capaz de activar a ATM, ATR (O'Prey, 2003) y p53 (McVean, 2000; Gupta, 2002; Torkin, 2005; Shukla, 2008), lo que facilitaría la reparación del DNA

dañado. La apigenina también ha demostrado bloquear el ciclo celular en queratinocitos ( $G_2$ -M) y en fibroblastos ( $G_1$ ) expuestos a radiación UV; inhibe la actividad de las cdk, induce la acumulación de p53 y aumenta los niveles de p21/WAF-1 (Lepley, 1997; McVean, 2000; Patel, 2007); además Abu-Yousif *et al.* (2008) demostraron que la apigenina provoca la salida de citocromo c al citoplasma y la translocación de Bax a la mitocondria en respuesta a la radiación UVB. Los datos del presente estudio y de otros autores, que muestran que la apigenina induce apoptosis en distintas líneas celulares tumorales, pero no en sus correspondientes líneas no tumorales (Gupta, 2001; Das, 2010), parecen indicar que este efecto se podría limitar, únicamente, a las células cutáneas transformadas por la radiación UV.

Por otro lado, la exposición a radiación UV, bien sea UVA o UVB, provoca la rápida formación de ROS y RNS (Nishigori, 2006; Svobodova, 2006; Straface, 2007; Bossi, 2008; Rundhaug, 2008; Huang, 2009), que oxidan distintas moléculas celulares, alterando la estructura y función celulares. Las principales dianas de los ROS son el DNA (Wilgus, 2003b; Svobodova, 2006; de Gruijl, 2008; Rundhaug, 2008), los lípidos de las membranas (Nishigori, 2006; Svobodova, 2006; Bossi, 2008; Filip, 2009; Rhodes, 2009) y las proteínas (Svobodova, 2006; Yaar, 2007). Además, la radiación UV causa la depleción de la red de antioxidantes endógenos (glutación, ubiquinona,  $\alpha$ -tocoferol, catalasa, glutación peroxidasa, glutación reductasa, SOD) (Shindo, 1994; Svobodova, 2006; Bossi, 2008). La apigenina tiene capacidad antioxidante (Kim, 2004b; Nagai, 2005; Patel, 2007), y también es capaz de aumentar o proteger a los antioxidantes de la célula (Manach, 2004; Khan, 2006; Rahman, 2006), lo que reduciría los daños provocados por la radiación UV.

La radiación UV, de forma directa o a través de la acción de los ROS sobre los centros catalíticos de las fosfatasas (Yaar, 2007;

Rundhaug, 2008; Brzoska, 2009) o sobre el proteasoma (Yaar, 2007; Catalgol, 2009), causa la activación de numerosas proteínas implicadas en vías promotoras de proliferación celular, tales como el receptor de EGF, las MAPK, PI3K, Akt, PKC, AP-1 y NF- $\kappa$ B (Mahns, 2004; Reelfs, 2004; Wheeler, 2004; Bachelor, 2005; Kim, 2005b; Svobodova, 2006; Aziz, 2007; Yaar, 2007; Bossi, 2008; O'Dea, 2008; Rundhaug, 2008; Brzoska, 2009; Catalgol, 2009; Huang, 2009). La activación de estas moléculas se ha relacionado, en ocasiones, con alteraciones características del fotoenvejecimiento; así, la activación de AP-1, está implicada en la hiperplasia epitelial e inhibe la síntesis de colágeno (Yaar, 2007), mientras que el NF- $\kappa$ B activo interviene en la angiogénesis y la infiltración inflamatoria (Yaar, 2007; Brzoska, 2009) y algunas isozimas de PKC participan en el desarrollo de cánceres cutáneos (Wheeler, 2004; Aziz, 2007).

La apigenina ha demostrado, en diversos estudios, modular la actividad de muchas de estas proteínas, reduciendo, así, las alteraciones provocadas por la radiación UV. Inhibe la activación del receptor de EGF (Shukla, 2006) y del factor nuclear AP-1 en respuesta a la radiación UV (Lim, 2007; Dinkova-Kostova, 2008) y a otros estímulos (Chen, 2004). También inhibe la actividad de las MAPK (O'Prey, 2003; Chen, 2004; Sawatzky, 2006; Patel, 2007; Ha, 2008) y las vías de PI3K/Akt (Kim, 2004a; Van Dross, 2005; Ruiz, 2006; Shukla, 2006; Kaur, 2008; Lee, 2008; Mirzoeva, 2008; Li, 2009), de PKC (Liang, 1999; Rithidech, 2005a; Patel, 2007) y de NF- $\kappa$ B (Liang, 1999; Gupta, 2002; Chen, 2004; Shukla, 2004a; Shukla, 2004b; Comalada, 2006; Ruiz, 2006; Chen, 2007b; Nicholas, 2007).

Asimismo, Birt *et al.* (1997) demostraron que la apigenina reduce la inducción de la enzima OCD, un marcador de promoción tumoral cuya expresión y actividad se ven aumentadas en respuesta a la exposición

aguda o crónica a radiación UVB (Afaq, 2005; Svobodova, 2006; Yaar, 2007; de Gruijl, 2008); efecto que relacionaron con la reducción en el número de tumores causada por el flavonoide.

Además, la radiación UV inhibe las sintasas de ácido hialurónico y la producción de ácido hialurónico (Dai, 2007) y de colágeno (Svobodova, 2006; Yaar, 2007) y aumenta la de elastina (Svobodova, 2006), además de provocar la liberación de MMP (Svobodova, 2006; Yaar, 2007; Catalgol, 2009) y bloquear la producción de inhibidores de las proteasas (Catalgol, 2009). Por otro lado, al inducir la infiltración de células inflamatorias, especialmente de neutrófilos, causa la liberación de elastasa (MMP-8); este mecanismo se considera el principal responsable de la degradación de la matriz extracelular en el fotoenvejecimiento (Rijken, 2005; Yaar, 2007; Imokawa, 2009; Rijken, 2009). La alteración en la producción de ácido hialurónico, colágeno y elastina, y el aumento de la degradación de la matriz extracelular dérmica son los responsables de la elastosis solar (Rijken, 2009).

En este trabajo, la apigenina potásica redujo la intensidad de la elastosis, mostrando efecto fotoprotector; la apigenina, ha demostrado reducir la síntesis y secreción de distintas MMP inducidas por radiación UV (Kim, 2003; Lim, 2007; Choi, 2009a), lo que provocaría la disminución de la elastosis. Sin embargo, probablemente este efecto protector frente a la elastosis se deba, fundamentalmente, a su actividad antiinflamatoria, comprobada en este estudio y por diversos autores (Gerritsen, 1995; Hougee, 2005; Kowalski, 2005; Comalada, 2006; Yano, 2009), que reduciría la infiltración de neutrófilos, principales causantes de la elastosis solar (Rijken, 2005; Yaar, 2007; Imokawa, 2009; Rijken, 2009). Asimismo, la apigenina altera la actividad de los neutrófilos (Kanashiro, 2007; García-Lafuente, 2009), lo que contribuiría a este efecto.

Otra ruta metabólica importante afectada por la radiación UV es la del ácido araquidónico, implicada en la vasodilatación, en la inflamación y en la proliferación de queratinocitos y el desarrollo de cánceres cutáneos (An, 2002; Wilgus, 2002; Tripp, 2003; Wilgus, 2003a; Wilgus, 2003b; Butler, 2005; Fischer, 2007; Rundhaug, 2008; Rhodes, 2009). La radiación UV de forma directa o indirecta activa varias enzimas de esta vía, tanto a PLA<sub>2</sub> (Bachelor, 2004), como a COX-2 y 12-LOX (Mahns, 2004; Afaq, 2005; Bachelor, 2005; Kim, 2005b; Svobodova, 2006; Yaar, 2007; Rhodes, 2009). Además, la radiación UV también aumenta la expresión de iNOS, implicada en el eritema e inmunosupresión (Cals-Grierson, 2004; Svobodova, 2006). La apigenina ha demostrado inhibir todas las enzimas mencionadas (Liang, 1999; Olszanecki, 2002; Kim, 2004a; Van Dross, 2005; Comalada, 2006; Kim, 2006; Tong, 2007; Van Dross, 2007), lo que contribuye a su efecto fotoprotector.

Por último, distintos autores han demostrado la implicación de diversas citoquinas y quimioquinas en diferentes procesos del fotoenvejecimiento, como IFN- $\beta$ , IL-1, -4, -6, -8 y -10, MCP-1 o TNF- $\alpha$  (Kondo, 2000; Kim, 2005b; Svobodova, 2006; Gambichler, 2007; Yaar, 2007; Dinkova-Kostova, 2008), que son inhibidas por la apigenina (Gerritsen, 1995; Smolinski, 2003; Hougee, 2005; Kowalski, 2005; Comalada, 2006; Funaguchi, 2007; Kawai, 2007; Nicholas, 2007; Yano, 2007; Shanmugam, 2008; Choi, 2009a; Yano, 2009; Huang, 2010).

El **estudio ultraestructural** de muestras de piel de animales únicamente expuestos a radiación UV y de ratones expuestos y tratados con apigenina potásica mostró resultados similares a los observados mediante microscopía óptica. La epidermis de los animales expuestos exclusivamente a radiación UV presentaba alteraciones más importantes

(pérdida de polaridad, alteración de las uniones intercelulares, pleomorfismo celular y nuclear), que la de los animales correspondientes irradiados y tratados con apigenina potásica; de igual forma, las alteraciones en la dermis también eran más intensas en el grupo únicamente expuesto.

En la bibliografía apenas existen estudios con microscopía electrónica sobre los cambios cutáneos producidos por el fotoenvejecimiento. Ditre *et al.* (1996) encontraron que los queratinocitos de la epidermis expuesta al sol presentaban alteraciones de las uniones intercelulares, acúmulos de tonofilamentos en el citoplasma y núcleos irregulares, mientras que otros autores observaron vacuolización del citoplasma y aumento de los espacios intercelulares (Toyoda, 1995; Yamamoto, 1995; Toyoda, 1998). Estas características, también descritas en nuestro estudio en los animales exclusivamente irradiados, mejoraron con el tratamiento con  $\alpha$  hidroxilácidos o tretinoína (Yamamoto, 1995; Ditre, 1996); de forma similar, en nuestro estudio, la apigenina potásica ha prevenido todas estas alteraciones.

Por otro lado, El-Domyati *et al.* (2002) describen un aumento de las fibras elásticas y una disminución y desorganización de las colágenas en la piel fotoenvejecida respecto a la protegida a lo largo del tiempo. Nuestro estudio, tanto mediante microscopía óptica como electrónica, también ha puesto de manifiesto la progresiva desestructuración de las fibras de colágeno en las distintas muestras. Así, en las muestras tomadas del grupo irradiado tras 50 sesiones, la ultraestructura de estas fibras estaba muy alterada en ciertas zonas, aunque el tratamiento con apigenina potásica la había preservado en cierta medida.

Así, la apigenina potásica ha demostrado proteger frente a la radiación UV, reduciendo, principalmente, la displasia epitelial y la elastosis dérmica, marcadores de cánceres cutáneos.

A lo largo de todo el presente estudio, se recogieron muestras de distintos tejidos para poder evaluar, mediante HPLC, la **distribución** en el organismo de la apigenina potásica, siguiendo los protocolos de análisis e identificación establecidos por Del Baño *et al.* (2003; 2004).

En nuestro estudio, tras aproximadamente 10 semanas de ingestión (muestras correspondientes a 25 sesiones de radiación UV) de apigenina potásica en la dieta (37,82 mg/kg/día), las concentraciones plasmáticas del flavonoide habían alcanzado un nivel estable, que se mantendría en las muestras posteriores, situado entre 0,13 y 0,38  $\mu\text{M}$ . Por el contrario, los niveles de apigenina en hígado y cerebro aumentaron a lo largo del estudio, desde 0,30 - 0,49  $\mu\text{M}$  y 0,25 - 0,42  $\mu\text{M}$ , respectivamente, en las muestras tomadas tras 10 semanas de ingestión del compuesto, hasta 1,33 - 1,64  $\mu\text{M}$  y 0,63 - 0,89  $\mu\text{M}$ , respectivamente, al final del experimento, tras 35 semanas de dieta suplementada con apigenina potásica (muestras correspondientes a 100 sesiones de radiación UV).

El metabolismo de los polifenoles se realiza a través de una vía común. Las formas agliconas pueden ser absorbidas directamente en el intestino delgado, mientras que la mayoría de polifenoles (90-95%), que aparecen como glicósidos, polímeros, etc., deben ser hidrolizados por enzimas del intestino o de la flora del colon (Manach, 2004; Stevenson, 2007). Respecto a la apigenina, las formas más frecuentes en los alimentos (aciladas, glicosiladas) podrían, quizás, ser más biodisponibles que la forma pura, debido a su mayor hidrosolubilidad (Patel, 2007); por

otro lado, Walle *et al.* (2007) demostraron que la metilación aumenta la absorción intestinal de las flavonas.

La microflora del colon rompe los polifenoles conjugados que llegan al colon, los cuales pueden ser absorbidos por el epitelio colónico para llegar a la sangre o ser metabolizados por la flora hasta compuestos fenólicos más sencillos, que, incluso, pueden ser más activos que el polifenol original, como en el caso de la conversión de la daidzeína en equol (Stevenson, 2007).

Durante la absorción, los polifenoles son conjugados (metilación, sulfatación, glucuronización) en el intestino y en el hígado; las células intestinales pueden liberar los conjugados al lumen intestinal, fenómeno que, junto con la excreción biliar, aumenta la disponibilidad de estos compuestos para la microflora (Manach, 2004; Stevenson, 2007). El hígado y el intestino contienen niveles elevados de enzimas de fase I y II que hidroxilan y conjugan, respectivamente, los compuestos xenobióticos; aproximadamente un 90-95% de los polifenoles absorbidos son conjugados por glucuronización, sulfatación y metilación, reacciones que dependen del tipo de polifenol y de variaciones individuales (Manach, 2004; Stevenson, 2007).

Las UDP-glucuronosiltransferasas son enzimas de membrana localizadas en el retículo endoplasmático de diferentes tipos celulares, entre ellos, en los enterocitos y los hepatocitos. La subfamilia UGT1A, presente en el intestino, parece tener un importante papel en el primer metabolismo de los polifenoles (Manach, 2004). La apigenina induce la actividad UDP glucuronosiltransferasa (UGT1A1) y, a través de esta enzima, se metaboliza rápidamente y se conjuga con glucurósicos y sulfatos que son transportados en la sangre y excretados en la orina o la bilis (Walle, 2002).

Los polifenoles que se encuentran en el plasma son derivados conjugados y circulan unidos a la albúmina. La máxima concentración plasmática se alcanza entre 1 y 6 horas tras el consumo, y varía según el compuesto (Stevenson, 2007). Existen varios estudios, tanto en humanos como en animales, sobre las concentraciones plasmáticas que se pueden alcanzar tras la ingesta de apigenina, aunque ninguno recoge datos de una ingesta tan prolongada como nuestro trabajo. Así, Cao *et al.* (2010), en su estudio sobre el consumo en la dieta de distintos flavonoides en China, han comprobado que la ingesta media de apigenina es de 4,23 mg/día, con una concentración media en plasma de 10,62 nmol/l. También en humanos, Meyer *et al.* (2006) demostraron que, tras la ingestión de perejil ( $65,8 \pm 15,5$   $\mu\text{mol}$  de apigenina / kg) se alcanzó una concentración plasmática máxima de  $127 \pm 81$  nmol/l entre las 7 y las 9 horas tras la ingestión, cayendo por debajo del límite de detección a las 28 horas.

En animales, la apigenina ingerida en una única dosis se detecta a partir de las 9 horas, alcanzando un máximo a las 24 horas y manteniéndose durante 10 días (Gradolatto, 2005). La administración de apigenina con la dieta (300 mg/kg) durante 5-7 días permite que la concentración plasmática se estabilice en torno a 0,08-0,11 nmol/ml (equivalente a 0,08-0,11  $\mu\text{M}$ ) (Cai, 2007). Sin embargo, en nuestro estudio, con una dosis menor de apigenina potásica que la de apigenina administrada por Cai *et al.* (2007) los animales alcanzaron una concentración estable de apigenina en plasma de 0,13-0,38  $\mu\text{M}$ , es decir, entre 1,5 y 3,5 veces mayor que la descrita por esos autores. Quizás la mayor solubilidad del derivado potásico sea responsable de esta diferencia.

Los polifenoles son eliminados a través, fundamentalmente, de la orina y de la bilis; al ser secretados mediante la bilis al duodeno, pueden

ser metabolizados de nuevo por las bacterias intestinales y ser reabsorbidos, aumentando su presencia en el organismo gracias a este reciclaje enterohepático (Manach, 2004). Los metabolitos conjugados extensivamente son más fácilmente eliminados mediante la bilis, mientras que los conjugados pequeños (monosulfatos, etc.) (Manach, 2004). Diversos estudios han demostrado que la apigenina se metaboliza por la vía de reciclaje dual entérica y enterohepática (Chen, 2003; Hu, 2003; Chen, 2005; Patel, 2007).

Gradolatto *et al.* (2005) demostraron que la excreción de apigenina en la orina y las heces se produce, fundamentalmente, en las 24 horas posteriores a la administración; todos sus derivados son compuestos conjugados (Griffiths, 1972). En estudios en humanos, también se detecta apigenina en la orina a las 24 horas de la ingestión (Nielsen, 1999); Meyer *et al.* (2006) detectaron un  $0,22 \pm 0,16\%$  de la apigenina ingerida en la orina de las primeras 24 horas.

En la bilis, se detecta apigenina a las 2 horas de la administración, con un pico a las 3 horas y otro a las 5-6 horas (Gradolatto, 2005).

En otros tejidos, Gradolatto *et al.* (2005) detectaron la apigenina en la mucosa intestinal, el hígado y en los riñones tras 10 días de la administración de un única dosis de apigenina (10 mg/kg); estos tejidos contenían el 1,18%, el 9,41% y el 0,32% de la apigenina administrada, respectivamente. Cai *et al.* (2007) detectaron apigenina en el hígado ( $1,5 \pm 1$  nmol/g) y la mucosa del intestino delgado ( $36 \pm 47$  nmol/g), tras la ingestión del flavonoide durante 7 días (300 mg/kg). En nuestro estudio, la concentración de apigenina en las muestras de hígado tomadas tras la ingestión del flavonoide en la dieta durante 10 semanas es notablemente menor que la obtenida por Cai *et al.* (2007) tras 7 días de ingestión; los valores obtenidos en nuestro estudio son entre 3 y 4 veces menores que

los de los mencionados autores. Sin embargo, los valores de Cai *et al.* (2007) se acercan a los obtenidos en nuestro estudio tras la ingesta de apigenina durante 35 semanas. Probablemente, las diferencias existentes entre ambos estudios estén relacionadas con que la dosis de Cai *et al.* (2007) es, aproximadamente, 10 veces mayor que la utilizada en nuestro estudio.

Asimismo, en nuestro estudio evaluamos la concentración de apigenina presente en el cerebro; hasta el momento, no existe ningún trabajo publicado que haya comprobado la presencia de apigenina en el tejido cerebral. La concentración del flavonoide fue aumentando a lo largo del estudio, demostrando que este compuesto es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y acumularse en el cerebro, lo que explicaría los efectos sedantes de la apigenina ya descritos (McKay, 2006).

Así, la apigenina potásica ha demostrado estar presente en cantidades cuantificables en la sangre, el hígado y el cerebro, aumentando progresivamente su concentración a lo largo del estudio en estos dos últimos tejidos.

En resumen, nuestro estudio ha demostrado que la apigenina potásica posee diversos efectos saludables. Hemos estudiado su actividad frente a la inflamación aguda, al cáncer de próstata y a los daños causados por las radiaciones, tanto ionizantes como no ionizantes.

Para los estudios sobre inflamación, hemos utilizado un modelo de inflamación aguda inducida por la inyección de carragenato en la almohadilla plantar de ratones.

Hemos realizado distintos estudios *in vitro* sobre dos líneas celulares de próstata, una de ellas de cáncer (TRAMP-C1) y la otra de tejido no tumoral (PNT2). Hemos desarrollado ensayos de viabilidad, cuantificada mediante el test colorimétrico del MTT; de apoptosis, utilizando una técnica de microscopía de fluorescencia para evaluar la condensación o fragmentación nuclear; de ciclo celular, cuantificando el contenido de DNA con citometría de flujo; y de migración celular, mediante el test *wound healing assay*. También desarrollamos un modelo en ratones implantados con fragmentos de tumores obtenidos a partir de la línea TRAMP-C1, para evaluar el posible efecto del flavonoide sobre su supervivencia.

Analizamos el efecto de la apigenina potásica frente a los daños causados por la radiación ionizante (radiación  $\gamma$  y X) en linfocitos humanos (test de micronúcleos en linfocitos humanos bloqueados citoquinéticamente) y en las dos líneas celulares mencionadas (test colorimétrico del MTT). Por último, utilizando un modelo de fotoenvejecimiento inducido por radiación UV en ratones, evaluamos su potencial como agente fotoprotector, así como su distribución en distintos tejidos de esos animales.

Este flavonoide ha mostrado actividad antiinflamatoria, reduciendo la inflamación hasta un 78% con la mayor dosis ensayada (100 mg/kg). Asimismo, la apigenina potásica ha demostrado tener actividad quimiopreventiva frente al cáncer de próstata, al reducir la viabilidad y la migración e inducir apoptosis *in vitro*, y aumentar la supervivencia de animales con tumores tratados con la flavona. Además, la apigenina

potásica ha presentado efecto protector frente a la genotoxicidad provocada por la radiación ionizante (radiación  $\gamma$  y X), mostrando un factor de protección de entre un 27 y un 35 % en linfocitos humanos, y de un 50-86 % en dos líneas celulares de próstata. Por último, el flavonoide ha demostrado proteger frente al fotoenvejecimiento causado por la radiación UV, reduciendo la displasia epitelial y la elastosis dérmica, dos marcadores de cáncer cutáneo; además, ha sido posible detectar la apigenina en diversos tejidos.

## **CONCLUSIONES**

---



1. La apigenina potásica demostró propiedades antiinflamatorias en el modelo inducido por carragenato en la pata de ratón, reduciendo la inflamación hasta un 78% y manteniendo dicho efecto a tiempo prolongado.
2. La apigenina potásica presentó actividad quimiopreventiva frente al cáncer de próstata tanto *in vitro* como *in vivo*, inhibiendo la viabilidad celular, induciendo apoptosis, reduciendo la migración celular y aumentando la supervivencia de animales con tumores.
3. La apigenina potásica mostró efecto protector frente a las radiaciones:
  - a) ionizantes (radiación  $\gamma$  y X), con un factor de protección de entre un 27 y un 35 % en linfocitos humanos, y de un 50-86 % en dos líneas celulares de próstata.
  - b) frente al fotoenvejecimiento causado por radiación UV en ratones, reduciendo los fenómenos de displasia epitelial hasta un 34%, y de elastosis dérmica hasta un 28%. En estos animales se detectó, además, el flavonoide en concentraciones plasmáticas (0,13-0,38  $\mu$ M) y tisulares (0,25-1,64  $\mu$ M) cuantificables.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- Abu-Yousif, A. O., Smith, K. A., Getsios, S., Green, K. J., Van Dross, R. T., Pelling, J. C. Enhancement of UVB-induced apoptosis by apigenin in human keratinocytes and organotypic keratinocyte cultures. *Cancer Res.* 2008; 68(8): 3057-65.
- Adcock, I. M., Chung, K. F., Caramori, G., Ito, K. Kinase inhibitors and airway inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2006; 533(1-3): 118-32.
- Adlercreutz, C. H., Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Hockerstedt, K. A., Watanabe, S., Hamalainen, E. K., Markkanen, M. H., Makela, T. H., Wahala, K. T., Adlercreutz, T. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr.* 1995; 125(3 Suppl): 757S-70S.
- Afaq, F., Adhami, V. M., Mukhtar, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat Res.* 2005; 571(1-2): 153-73.
- Aherne, S. A., O'Brien, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition.* 2002; 18(1): 75-81.
- Albini, A., Benelli, R., Noonan, D. M., Brigati, C. The "chemoinvasion assay": a tool to study tumor and endothelial cell invasion of basement membranes. *Int J Dev Biol.* 2004; 48(5-6): 563-71.
- Alcaraz, M., Acevedo, C., Vicente, V., Castillo, J., Benavente-García, O., Fernández, H., Armero, D., Serna, A. Protective effects of carnosic acid against chromosomal damage induced in human lymphocytes by radiation gamma. *Radioprotección.* 2006; XIII(49): 23-25.
- Alcaraz, M., Acevedo, C., Castillo, J., Benavente-García, O., Armero, D., Vicente, V., Canteras, M. Liposoluble antioxidants provide an effective radioprotective barrier. *Br J Radiol.* 2009; 82(979): 605-09.

Alekel, D. L., Germain, A. S., Peterson, C. T., Hanson, K. B., Stewart, J. W., Toda, T. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72(3): 844-52.

Ali, A. S., Ali, S., El-Rayes, B. F., Philip, P. A., Sarkar, F. H. Exploitation of protein kinase C: a useful target for cancer therapy. *Cancer Treat Rev.* 2009; 35(1): 1-8.

Almássy, Z., Krepinsky, A., Bianco, A., Köteles, G. The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. *Int J Rad Appl Instrum A.* 1987; 38(4): 241-9.

Álvarez, N., Vicente, V., Martínez, C. Synergistic effect of diosmin and interferon-alpha on metastatic pulmonary melanoma. *Cancer Biother Radiopharm.* 2009; 24(3): 347-52.

Álvarez Sánchez, N., Martínez Conesa, C., Vicente Ortega, V. Efectos del IFN  $\alpha$  y la diosmina en el melanoma metastásico pulmonar murino. *Rev Esp Patol.* 2008; 41(2): 123-29.

Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H., Boyd, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 1988; 48(3): 589-601.

An, K. P., Athar, M., Tang, X., Katiyar, S. K., Russo, J., Beech, J., Aszterbaum, M., Kopelovich, L., Epstein, E. H., Jr., Mukhtar, H., Bickers, D. R. Cyclooxygenase-2 expression in murine and human nonmelanoma skin cancers: implications for therapeutic approaches. *Photochem Photobiol.* 2002; 76(1): 73-80.

- Ansó, E., Zuazo, A., Irigoyen, M., Urdaci, M. C., Rouzaut, A., Martínez-Irujo, J. J. Flavonoids inhibit hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression by a HIF-1 independent mechanism. *Biochem Pharmacol.* 2010; 79(11): 1600-09.
- Arai, Y., Watanabe, S., Kimira, M., Shimoi, K., Mochizuki, R., Kinae, N. Dietary Intakes of Flavonols, Flavones and Isoflavones by Japanese Women and the Inverse Correlation between Quercetin Intake and Plasma LDL Cholesterol Concentration. *J Nutr.* 2000; 130(9): 2243-50.
- Arts, I. C. W., Hollman, P. C. H., Bueno de Mesquita, H. B., Feskens, E. J. M., Kromhout, D. Dietary catechins and epithelial cancer incidence: the Zutphen elderly study. *Int J Cancer.* 2001; 92(2): 298-302.
- Assinder, S. J., Dong, Q., Kovacevic, Z., Richardson, D. R. The TGF-beta, PI3K/Akt and PTEN pathways: established and proposed biochemical integration in prostate cancer. *Biochem J.* 2009; 417(2): 411-21.
- Athar, M., An, K. P., Morel, K. D., Kim, A. L., Aszterbaum, M., Longley, J., Epstein, E. H., Jr., Bickers, D. R. Ultraviolet B(UVB)-induced COX-2 expression in murine skin: an immunohistochemical study. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280(4): 1042-7.
- Aziz, M. H., Manoharan, H. T., Verma, A. K. Protein kinase C epsilon, which sensitizes skin to sun's UV radiation-induced cutaneous damage and development of squamous cell carcinomas, associates with Stat3. *Cancer Res.* 2007; 67(3): 1385-94.

- Baade, P. D., Youlden, D. R., Krnjacki, L. J. International epidemiology of prostate cancer: geographical distribution and secular trends. *Mol Nutr Food Res*. 2009; 53(2): 171-84.
- Bachelor, M. A., Bowden, G. T. UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. *Semin Cancer Biol*. 2004; 14(2): 131-8.
- Bachelor, M. A., Cooper, S. J., Sikorski, E. T., Bowden, G. T. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase decreases UVB-induced activator protein-1 and cyclooxygenase-2 in a SKH-1 hairless mouse model. *Mol Cancer Res*. 2005; 3(2): 90-9.
- Bakkenist, C. J., Kastan, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 2003; 421(6922): 499-506.
- Balk, S., Knudsen, K. AR, the cell cycle, and prostate cancer. *Nucl Recept Signal*. 2008; 6: e001.
- Beecher, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr*. 2003; 133(10): 3248S-54S.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Marín, F. R., Ortuño, A., Del Río, J. A. Uses and properties of citrus flavonoids. *J Agric Food Chem*. 1997; 45(12): 4505-15.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Alcaraz, M. Radioprotective effects in vivo of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves against X-ray-induced chromosomal damage: comparative study

versus several flavonoids and sulfur-containing compounds. *J Med Food*. 2002; 5(3): 125-35.

Benavente-García, O., Castillo, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem*. 2008; 56(15): 6185-205.

Benkovic, V., Kopjar, N., Horvat Knezevic, A., Dikic, D., Basic, I., Ramic, S., Viculin, T., Knezevic, F., Orolic, N. Evaluation of radioprotective effects of propolis and quercetin on human white blood cells in vitro. *Biol Pharm Bull*. 2008a; 31(9): 1778-85.

Benkovic, V., Orsolich, N., Knezevic, A. H., Ramic, S., Dikic, D., Basic, I., Kopjar, N. Evaluation of the radioprotective effects of propolis and flavonoids in gamma-irradiated mice: the alkaline comet assay study. *Biol Pharm Bull*. 2008b; 31(1): 167-72.

Benkovic, V., Knezevic, A. H., Dikic, D., Lisicic, D., Orsolich, N., Basic, I., Kosalec, I., Kopjar, N. Radioprotective effects of propolis and quercetin in gamma-irradiated mice evaluated by the alkaline comet assay. *Phytomedicine*. 2008c; 15(10): 851-8.

Benkovic, V., Knezevic, A. H., Orsolich, N., Basic, I., Ramic, S., Viculin, T., Knezevic, F., Kopjar, N. Evaluation of radioprotective effects of propolis and its flavonoid constituents: in vitro study on human white blood cells. *Phytother Res*. 2009a; 23(8): 1159-68.

Benkovic, V., Knezevic, A. H., Dikic, D., Lisicic, D., Orsolich, N., Basic, I., Kopjar, N. Radioprotective effects of quercetin and ethanolic extract of propolis in gamma-irradiated mice. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2009b; 60(2): 129-38.

- Bergquist, S. A., Gertsson, U. E., Knuthsen, P., Olsson, M. E. Flavonoids in baby spinach (*Spinacia oleracea* L.): changes during plant growth and storage. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(24): 9459-64.
- Berkow, S. E., Barnard, N. D., Saxe, G. A., Ankerberg-Nobis, T. Diet and survival after prostate cancer diagnosis. *Nutr Rev.* 2007; 65(9): 391-403.
- Bernhard, D., Schwaiger, W., Crazzolaro, R., Tinhofer, I., Kofler, R., Csordas, A. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. *Cancer Lett.* 2003; 195(2): 193-9.
- Berthon, P., Cussenot, O., Hopwood, L., Leduc, A., Maitland, N. J. Functional expression of SV40 in normal human prostatic epithelial and fibroblastic cells: differentiation pattern of nontumorigenic cell-lines. *Int J Oncol.* 1995; 6(2): 333-43.
- Bertilaccio, M., Grioni, M., Sutherland, B., Degl'Innocenti, E., Freschi, M., Jachetti, E., Greenberg, N., Corti, A., Bellone, M. Vasculature-targeted tumor necrosis factor-alpha increases the therapeutic index of doxorubicin against prostate cancer. *Prostate.* 2008; 68(10): 1105-15.
- Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K., Pommier, Y. Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp Cell Res.* 1994; 211(2): 314-21.
- Berwick, M., Armstrong, B. K., Ben-Porat, L., Fine, J., Kricker, A., Eberle, C., Barnhill, R. Sun exposure and mortality from melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97(3): 195-9.

- Birt, D. F., Mitchell, D., Gold, B., Pour, P., Pinch, H. C. Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. *Anticancer Res.* 1997; 17(1A): 85-91.
- Bito, T., Roy, S., Sen, C. K., Shirakawa, T., Gotoh, A., Ueda, M., Ichihashi, M., Packer, L. Flavonoids differentially regulate IFN $\gamma$ -induced ICAM-1 expression in human keratinocytes: molecular mechanisms of action. *FEBS Lett.* 2002; 520(1-3): 145-52.
- Bogo, V., Jacobs, A., Weiss, J. Behavioral toxicity and efficacy of WR-2721 as a radioprotectant. *Radiat Res.* 1985; 104(2): 182-90.
- Bossi, O., Gartsbein, M., Leitges, M., Kuroki, T., Grossman, S., Tennenbaum, T. UV irradiation increases ROS production via PKC $\delta$  signaling in primary murine fibroblasts. *J Cell Biochem.* 2008; 105(1): 194-207.
- Brekhman, V., Neufeld, G. A novel asymmetric 3D in-vitro assay for the study of tumor cell invasion. *BMC Cancer.* 2009; 9(1): 415.
- Browning, A. M., Walle, U. K., Walle, T. Flavonoid glycosides inhibit oral cancer cell proliferation--role of cellular uptake and hydrolysis to the aglycones. *J Pharm Pharmacol.* 2005; 57(8): 1037-42.
- Brzoska, K., Szumiel, I. Signalling loops and linear pathways: NF-kappaB activation in response to genotoxic stress. *Mutagenesis.* 2009; 24(1): 1-8.
- Butler, G. J., Neale, R., Green, A. C., Pandeya, N., Whiteman, D. C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of actinic keratoses and squamous cell cancers of the skin. *J Am Acad Dermatol.* 2005; 53(6): 966-72.

Cai, H., Boocock, D. J., Steward, W. P., Gescher, A. J. Tissue distribution in mice and metabolism in murine and human liver of apigenin and tricetin, flavones with putative cancer chemopreventive properties. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007; 60(2): 257-66.

Cals-Grierson, M. M., Ormerod, A. D. Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide.* 2004; 10(4): 179-93.

Cao, J., Zhang, Y., Chen, W., Zhao, X. The relationship between fasting plasma concentrations of selected flavonoids and their ordinary dietary intake. *Br J Nutr.* 2010; 103(2): 249-55.

Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 1987a; 47(4): 936-42.

Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res.* 1987b; 47(4): 943-46.

Castillo, J., Benavente-García, O., Lorente, J., Alcaraz, M., Redondo, A., Ortuño, A., Del Río, J. A. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J Agric Food Chem.* 2000; 48(5): 1738-45.

Castillo, J., Benavente-García, O., Del Baño, M. J., Lorente, J., Alcaraz, M., Dato, M. J. Radioprotective Effects Against Chromosomal Damage Induced in Human Lymphocytes by gamma-Rays as a

Function of Polymerization Grade of Grape Seed Extracts. *J Med Food*. 2001; 4(2): 117-23.

Castillo, J., Alcaraz, M., Benavente-García, O. (2010). Antioxidant and radioprotective effects of olive leaf extract. Olives and olive oil in health and disease prevention. V. R. Preedy, R. R. Watson. Oxford, Academic Press: 951-58.

Catalgol, B., Ziaja, I., Breusing, N., Jung, T., Hohn, A., Alpertunga, B., Schroeder, P., Chondrogianni, N., Gonos, E. S., Petropoulos, I., Friguet, B., Klotz, L. O., Krutmann, J., Grune, T. The proteasome is an integral part of solar ultraviolet a radiation-induced gene expression. *J Biol Chem*. 2009; 284(44): 30076-86.

Ciavarra, R., Brown, R., Holterman, D., Garrett, M., Glass, W., Wright, G., Schellhammer, P., Somers, K. Impact of the tumor microenvironment on host infiltrating cells and the efficacy of flt3-ligand combination immunotherapy evaluated in a treatment model of mouse prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2003; 52(9): 535-45.

Colville-Nash, P., Gilroy, D., Willis, D., Paul-Clark, M., Moore, A., Willoughby, D. Prostaglandin F<sub>2</sub> produced by inducible cyclooxygenase may contribute to the resolution of inflammation. *Inflammopharmacology*. 2005; 12(5): 473-76.

Comalada, M., Ballester, I., Bailón, E., Sierra, S., Xaus, J., Gálvez, J., Medina, F. S., Zarzuelo, A. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure–activity relationship. *Biochem Pharmacol*. 2006; 72(8): 1010-21.

- Commenges, D., Scotet, V., Renaud, S., Jacqmin-Gadda, H., Barberger-Gateau, P., Dartigues, J. F. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur J Epidemiol.* 2000; 16(4): 357-63.
- Corcoran, N. M., Costello, A. J., Hovens, C. M. Interfering with cell-survival signalling as a treatment strategy for prostate cancer. *BJU Int.* 2006; 97(6): 1149-53.
- Crawford, E. Understanding the epidemiology, natural history, and key pathways involved in prostate cancer. *Urology.* 2009; 73(5 Suppl): S4-10.
- Crespo, I., García-Mediavilla, M. V., Almar, M., Gonzalez, P., Tunon, M. J., Sánchez-Campos, S., González-Gallego, J. Differential effects of dietary flavonoids on reactive oxygen and nitrogen species generation and changes in antioxidant enzyme expression induced by proinflammatory cytokines in Chang Liver cells. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46(5): 1555-69.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* 2009; 26(8): 1001-43.
- Czernik, M., Sroka, J., Madeja, Z., Czyz, J. Apigenin inhibits growth and motility but increases gap junctional coupling intensity in rat prostate carcinoma (MAT-LyLu) cell populations. *Cell Mol Biol Lett.* 2008; 13(3): 327-38.
- Czyz, J., Madeja, Z., Irmer, U., Korohoda, W., Hulser, D. F. Flavonoid apigenin inhibits motility and invasiveness of carcinoma cells in vitro. *Int J Cancer.* 2005; 114(1): 12-18.

- Chen, J., Lin, H., Hu, M. Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 304(3): 1228-35.
- Chen, C. C., Chow, M. P., Huang, W. C., Lin, Y. C., Chang, Y. J. Flavonoids inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor-kappaB: structure-activity relationships. *Mol Pharmacol.* 2004; 66(3): 683-93.
- Chen, J., Wang, S., Jia, X., Bajimaya, S., Lin, H., Tam, V. H., Hu, M. Disposition of flavonoids via recycling: comparison of intestinal versus hepatic disposition. *Drug Metab Dispos.* 2005; 33(12): 1777-84.
- Chen, D., Landis-Piwowar, K. R., Chen, M. S., Dou, Q. P. Inhibition of proteasome activity by the dietary flavonoid apigenin is associated with growth inhibition in cultured breast cancer cells and xenografts. *Breast Cancer Res.* 2007a; 9(6): R80.
- Chen, W., Khurana Hershey, G. K. Signal transducer and activator of transcription signals in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2007b; 119(3): 529-41.
- Chen, D., Dou, Q. P. Tea polyphenols and their roles in cancer prevention and chemotherapy. *Int J Mol Sci.* 2008; 9(7): 1196-206.
- Chen, F., Chiang, C., Wang, C., Tsai, C., Jung, S., Lee, C., McBride, W., Hong, J. Radiotherapy Decreases Vascular Density and Causes Hypoxia with Macrophage Aggregation in TRAMP-C1 Prostate Tumors. *Clinical Cancer Res.* 2009; 15(5): 1721.

- Choi, J. R., Lee, C. M., Jung, I. D., Lee, J. S., Jeong, Y. I., Chang, J. H., Park, H., Choi, I. W., Kim, J. S., Shin, Y. K. Apigenin protects ovalbumin-induced asthma through the regulation of GATA-3 gene. *Int Immunopharmacol.* 2009a; 9(7-8): 918-24.
- Choi, E. J., Kim, G. H. Apigenin Induces Apoptosis through a Mitochondria/Caspase-Pathway in Human Breast Cancer MDA-MB-453 Cells. *J Clin Biochem Nutr.* 2009b; 44(3): 260-65.
- Choi, E. J., Kim, G. H. Apigenin causes G(2)/M arrest associated with the modulation of p21(Cip1) and Cdc2 and activates p53-dependent apoptosis pathway in human breast cancer SK-BR-3 cells. *J Nutr Biochem.* 2009c; 20(4): 285-90.
- Chuang, T. Y., Brashear, R. Risk factors of non-melanoma skin cancer in United States veterans patients: a pilot study and review of literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 1999; 12(2): 126-32.
- Chun, O. K., Kim, D. O., Smith, N., Schroeder, D., Han, J. T., Lee, C. Y. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *J Sci Food Agric.* 2005; 85(10): 1715-24.
- Chun, O. K., Chung, S. J., Song, W. O. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of US adults. *J Nutr.* 2007; 137(5): 1244.
- D'Urso, V., Collodoro, A., Mattioli, E., Giordano, A., Bagella, L. Cytometry and DNA ploidy: clinical uses and molecular perspective in gastric and lung cancer. *J Cell Physiol.* 2010; 222(3): 532-9.
- Dai, G., Freudenberger, T., Zipper, P., Melchior, A., Grether-Beck, S., Rabausch, B., de Groot, J., Twarock, S., Hanenberg, H., Homey, B.,

- Krutmann, J., Reifemberger, J., Fischer, J. W. Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases. *Am J Pathol.* 2007; 171(5): 1451-61.
- Darzynkiewicz, Z., Crissman, H., Jacobberger, J. W. Cytometry of the cell cycle: cycling through history. *Cytometry A.* 2004; 58(1): 21-32.
- Das, A., Banik, N. L., Ray, S. K. Flavonoids Activated Caspases for Apoptosis in Human Glioblastoma T98G and U87MG Cells But Not in Human Normal Astrocytes. *Cancer.* 2010; 116(1): 164-76.
- de Gruijl, F. R., Rebel, H. Early events in UV carcinogenesis--DNA damage, target cells and mutant p53 foci. *Photochem Photobiol.* 2008; 84(2): 382-7.
- Del Baño, M., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., del Río, J., Ortuño, A., Quirin, K., Gerard, D. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2003; 51(15): 4247-53.
- Del Baño, M., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., Marín, M., Del Río, J., Ortuño, A., Ibarra, I. Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. postulation of a biosynthetic pathway. *J Agric Food Chem.* 2004; 52(16): 4987-92.
- Del Baño, M. J., Castillo, J., Benavente-García, O., Lorente, J., Martín-Gil, R., Acevedo, C., Alcaraz, M. Radioprotective-antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal damage induced in

- human lymphocytes by gamma-rays. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(6): 2064-68.
- Del Río, J. A., Gómez, P., Baidez, A. G., Arcas, M. C., Botia, J. M., Ortuno, A. Changes in the levels of polymethoxyflavones and flavanones as part of the defense mechanism of *Citrus sinensis* (cv. Valencia Late) fruits against *Phytophthora citrophthora*. *J Agric Food Chem.* 2004; 52(7): 1913-17.
- Demou, Z. N., McIntire, L. V. Fully automated three-dimensional tracking of cancer cells in collagen gels: determination of motility phenotypes at the cellular level. *Cancer Res.* 2002; 62(18): 5301-7.
- Devi, P. U., Ganasoundari, A. Modulation of glutathione and antioxidant enzymes by *Ocimum sanctum* and its role in protection against radiation injury. *Indian J Exp Biol.* 1999; 37(3): 262-8.
- Dinkova-Kostova, A. T. Phytochemicals as protectors against ultraviolet radiation: versatility of effects and mechanisms. *Planta Med.* 2008; 74(13): 1548-59.
- Ditre, C. M., Griffin, T. D., Murphy, G. F., Sueki, H., Telegan, B., Johnson, W. C., Yu, R. J., Van Scott, E. J. Effects of alpha-hydroxy acids on photoaged skin: a pilot clinical, histologic, and ultrastructural study. *J Am Acad Dermatol.* 1996; 34(2 Pt 1): 187-95.
- Dodeller, F., Schulze-Koops, H. The p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in CD4 T cells. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8(2): 205.
- Duarte-Almeida, J. M., Novoa, A. V., Fallarero Linares, A., Lajolo, F. M., Genovese, M. I. Antioxidant activity of phenolics compounds from

sugar cane(*Saccharum officinarum* L.) juice. *Plant Foods Hum Nutr.* 2006; 61(4): 187-92.

El-Domyati, M., Attia, S., Saleh, F., Brown, D., Birk, D. E., Gasparro, F., Ahmad, H., Uitto, J. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol.* 2002; 11(5): 398-405.

Fang, J., Zhou, Q., Liu, L. Z., Xia, C., Hu, X., Shi, X., Jiang, B. H. Apigenin inhibits tumor angiogenesis through decreasing HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression. *Carcinogenesis.* 2007; 28(4): 858-64.

Fenech, M., Morley, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res.* 1985; 147(1-2): 29-36.

Fenech, M., Morley, A. A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat Res.* 1986; 161(2): 193-8.

Fenech, M. F., Dunaiski, V., Osborne, Y., Morley, A. A. The cytokinesis-block micronucleus assay as a biological dosimeter in spleen and peripheral blood lymphocytes of the mouse following acute whole-body irradiation. *Mutat Res.* 1991; 263(2): 119-26.

Fenech, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res.* 1993; 285(1): 35-44.

Fenech, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res.* 1997; 392(1-2): 11-8.

Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 2003; 534(1-2): 65-75.

Fenech, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2007; 2(5): 1084-104.

Filip, A., Clichici, S., Daicoviciu, D., Adriana, M., Postescu, I., Perdeschrepler, M., Olteanu, D. Photochemoprevention of cutaneous neoplasia through natural products. *Exp Oncol.* 2009; 31(1): 9-15.

Fischer, S. M., Pavone, A., Mikulec, C., Langenbach, R., Rundhaug, J. E. Cyclooxygenase-2 expression is critical for chronic UV-induced murine skin carcinogenesis. *Mol Carcinog.* 2007; 46(5): 363-71.

Foster, B., Gingrich, J., Kwon, E., Madias, C., Greenberg, N. Characterization of prostatic epithelial cell lines derived from transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model. *Cancer Res.* 1997; 57(16): 3325-30.

Franzen, C. A., Amargo, E., Todorovic, V., Desai, B. V., Huda, S., Mirzoeva, S., Chiu, K., Grzybowski, B. A., Chew, T. L., Green, K. J., Pelling, J. C. The chemopreventive bioflavonoid apigenin inhibits prostate cancer cell motility through the focal adhesion kinase/Src signaling mechanism. *Cancer Prev Res (Phila Pa).* 2009; 2(9): 830-41.

Funaguchi, N., Ohno, Y., La, B. L., Asai, T., Yuhgetsu, H., Sawada, M., Takemura, G., Minatoguchi, S., Fujiwara, T., Fujiwara, H. Narirutin inhibits airway inflammation in an allergic mouse model. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007; 34(8): 766-70.

- Gambichler, T., Skrygan, M., Tomi, N. S., Breuksch, S., Altmeyer, P., Kreuter, A. Significant downregulation of transforming growth factor-beta signal transducers in human skin following ultraviolet-A1 irradiation. *Br J Dermatol.* 2007; 156(5): 951-6.
- García-Closas, R., González, C. A., Agudo, A., Riboli, E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control* 1999; 10(1): 71-75.
- García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M., Martínez, J. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm Res.* 2009; 58(9): 537-52.
- Garg, A. K., Buchholz, T. A., Aggarwal, B. B. Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols. *Antioxid Redox Signal.* 2005; 7(11-12): 1630-47.
- Gates, M. A., Tworoger, S. S., Hecht, J. L., De Vivo, I., Rosner, B., Hankinson, S. E. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer.* 2007; 121(10): 2225-32.
- Gates, M. A., Vitonis, A. F., Tworoger, S. S., Rosner, B., Titus-Ernstoff, L., Hankinson, S. E., Cramer, D. W. Flavonoid intake and ovarian cancer risk in a population-based case-control study. *Int J Cancer.* 2009; 124(8): 1918-25.
- Gerritsen, M. E., Carley, W. W., Ranges, G. E., Shen, C. P., Phan, S. A., Ligon, G. F., Perry, C. A. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am J Pathol.* 1995; 147(2): 278-92.

- Ghosh, R., Garcia, G., Crosby, K., Inoue, H., Thompson, I., Troyer, D., Kumar, A. Regulation of Cox-2 by cyclic AMP response element binding protein in prostate cancer: potential role for nexrutine. *Neoplasia*. 2007; 9(11): 893-9.
- Gingrich, J., Barrios, R., Morton, R., Boyce, B., DeMayo, F., Finegold, M., Angelopoulou, R., Rosen, J., Greenberg, N. Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. *Cancer Res*. 1996; 56(18): 4096-102.
- Gingrich, J., Barrios, R., Kattan, M., Nahm, H., Finegold, M., Greenberg, N. Androgen-independent prostate cancer progression in the TRAMP model. *Cancer Res*. 1997; 57(21): 4687-91.
- Giunta, B., Obregon, D., Hou, H., Zeng, J., Sun, N., Nikolic, V., Ehrhart, J., Shytle, D., Fernandez, F., Tan, J. EGCG mitigates neurotoxicity mediated by HIV-1 proteins gp120 and Tat in the presence of IFN-gamma: role of JAK/STAT1 signaling and implications for HIV-associated dementia. *Brain Res*. 2006; 1123(1): 216-25.
- Gómez García, F. J., Vicente Ortega, V., Álvarez Sánchez, N., Yáñez Gascón, M. J., Alcaraz Baños, M., Ortiz Ortiz, L. Modelo experimental de fotoenvejecimiento cutáneo por radiación ultravioleta A. *Rev Esp Patol*. 2007; 40(2): 103-08.
- Gómez García, F. J. Efecto del etanol y los compuestos polifenólicos apigenina y ácido carnósico sobre la carcinogénesis oral por DMBA en hámster. 2009, Universidad de Murcia.
- González, S., Fernández-Lorente, M., Gilaberte-Calzada, Y. The latest on skin photoprotection. *Clin Dermatol*. 2008; 26(6): 614-26.

- Gradolatto, A., Basly, J. P., Berges, R., Teyssier, C., Chagnon, M. C., Siess, M. H., Canivenc-Lavier, M. C. Pharmacokinetics and metabolism of apigenin in female and male rats after a single oral administration. *Drug Metab Dispos.* 2005; 33(1): 49-54.
- Grassi, D., Desideri, G., Croce, G., Tiberti, S., Aggio, A., Ferri, C. Flavonoids, vascular function and cardiovascular protection. *Curr Pharm Des.* 2009; 15(10): 1072-84.
- Greenberg, N., DeMayo, F., Sheppard, P., Barrios, R., Lebovitz, R., Finegold, M., Angelopoulou, R., Dodd, J., Duckworth, M., Rosen, J. The rat probasin gene promoter directs hormonally and developmentally regulated expression of a heterologous gene specifically to the prostate in transgenic mice. *Mol Endocrinol.* 1994; 8(2): 230-9.
- Greenberg, N., DeMayo, F., Finegold, M., Medina, D., Tilley, W., Aspinall, J., Cunha, G., Donjacour, A., Matusik, R., Rosen, J. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(8): 3439-43.
- Greenrod, W., Fenech, M. The principal phenolic and alcoholic components of wine protect human lymphocytes against hydrogen peroxide- and ionizing radiation-induced DNA damage in vitro. *Mutagenesis.* 2003; 18(2): 119-26.
- Griffiths, L. A., Smith, G. E. Metabolism of apigenin and related compounds in the rat. Metabolite formation in vivo and by the intestinal microflora in vitro. *Biochem J.* 1972; 128(4): 901-11.
- Guerrero, J. A., Lozano, M. L., Castillo, J., Benavente-García, O., Vicente, V., Rivera, J. Flavonoids inhibit platelet function through binding to

- the thromboxane A2 receptor. *J Thromb Haemost.* 2005; 3(2): 369-76.
- Gupta, S., Afaq, F., Mukhtar, H. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 287(4): 914-20.
- Gupta, S., Afaq, F., Mukhtar, H. Involvement of nuclear factor-kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells. *Oncogene.* 2002; 21(23): 3727-38.
- Ha, S. K., Lee, P., Park, J. A., Oh, H. R., Lee, S. Y., Park, J. H., Lee, E. H., Ryu, J. H., Lee, K. R., Kim, S. Y. Apigenin inhibits the production of NO and PGE2 in microglia and inhibits neuronal cell death in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia mice model. *Neurochem Int.* 2008; 52(4-5): 878-86.
- Hansson, J., Lewensohn, R., Ringborg, U., Nilsson, B. Formation and removal of DNA cross-links induced by melphalan and nitrogen mustard in relation to drug-induced cytotoxicity in human melanoma cells. *Cancer Res.* 1987; 47(10): 2631-7.
- Hara, T., Miyazaki, H., Lee, A., Tran, C., Reiter, R. Androgen receptor and invasion in prostate cancer. *Cancer Res.* 2008; 68(4): 1128-35.
- Harnly, J., Doherty, R., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Bhagwat, S., Gebhardt, S. Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(26): 9966-77.

- Harris, R. E., Beebe-Donk, J., Alshafie, G. A. Cancer chemoprevention by cyclooxygenase 2 (COX-2) blockade: results of case control studies. *Subcell Biochem* 2007a; 42: 193-212.
- Harris, R. E. Cyclooxygenase-2 (cox-2) and the inflammogenesis of cancer. *Subcell Biochem* 2007b; 42: 93-126.
- Haverkamp, J., Charbonneau, B., Ratliff, T. L. Prostate inflammation and its potential impact on prostate cancer: a current review. *J Cell Biochem.* 2008; 103(5): 1344-53.
- Havsteen, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002; 96(2-3): 67-202.
- Heijnen, C., Haenen, G., van Acker, F., van der Vijgh, W., Bast, A. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol In Vitro.* 2001; 15(1): 3-6.
- Heijnen, C. G., Haenen, G. R., Oostveen, R. M., Stalpers, E. M., Bast, A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Radic Res.* 2002; 36(5): 575-81.
- Heinrich, U., Neukam, K., Tronnier, H., Sies, H., Stahl, W. Long-term ingestion of high flavanol cocoa provides photoprotection against UV-induced erythema and improves skin condition in women. *J Nutr.* 2006; 136(6): 1565-9.
- Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C. H., Katan, M. B., Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 1993; 342(8878): 1007-11.

- Hertog, M. G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med.* 1995; 155(4): 381-86.
- Hillman, G. G., Forman, J. D., Kucuk, O., Yudelev, M., Maughan, R. L., Rubio, J., Layer, A., Tekyi-Mensah, S., Abrams, J., Sarkar, F. H. Genistein potentiates the radiation effect on prostate carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(2): 382-90.
- Hirano, T., Higa, S., Arimitsu, J., Naka, T., Ogata, A., Shima, Y., Fujimoto, M., Yamadori, T., Ohkawara, T., Kuwabara, Y., Kawai, M., Matsuda, H., Yoshikawa, M., Maezaki, N., Tanaka, T., Kawase, I. Luteolin, a flavonoid, inhibits AP-1 activation by basophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 340(1): 1-7.
- Hirvonen, T., Pietinen, P., Virtanen, M., Ovaskainen, M. L., Hakkinen, S., Albanes, D., Virtamo, J. Intake of flavonols and flavones and risk of coronary heart disease in male smokers. *Epidemiology.* 2001; 12(1): 62-67.
- Hoensch, H., Groh, B., Edler, L., Kirch, W. Prospective cohort comparison of flavonoid treatment in patients with resected colorectal cancer to prevent recurrence. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(14): 2187-93.
- Holt, E. M., Steffen, L. M., Moran, A., Basu, S., Steinberger, J., Ross, J. A., Hong, C. P., Sinaiko, A. R. Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents. *J Am Diet Assoc.* 2009; 109(3): 414-21.

- Hosseinimehr, S. J., Tavakoli, H., Pourheidari, G., Sobhani, A., Shafiee, A. Radioprotective effects of citrus extract against gamma-irradiation in mouse bone marrow cells. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2003; 44(3): 237-41.
- Hosseinimehr, S. J., Nemati, A. Radioprotective effects of hesperidin against gamma irradiation in mouse bone marrow cells. *Br J Radiol*. 2006; 79(941): 415-8.
- Hosseinimehr, S. J., Azadbakht, M., Mousavi, S. M., Mahmoudzadeh, A., Akhlaghpour, S. Radioprotective effects of hawthorn fruit extract against gamma irradiation in mouse bone marrow cells. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2007; 48(1): 63-8.
- Hougee, S., Sanders, A., Faber, J., Graus, Y. M., van den Berg, W. B., Garsen, J., Smit, H. F., Hoijer, M. A. Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages. *Biochem Pharmacol*. 2005; 69(2): 241-48.
- Hu, M., Chen, J., Lin, H. Metabolism of flavonoids via enteric recycling: mechanistic studies of disposition of apigenin in the Caco-2 cell culture model. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 307(1): 314-21.
- Hu, X. W., Meng, D., Fang, J. Apigenin inhibited migration and invasion of human ovarian cancer A2780 cells through focal adhesion kinase. *Carcinogenesis*. 2008; 29(12): 2369-76.
- Hu, X., Li, J., Vandervalk, S., Wang, Z., Magnuson, N., Xing, P. PIM-1-specific mAb suppresses human and mouse tumor growth by

- decreasing PIM-1 levels, reducing Akt phosphorylation, and activating apoptosis. *J Clin Invest.* 2009; 119(2): 362.
- Huang, X., Halicka, H. D., Traganos, F., Tanaka, T., Kurose, A., Darzynkiewicz, Z. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell Prolif.* 2005; 38(4): 223-43.
- Huang, S. M., Wu, C. H., Yen, G. C. Effects of flavonoids on the expression of the pro-inflammatory response in human monocytes induced by ligation of the receptor for AGEs. *Mol Nutr Food Res.* 2006; 50(12): 1129-39.
- Huang, J., Huang, C., Fang, J., Yang, C., Chan, C., Wu, N., Kang, S., Hung, C. Protective effects of myricetin against ultraviolet-B-induced damage in human keratinocytes. *Toxicol In Vitro.* 2009; 24(1): 21-28.
- Huang, C. H., Kuo, P. L., Hsu, Y. L., Chang, T. T., Tseng, H. I., Chu, Y. T., Kuo, C. H., Chen, H. N., Hung, C. H. The Natural Flavonoid Apigenin Suppresses Th1- and Th2-Related Chemokine Production by Human Monocyte THP-1 Cells Through Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *J Med Food.* 2010; 13(2): 391-98.
- Huerta, S., Goulet, E., Huerta-Yepez, S., Livingston, E. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res.* 2007; 139(1): 143-56.
- IAEA, I. A. E. A.-. Ed. (2001). *Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A manual.* Technical Report Series, n° 405. Viena, International Atomic Energy Agency (IAEA).

- Imokawa, G. Mechanism of UVB-induced wrinkling of the skin: paracrine cytokine linkage between keratinocytes and fibroblasts leading to the stimulation of elastase. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2009; 14(1): 36-43.
- Jans, J., Schul, W., Sert, Y. G., Rijksen, Y., Rebel, H., Eker, A. P., Nakajima, S., van Steeg, H., de Gruijl, F. R., Yasui, A., Hoeijmakers, J. H., van der Horst, G. T. Powerful skin cancer protection by a CPD-photolyase transgene. *Curr Biol.* 2005; 15(2): 105-15.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., Thun, M. J. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008; 58(2): 71-96.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, M. J. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009; 59(4): 225-49.
- Jeyabal, P. V., Syed, M. B., Venkataraman, M., Sambandham, J. K., Sakthisekaran, D. Apigenin inhibits oxidative stress-induced macromolecular damage in N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatocellular carcinogenesis in Wistar albino rats. *Mol Carcinog.* 2005; 44(1): 11-20.
- Johannot, L., Somerset, S. M. Age-related variations in flavonoid intake and sources in the Australian population. *Public Health Nutr.* 2006; 9(08): 1045-54.
- Jung, H., Jung, M., Kim, J., Chung, H., Choi, J. Inhibitory activity of flavonoids from *Prunus davidiana* and other flavonoids on total ROS and hydroxyl radical generation. *Arch Pharm Res.* 2003; 26(10): 809-15.

Jung, S. K., Lee, K. W., Byun, S., Lee, E. J., Kim, J. E., Bode, A. M., Dong, Z., Lee, H. J. Myricetin inhibits UVB-induced angiogenesis by regulating PI-3 kinase in vivo. *Carcinogenesis*. 2009; doi:10.1093/carcin/bgp221.

Justesen, U., Knuthsen, P. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chem*. 2001; 73(2): 245-50.

Kam, Y., Guess, C., Estrada, L., Weidow, B., Quaranta, V. A novel circular invasion assay mimics in vivo invasive behavior of cancer cell lines and distinguishes single-cell motility in vitro. *BMC Cancer*. 2008; 8: 198.

Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., Karin, M. Reactive oxygen species promote TNF $\alpha$ -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*. 2005; 120(5): 649-61.

Kanashiro, A., Souza, J., Kabeya, L., Azzolini, A., Lucisano-Valim, Y. Elastase release by stimulated neutrophils inhibited by flavonoids: importance of the catechol group. *Z Naturforsch C*. 2007; 62(5-6): 357-61.

Karnovsky, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol*. 1965; 27: 137.

Kaur, P., Shukla, S., Gupta, S. Plant flavonoid apigenin inactivates Akt to trigger apoptosis in human prostate cancer: an in vitro and in vivo study. *Carcinogenesis*. 2008; 29(11): 2210-17.

- Kawai, M., Hirano, T., Higa, S., Arimitsu, J., Maruta, M., Kuwahara, Y., Ohkawara, T., Hagihara, K., Yamadori, T., Shima, Y. Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances. *Allergol Int.* 2007; 56: 113-23.
- Khan, T. H., Jahangir, T., Prasad, L., Sultana, S. Inhibitory effect of apigenin on benzo (a) pyrene-mediated genotoxicity in Swiss albino mice. *J Pharm Pharmacol.* 2006; 58(12): 1655-60.
- Kiechle, F., Zhang, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta.* 2002; 326(1-2): 27-45.
- Kim, M. Flavonoids inhibit VEGF/bFGF-induced angiogenesis in vitro by inhibiting the matrix-degrading proteases. *J Cell Biochem.* 2003; 89(3): 529-38.
- Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci.* 2004a; 96(3): 229-45.
- Kim, J. H., Cho, Y. H., Park, S. M., Lee, K. E., Lee, J. J., Lee, B. C., Pyo, H. B., Song, K. S., Park, H. D., Yun, Y. P. Antioxidants and inhibitor of matrix metalloproteinase-1 expression from leaves of *Zostera marina* L. *Arch Pharm Res.* 2004b; 27(2): 177-83.
- Kim, K. Y., Lee, J. H., Park, J. H., Yoo, M. A., Kwak, Y. G., Kim, S. O., Yoo, S. E., Hong, K. W. Anti-apoptotic action of (2S,3S,4R)-N"-cyano-N-(6-amino-3,4-dihydro-3-hydroxy-2-methyl-2-dimethoxyethyl-2H-benzopyran-4-yl)-N'-benzylguanidine (KR-31378) by suppression of the phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 phosphorylation and increased phosphorylation of casein kinase2/Akt/ cyclic AMP response element binding protein via maxi-

- K channel opening in neuronal cells. *Eur J Pharmac.* 2004c; 497(3): 267-77.
- Kim, B. Y., Kim, K. A., Kwon, O., Kim, S. O., Kim, M. S., Kim, B. S., Oh, W. K., Kim, G. D., Jung, M., Ahn, J. S. NF-kappaB inhibition radiosensitizes Ki-Ras-transformed cells to ionizing radiation. *Carcinogenesis.* 2005a; 26(8): 1395-403.
- Kim, A. L., Labasi, J. M., Zhu, Y., Tang, X., McClure, K., Gabel, C. A., Athar, M., Bickers, D. R. Role of p38 MAPK in UVB-induced inflammatory responses in the skin of SKH-1 hairless mice. *J Invest Dermatol.* 2005b; 124(6): 1318-25.
- Kim, J. S., Kim, J. C., Shim, S. H., Lee, E. J., Jin, W., Bae, K., Son, K. H., Kim, H. P., Kang, S. S., Chang, H. W. Chemical constituents of the root of *Dystaenia takeshimana* and their anti-inflammatory activity. *Arch Pharm Res.* 2006; 29(8): 617-23.
- Kim, S., Lee, J., Lee, G., Chang, J. Vaccination with recombinant adenoviruses and dendritic cells expressing prostate-specific antigens is effective in eliciting CTL and suppresses tumor growth in the experimental prostate cancer. *Prostate.* 2009; 69(9).
- Kimura, Y., Ito, H., Ohnishi, R., Hatano, T. Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(1): 429-35.
- Kirschenbaum, A., Klausner, A., Lee, R., Unger, P., Yao, S., Liu, X., Levine, A. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human prostate. *Urology.* 2000; 56(4): 671-6.

- Klyushnenkova, E., Kouivaskaia, D., Berard, C., Alexander, R. Cutting edge: Permissive MHC Class II allele changes the pattern of antitumor immune response resulting in failure of tumor rejection. *J Immunol.* 2009; 182(3): 1242.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A., Maatela, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ.* 1996; 312(7029): 478-81.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76(3): 560.
- Kobayashi, T., Nakata, T., Kuzumaki, T. Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells. *Cancer Lett.* 2002; 176(1): 17-23.
- Kobus, K., Turner, J., Priestley, B., Dreosti, I. A comparison of the 8-hydroxydeoxyguanosine and micronucleus techniques for the assessment of X-ray and UV induced genotoxicity. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1993; 80(2): 249-52.
- Kondo, S. The roles of cytokines in photoaging. *J Dermatol Sci.* 2000; 23 Suppl 1: S30-6.
- Kowalski, J., Samojedny, A., Paul, M., Pietsz, G., Wilczok, T. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774.2 macrophages. *Pharmacol Rep.* 2005; 57(3): 390-94.
- Kuhnau, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet.* 1976; 24: 117-19.

- Kulisic, T., Krisko, A., Dragovic-Uzelac, V., Milos, M., Pifat, G. The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare* L. spp. *hirtum*), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. *Int J Food Sci Nutr.* 2007; 58(2): 87-93.
- Kumaravel, T. S., Jha, A. N. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat Res.* 2006; 605(1-2): 7-16.
- Kuntz, S., Wenzel, U., Daniel, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr.* 1999; 38(3): 133-42.
- Lai, H., Yen, G. Inhibitory effect of isoflavones on peroxynitrite-mediated low-density lipoprotein oxidation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002; 66(1): 22-8.
- Lawenda, B. D., Kelly, K. M., Ladas, E. J., Sagar, S. M., Vickers, A., Blumberg, J. B. Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy? *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100(11): 773-83.
- Lee, J. H., Zhou, H. Y., Cho, S. Y., Kim, Y. S., Lee, Y. S., Jeong, C. S. Anti-inflammatory mechanisms of apigenin: inhibition of cyclooxygenase-2 expression, adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells, and expression of cellular adhesion molecules. *Arch Pharm Res.* 2007; 30(10): 1318-27.
- Lee, W. J., Chen, W. K., Wang, C. J., Lin, W. L., Tseng, T. H. Apigenin inhibits HGF-promoted invasive growth and metastasis involving blocking PI3K/Akt pathway and beta 4 integrin function in MDA-MB-

- 231 breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008; 226(2): 178-91.
- Lepley, D. M., Pelling, J. C. Induction of p21/WAF1 and G1 cell-cycle arrest by the chemopreventive agent apigenin. *Mol Carcinog.* 1997; 19(2): 74-82.
- Letenneur, L., Proust-Lima, C., Le Gouge, A., Dartigues, J. F., Barberger-Gateau, P. Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *Am J Epidemiol.* 2007; 165(12): 1364-71.
- Li, Z. D., Hu, X. W., Wang, Y. T., Fang, J. Apigenin inhibits proliferation of ovarian cancer A2780 cells through Id1. *FEBS Lett.* 2009; 583(12): 1999-2003.
- Li, R. R., Pang, L. L., Du, Q., Shi, Y., Dai, W. J., Yin, K. S. Apigenin inhibits allergen-induced airway inflammation and switches immune response in a murine model of asthma. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2010; doi: 10.3109/08923970903420566.
- Liang, Y. C., Huang, Y. T., Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y., Chen, C. F., Lin, J. K. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis.* 1999; 20(10): 1945-52.
- Lim, H., Son, K., Chang, H., Kang, S., Kim, H. Inhibition of chronic skin inflammation by topical anti-inflammatory flavonoid preparation, Ato Formula. *Arch Pharm Res.* 2006; 29(6): 503-7.
- Lim, H., Kim, H. P. Inhibition of mammalian collagenase, matrix metalloproteinase-1, by naturally-occurring flavonoids. *Planta Med.* 2007; 73(12): 1267-74.

- Limasset, B., le Doucen, C., Dore, J., Ojasoo, T., Damon, M., Crastes de Paulet, A. Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils. Multivariate analysis of structure-activity relationships (SAR). *Biochem Pharmacol.* 1993; 46(7): 1257-71.
- Lin, F., Chen, L., Lin, E., Ke, F., Chen, H., Tsai, M., Hsiao, P. Compounds from *Wedelia chinensis* synergistically suppress androgen activity and growth in prostate cancer cells. *Carcinogenesis.* 2007a; 28(12): 2521-9.
- Lin, W. W., Karin, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest.* 2007b; 117(5): 1175-83.
- Lindenmeyer, F., Li, H., Menashi, S., Soria, C., Lu, H. Apigenin acts on the tumor cell invasion process and regulates protease production. *Nutr Cancer.* 2001; 39(1): 139-47.
- Liu, X., Kirschenbaum, A., Yao, S., Lee, R., Holland, J., Levine, A. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses angiogenesis and the growth of prostate cancer in vivo. *J Urol.* 2000; 164(3 Pt 1): 820-5.
- Li, R. R., Pang, L. L., Du, Q., Shi, Y., Dai, W. J., Yin, K. S. Apigenin inhibits allergen-induced airway inflammation and switches immune response in a murine model of asthma. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2010; doi: 10.3109/08923970903420566.
- Loo, G. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (review). *J Nutr Biochem.* 2003; 14(2): 64-73.

- López-Lázaro, M., Willmore, E., Austin, C. The dietary flavonoids myricetin and fisetin act as dual inhibitors of DNA topoisomerases I and II in cells. *Mutat Res.* 2010; 696(1): 41-7.
- Lotito, S. B., Frei, B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic Biol Med.* 2006a; 41(12): 1727-46.
- Lotito, S. B., Frei, B. Dietary flavonoids attenuate tumor necrosis factor alpha-induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. Structure-function relationships and activity after first pass metabolism. *The J Biol Chem.* 2006b; 281(48): 37102-10.
- Mahns, A., Wolber, R., Stab, F., Klotz, L. O., Sies, H. Contribution of UVB and UVA to UV-dependent stimulation of cyclooxygenase-2 expression in artificial epidermis. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3(3): 257-62.
- Mak, P., Leung, Y. K., Tang, W. Y., Harwood, C., Ho, S. M. Apigenin suppresses cancer cell growth through ERbeta. *Neoplasia.* 2006; 8(11): 896-904.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(5): 727-47.
- Markowski, M., Bowen, C., Gelmann, E. Inflammatory cytokines induce phosphorylation and ubiquitination of prostate suppressor protein NKX3.1. *Cancer Res.* 2008; 68(17): 6896-901.
- Martínez, C., Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Lozano, J. A. Effects of several

- polyhydroxylated flavonoids on the growth of B16F10 melanoma and Melan-a melanocyte cell lines: influence of the sequential oxidation state of the flavonoid skeleton. *Melanoma Res.* 2003; 13(1): 3-9.
- Martínez, C., Vicente, V., Yáñez, J., Alcaraz, M., Castells, M., Canteras, M., Benavente-García, O., Castillo, J. The effect of the flavonoid diosmin, grape seed extract and red wine on the pulmonary metastatic B16F10 melanoma. *Histol Histopathol.* 2005; 20(4): 1121-9.
- Martínez Conesa, C. Tratamiento del melanoma metastásico pulmonar. Modelo experimental. 2004, Universidad de Murcia.
- Martínez Conesa, C., Vicente Ortega, V., Yáñez Gascón, M. J., Alcaraz Baños, M., Canteras Jordana, M., Benavente-García, O., Castillo, J. Treatment of metastatic melanoma B16F10 by the flavonoids tangeretin, rutin, and diosmin. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(17): 6791-7.
- Masferrer, J., Leahy, K., Koki, A., Zweifel, B., Settle, S., Woerner, B., Edwards, D., Flickinger, A., Moore, R., Seibert, K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res.* 2000; 60(5): 1306-11.
- Matsuda, T., Ferreri, K., Todorov, I., Kuroda, Y., Smith, C. V., Kandeel, F., Mullen, Y. Silymarin Protects Pancreatic  $\beta$ -Cells against Cytokine-Mediated Toxicity: Implication of c-Jun NH<sub>2</sub>-Terminal Kinase and Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Pathways. *Endocrinology.* 2005; 146(1): 175.

- McKay, D. L., Blumberg, J. B. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother Res.* 2006; 20(7): 519-30.
- McVean, M., Xiao, H., Isobe, K., Pelling, J. C. Increase in wild-type p53 stability and transactivational activity by the chemopreventive agent apigenin in keratinocytes. *Carcinogenesis.* 2000; 21(4): 633-39.
- Meeran, S. M., Katiyar, S. K. Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. *Front Biosci.* 2008a; 13: 2191-202.
- Meeran, S. M., Katiyar, S. K. Proanthocyanidins inhibit mitogenic and survival-signaling in vitro and tumor growth in vivo. *Front Biosci.* 2008b; 13: 887-97.
- Meeran, S. M., Akhtar, S., Katiyar, S. K. Inhibition of UVB-induced skin tumor development by drinking green tea polyphenols is mediated through DNA repair and subsequent inhibition of inflammation. *J Invest Dermatol.* 2009; 129(5): 1258-70.
- Melnikova, V. O., Pacifico, A., Chimenti, S., Peris, K., Ananthaswamy, H. N. Fate of UVB-induced p53 mutations in SKH-hr1 mouse skin after discontinuation of irradiation: relationship to skin cancer development. *Oncogene.* 2005; 24(47): 7055-63.
- Meyer, H., Bolarinwa, A., Wolfram, G., Linseisen, J. Bioavailability of apigenin from apiin-rich parsley in humans. *Ann Nutr Metab.* 2006; 50(3): 167-72.

Middleton, E. J., Kandaswami, C., Theoharides, T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(4): 673-751.

Mirzoeva, S., Kim, N. D., Chiu, K., Franzen, C. A., Bergan, R. C., Pelling, J. C. Inhibition of HIF-1 alpha and VEGF expression by the chemopreventive bioflavonoid apigenin is accompanied by Akt inhibition in human prostate carcinoma PC3-M cells. *Mol Carcinog.* 2008; 47(9): 686-700.

Moon, J. S., Oh, C. H. Solar damage in skin tumors: quantification of elastotic material. *Dermatology.* 2001; 202(4): 289-92.

Moon, Y. J., Wang, X., Morris, M. E. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro.* 2006; 20(2): 187-210.

Morabito, N., Crisafulli, A., Vergara, C., Gaudio, A., Lasco, A., Frisina, N., D'Anna, R., Corrado, F., Pizzoleo, M. A., Cincotta, M., Altavilla, D., Ientile, R., Squadrito, F. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res.* 2002; 17(10): 1904-12.

Morrissey, C., O'Neill, A., Spengler, B., Christoffel, V., Fitzpatrick, J., Watson, R. Apigenin drives the production of reactive oxygen species and initiates a mitochondrial mediated cell death pathway in prostate epithelial cells. *Prostate.* 2005; 63(2): 131-42.

Mossman, B. T., Lounsbury, K. M., Reddy, S. P. Oxidants and signaling by mitogen-activated protein kinases in lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006; 34(6): 666-69.

- Mulero, M., Romeu, M., Giralt, M., Folch, J., Nogues, M. R., Fortuno, A., Sureda, F. X., Linares, V., Cabre, M., Paternain, J. L., Mallol, J. Oxidative stress-related markers and langerhans cells in a hairless rat model exposed to UV radiation. *J Toxicol Environ Health A*. 2006; 69(14): 1371-85.
- Nafisi, S., Hashemi, M., Rajabi, M., Tajmir-Riahi, H. A. DNA adducts with antioxidant flavonoids: morin, apigenin, and naringin. *DNA Cell Biol*. 2008; 27(8): 433-42.
- Nagai, S., Ohara, K., Mukai, K. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by flavonoids in ethanol solution. *J Phys Chem B*. 2005; 109(9): 4234-40.
- Nair, C. K., Parida, D. K., Nomura, T. Radioprotectors in radiotherapy. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2001; 42(1): 21-37.
- Nakanishi, M., Niida, H., Murakami, H., Shimada, M. DNA damage responses in skin biology--implications in tumor prevention and aging acceleration. *J Dermatol Sci*. 2009; 56(2): 76-81.
- Nandakumar, V., Singh, T., Katiyar, S. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. *Cancer Lett*. 2008; 269(2): 378-87.
- Nantel, F., Denis, D., Gordon, R., Northey, A., Cirino, M., Metters, K. M., Chan, C. C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br J Pharmacol*. 1999; 128(4): 853-59.
- Nicholas, C., Batra, S., Vargo, M. A., Voss, O. H., Gavrilin, M. A., Wewers, M. D., Guttridge, D. C., Grotewold, E., Doseff, A. I. Apigenin blocks

lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF- $\kappa$ B through the suppression of p65 phosphorylation. *J Immunol.* 2007; 179(10): 7121.

Nichols, J. A., Katiyar, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res.* 2010; 302(2): 71-83.

Nie, D., Krishnamoorthy, S., Jin, R., Tang, K., Chen, Y., Qiao, Y., Zacharek, A., Guo, Y., Milanini, J., Pages, G., Honn, K. Mechanisms regulating tumor angiogenesis by 12-lipoxygenase in prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 2006; 281(27): 18601-9.

Nielsen, S. E., Young, J. F., Daneshvar, B., Lauridsen, S. T., Knuthsen, P., Sandstrom, B., Dragsted, L. O. Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *Br J Nutr.* 1999; 81(6): 447-55.

Nishigori, C. Cellular aspects of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci.* 2006; 5(2): 208-14.

O'Dea, E. L., Kearns, J. D., Hoffmann, A. UV as an amplifier rather than inducer of NF- $\kappa$ B activity. *Mol Cell.* 2008; 30(5): 632-41.

O'Leary, K. A., de Pascual-Tereasa, S., Needs, P. W., Bao, Y. P., O'Brien, N. M., Williamson, G. Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat Res.* 2004; 551(1-2): 245-54.

- O'Prey, J., Brown, J., Fleming, J., Harrison, P. R. Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66(11): 2075-88.
- Odagiri, Y., Takemoto, K., Fenech, M. Micronucleus induction in cytokinesis-blocked mouse bone marrow cells in vitro following in vivo exposure to X-irradiation and cyclophosphamide. *Environ Mol Mutagen.* 1994; 24(1): 61-7.
- Oh, Y., Chen, D., Dougherty, G., McBride, W. Adenoviral interleukin-3 gene-radiation therapy for prostate cancer in mouse model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004; 59(2): 579-83.
- Olszanecki, R., Gebaska, A., Kozlovski, V. I., Gryglewski, R. J. Flavonoids and nitric oxide synthase. *J Physiol Pharmacol.* 2002; 53(4 Pt 1): 571-84.
- Orsolich, N., Benkovic, V., Horvat-Knezevic, A., Kopjar, N., Kosalec, I., Bakmaz, M., Mihaljevic, Z., Bendelja, K., Basic, I. Assessment by survival analysis of the radioprotective properties of propolis and its polyphenolic compounds. *Biol Pharm Bull.* 2007; 30(5): 946-51.
- Ortuño, A., Arcas, M. C., Botía, J. M., Fuster, M. D., Del Río, J. A. Increasing resistance against *Phytophthora citrophthora* in tangelo Nova fruits by modulating polymethoxyflavones levels. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(10): 2836-39.
- Ortuño, A., Báidez, A., Gómez, P., Arcas, M. C., Porras, I., García-Lidón, A., Río, J. A. D. Citrus paradisi and Citrus sinensis flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chem.* 2006; 98(2): 351-58.

- Osakabe, N., Yasuda, A., Natsume, M., Yoshikawa, T. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*. 2004; 25(4): 549-57.
- Ozerdem, U. Targeting of pericytes diminishes neovascularization and lymphangiogenesis in prostate cancer. *Prostate*. 2006; 66(3): 294-304.
- Parshad, R., Sanford, K. K., Price, F. M., Steele, V. E., Tarone, R. E., Kelloff, G. J., Boone, C. W. Protective action of plant polyphenols on radiation-induced chromatid breaks in cultured human cells. *Anticancer Res*. 1998; 18(5A): 3263-6.
- Patel, D., Shukla, S., Gupta, S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *Int J Oncol*. 2007; 30(1): 233-45.
- Peng, L., Wang, B., Ren, P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2005; 45(2): 108-11.
- Pergola, C., Rossi, A., Dugo, P., Cuzzocrea, S., Sautebin, L. Inhibition of nitric oxide biosynthesis by anthocyanin fraction of blackberry extract. *Nitric Oxide*. 2006; 15(1): 30-39.
- Pinnell, S. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol*. 2003; 48(1): 1-19.
- Posadas, I., Bucci, M., Roviezzo, F., Rossi, A., Parente, L., Sautebin, L., Cirino, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide

cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2): 331-38.

Rabe, J. H., Mamelak, A. J., McElgunn, P. J., Morison, W. L., Sauder, D. N. Photoaging: mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol.* 2006; 55(1): 1-19.

Rahman, I., Biswas, S. K., Kirkham, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol.* 2006; 72(11): 1439-52.

Ramos, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res.* 2008; 52(5): 507-26.

Rayburn, E., Wang, W., Zhang, Z., Li, M., Zhang, R., Wang, H. Experimental therapy of prostate cancer with an immunomodulatory oligonucleotide: Effects on tumor growth, apoptosis, proliferation, and potentiation of chemotherapy. *Prostate.* 2006; 66(15): 1653-63.

Rebel, H., Mosnier, L. O., Berg, R. J., Westerman-de Vries, A., van Steeg, H., van Kranen, H. J., de Gruijl, F. R. Early p53-positive foci as indicators of tumor risk in ultraviolet-exposed hairless mice: kinetics of induction, effects of DNA repair deficiency, and p53 heterozygosity. *Cancer Res.* 2001; 61(3): 977-83.

Reddy, G., Barrack, E., Dou, Q., Menon, M., Pelley, R., Sarkar, F., Sheng, S. Regulatory processes affecting androgen receptor expression, stability, and function: potential targets to treat hormone-refractory prostate cancer. *J Cell Biochem.* 2006; 98(6): 1408-23.

Reelfs, O., Tyrrell, R. M., Pourzand, C. Ultraviolet a radiation-induced immediate iron release is a key modulator of the activation of NF-kappaB in human skin fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 2004; 122(6): 1440-7.

Rezai-Zadeh, K., Ehrhart, J., Bai, Y., Sanberg, P. R., Bickford, P., Tan, J., Shytle, R. D. Apigenin and luteolin modulate microglial activation via inhibition of STAT1-induced CD40 expression. *J Neuroinflammation.* 2008; 5: 41.

Rhodes, L. E., Gledhill, K., Masoodi, M., Haylett, A. K., Brownrigg, M., Thody, A. J., Tobin, D. J., Nicolaou, A. The sunburn response in human skin is characterized by sequential eicosanoid profiles that may mediate its early and late phases. *FASEB J.* 2009; 23(11): 3947-56.

Rijken, F., Kiekens, R. C., Bruijnzeel, P. L. Skin-infiltrating neutrophils following exposure to solar-simulated radiation could play an important role in photoageing of human skin. *Br J Dermatol.* 2005; 152(2): 321-8.

Rijken, F., Bruijnzeel, P. L. The pathogenesis of photoaging: the role of neutrophils and neutrophil-derived enzymes. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2009; 14(1): 67-72.

Rithidech, K. N., Tungjai, M., Whorton, E. B. Protective effect of apigenin on radiation-induced chromosomal damage in human lymphocytes. *Mutat Res.* 2005a; 585(1-2): 96-104.

Rithidech, K. N., Tungjai, M., Arbab, E., Simon, S. R. Activation of NF-kappaB in bone marrow cells of BALB/cJ mice following exposure in

vivo to low doses of (137)Cs gamma-rays. *Radiat Environ Biophys.* 2005b; 44(2): 139-43.

Rodríguez-Vicente, J., Vicente-Ortega, V., Canteras-Jordana, M. The effects of different antineoplastic agents and of pretreatment by modulators on three melanoma lines. *Cancer.* 1998; 82(3): 495-502.

Rodríguez, J., Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Lozano, J. A. Effects of several flavonoids on the growth of B16F10 and SK-MEL-1 melanoma cell lines: relationship between structure and activity. *Melanoma Res.* 2002; 12(2): 99-107.

Roewert-Huber, J., Stockfleth, E., Kerl, H. Pathology and pathobiology of actinic (solar) keratosis - an update. *Br J Dermatol.* 2007; 157 Suppl 2: 18-20.

Ross, J. A., Kasum, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr.* 2002; 22: 19-34.

Rotelli, A. E., Guardia, T., Juarez, A. O., de la Rocha, N. E., Pelzer, L. E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol Res.* 2003; 48(6): 601-06.

Ruiz, P. A., Haller, D. Functional diversity of flavonoids in the inhibition of the proinflammatory NF-kappaB, IRF, and Akt signaling pathways in murine intestinal epithelial cells. *J Nutr.* 2006; 136(3): 664-71.

Rundhaug, J. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2005; 9(2): 267-85.

- Rundhaug, J. E., Fischer, S. M. Cyclo-oxygenase-2 plays a critical role in UV-induced skin carcinogenesis. *Photochem Photobiol.* 2008; 84(2): 322-29.
- Sánchez-Campillo, M., Gabaldón, J. A., Castillo, J., Benavente-García, O., Del Baño, M. J., Alcaraz, M., Vicente, V., Álvarez, N., Lozano, J. A. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47(2): 386-92.
- Sarma, L., Kesavan, P. Protective effects of vitamins C and E against gamma-ray-induced chromosomal damage in mouse. *Int J Radiat Biol.* 1993; 63(6): 759-64.
- Sartor, L., Pezzato, E., Dona, M., Dell'Aica, I., Calabrese, F., Morini, M., Albini, A., Garbisa, S. Prostate carcinoma and green tea:(-) epigallocatechin-3-gallate inhibits inflammation-triggered MMP-2 activation and invasion in murine TRAMP model. *Int J Cancer.* 2004; 112(5): 823-29.
- Sawatzky, D. A., Willoughby, D. A., Colville-Nash, P. R., Rossi, A. G. The involvement of the apoptosis-modulating proteins ERK 1/2, Bcl-xL and Bax in the resolution of acute inflammation in vivo. *Am J Pathol.* 2006; 168(1): 33-41.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005; 45(4): 287-306.
- Sciarra, A., Di Silverio, F., Salciccia, S., Autran Gomez, A. M., Gentilucci, A., Gentile, V. Inflammation and chronic prostatic diseases: evidence for a link? *Eur Urol.* 2007; 52(4): 964-72.

- Schroeterova, L., Kralova, V., Voracova, A., Haskova, P., Rudolf, E., Cervinka, M. Anti proliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: Comparison of different cytotoxicity assays. *Toxicol In Vitro*. 2009; 23(7): 1406-11.
- Selloum, L., Bouriche, H., Tigrine, C., Boudoukha, C. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Exp Toxicol Pathol*. 2003; 54(4): 313-8.
- Sergent, T., Dupont, I., Van der Heiden, E., Scippo, M. L., Pussemier, L., Larondelle, Y., Schneider, Y. J. CYP1A1 and CYP3A4 modulation by dietary flavonoids in human intestinal Caco-2 cells. *Toxicol Lett*. 2009; 191(2-3): 216-22.
- Shanmugam, K., Holmquist, L., Steele, M., Stuchbury, G., Berbaum, K., Schulz, O., Benavente García, O., Castillo, J., Burnell, J., García Rivas, V., Dobson, G., Munch, G. Plant-derived polyphenols attenuate lipopolysaccharide-induced nitric oxide and tumour necrosis factor production in murine microglia and macrophages. *Mol Nutr Food Res*. 2008; 52(4): 427-38.
- Sharma, S. D., Katiyar, S. K. Dietary grape seed proanthocyanidins inhibit UVB-induced cyclooxygenase-2 expression and other inflammatory mediators in UVB-exposed skin and skin tumors of SKH-1 hairless mice. *Pharm Res*. 2010; doi: 10.1007/s11095-010-0050-9.
- Shenouda, N. S., Zhou, C., Browning, J. D., Ansell, P. J., Sakla, M. S., Lubahn, D. B., Macdonald, R. S. Phytoestrogens in common herbs regulate prostate cancer cell growth in vitro. *Nutr Cancer*. 2004; 49(2): 200-08.

- Shih, P., Yeh, C., Yen, G. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(23): 9427-35.
- Shimoi, K., Masuda, S., Furugori, M., Esaki, S., Kinae, N. Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in gamma-ray irradiated mice. *Carcinogenesis.* 1994; 15(11): 2669-72.
- Shimoi, K., Masuda, S., Shen, B., Furugori, M., Kinae, N. Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice. *Mutat Res.* 1996; 350(1): 153-61.
- Shin, J. I., Shim, J. H., Kim, K. H., Choi, H. S., Kim, J. W., Lee, H. G., Kim, B. Y., Park, S. N., Park, O. J., Yoon, D. Y. Sensitization of the apoptotic effect of gamma-irradiation in genistein-pretreated CaSki cervical cancer cells. *J Microbiol Biotechnol.* 2008; 18(3): 523-31.
- Shindo, Y., Witt, E., Han, D., Packer, L. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. *J Invest Dermatol.* 1994; 102(4): 470-5.
- Shoemaker, M., Cohen, I., Campbell, M. Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells. *J Ethnopharmacol.* 2004; 93(2-3): 381-4.
- Shukla, S., Gupta, S. Molecular mechanisms for apigenin-induced cell-cycle arrest and apoptosis of hormone refractory human prostate carcinoma DU145 cells. *Mol Carcinog.* 2004a; 39(2): 114-26.

- Shukla, S., Gupta, S. Suppression of constitutive and tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor (NF)-kappaB activation and induction of apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma PC-3 cells: correlation with down-regulation of NF-kappaB-responsive genes. *Clin Cancer Res.* 2004b; 10(9): 3169-78.
- Shukla, S., Mishra, A., Fu, P., MacLennan, G. T., Resnick, M. I., Gupta, S. Up-regulation of insulin-like growth factor binding protein-3 by apigenin leads to growth inhibition and apoptosis of 22Rv1 xenograft in athymic nude mice. *FASEB J.* 2005; 19(14): 2042-44.
- Shukla, S., Gupta, S. Molecular targets for apigenin-induced cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell xenograft. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5(4): 843-52.
- Shukla, S., Gupta, S. Apigenin-induced cell cycle arrest is mediated by modulation of MAPK, PI3K-Akt, and loss of cyclin D1 associated retinoblastoma dephosphorylation in human prostate cancer cells. *Cell Cycle.* 2007a; 6(9): 1102-14.
- Shukla, S., MacLennan, G. T., Flask, C. A., Fu, P., Mishra, A., Resnick, M. I., Gupta, S. Blockade of beta-catenin signaling by plant flavonoid apigenin suppresses prostate carcinogenesis in TRAMP mice. *Cancer Res.* 2007b; 67(14): 6925-35.
- Shukla, S., Gupta, S. Apigenin-induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53 activation. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44(10): 1833-45.
- Shukla, S., Gupta, S. Apigenin suppresses insulin-like growth factor I receptor signaling in human prostate cancer: an in vitro and in vivo study. *Mol Carcinog.* 2009; 48(3): 243-52.

Siddique, Y. H., Beg, T., Afzal, M. Antigenotoxic effect of apigenin against anti-cancerous drugs. *Toxicol In Vitro*. 2008; 22(3): 625-31.

Siddique, Y. H., Afzal, M. Antigenotoxic effect of apigenin against mitomycin C induced genotoxic damage in mice bone marrow cells. *Food Chem Toxicol*. 2009; 47(3): 536-39.

Siddique, Y. H., Ara, G., Beg, T., Afzal, M. Anticlastogenic effect of apigenin in human lymphocytes treated with ethinylestradiol. *Fitoterapia*. 2010; doi:10.1016/j.fitote.2010.02.003.

Silván, A., Abad, M., Bermejo, P., Villar, A. Adjuvant-carrageenan-induced inflammation in mice. *Gen Pharmacol*. 1997; 29(4): 665-9.

Sim, G. S., Lee, B. C., Cho, H. S., Lee, J. W., Kim, J. H., Lee, D. H., Pyo, H. B., Moon, D. C., Oh, K. W., Yun, Y. P., Hong, J. T. Structure activity relationship of antioxidative property of flavonoids and inhibitory effect on matrix metalloproteinase activity in UVA-irradiated human dermal fibroblast. *Arch Pharm Res*. 2007; 30(3): 290-98.

Smith, P. C. Daflon 500 mg and venous leg ulcer: new results from a meta-analysis. *Angiology*. 2005; 56 Suppl 1: S33-9.

Smolinski, A. T., Pestka, J. J. Modulation of lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production in vitro and in vivo by the herbal constituents apigenin (chamomile), ginsenoside Rb1 (ginseng) and parthenolide (feverfew). *Food Chem Toxicol*. 2003; 41(10): 1381-90.

Snyder, R. D., Gillies, P. J. Evaluation of the clastogenic, DNA intercalative, and topoisomerase II-interactive properties of

- bioflavonoids in Chinese hamster V79 cells. *Environ Mol Mutagen*. 2002; 40(4): 266-76.
- Somerset, S. M., Johannot, L. Dietary flavonoid sources in Australian adults. *Nutr Cancer*. 2008; 60(4): 442-49.
- Song, L. H., Yan, H. L., Cai, D. L. Protective effects of soybean isoflavone against gamma-irradiation induced damages in mice. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2006; 47(2): 157-65.
- Stevenson, D. E., Hurst, R. D. Polyphenolic phytochemicals—just antioxidants or much more? *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64(22): 2900-16.
- Straface, E., Vona, R., Ascione, B., Matarrese, P., Strudthoff, T., Franconi, F., Malorni, W. Single exposure of human fibroblasts (WI-38) to a sub-cytotoxic dose of UVB induces premature senescence. *FEBS Lett*. 2007; 581(22): 4342-8.
- Sun, C. L., Yuan, J. M., Lee, M. J., Yang, C. S., Gao, Y. T., Ross, R. K., Yu, M. C. Urinary tea polyphenols in relation to gastric and esophageal cancers: a prospective study of men in Shanghai, China. *Carcinogenesis*. 2002; 23(9): 1497-503.
- Svobodova, A., Psotova, J., Walterova, D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2003; 147(2): 137-45.
- Svobodova, A., Walterova, D., Vostalova, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2006; 150(1): 25-38.

Swindle, E. J., Metcalfe, D. D. The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell-dependent inflammatory processes. *Immunol Rev.* 2007; 217(1): 186.

Talorete, T. P., Bouaziz, M., Sayadi, S., Isoda, H. Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells. *Cytotechnology.* 2006; 52(3): 189-98.

Tanaka, T., Makita, H., Ohnishi, M., Mori, H., Satoh, K., Hara, A., Sumida, T., Fukutani, K., Ogawa, H. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats by flavonoids diosmin and hesperidin, each alone and in combination. *Cancer Res.* 1997a; 57(2): 246-52.

Tanaka, T., Makita, H., Kawabata, K., Mori, H., Kakumoto, M., Satoh, K., Hara, A., Sumida, T., Ogawa, H. Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis.* 1997b; 18(5): 957-65.

Tanaka, T., Makita, H., Kawabata, K., Mori, H., Kakumoto, M., Satoh, K., Hara, A., Sumida, T., Fukutani, K., Ogawa, H. Modulation of N-methyl-N-amyl nitrosamine-induced rat oesophageal tumourigenesis by dietary feeding of diosmin and hesperidin, both alone and in combination. *Carcinogenesis.* 1997c; 18(4): 761-9.

Tanaka, T., Kohno, H., Mori, H. Chemoprevention of Colon Carcinogenesis by Dietary Non-nutritive Compounds. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2001; 2(3): 165-77.

Taylor, L. P., Grotewold, E. Flavonoids as developmental regulators. *Curr Opin Plant Biol.* 2005; 8(3): 317-23.

- Tedeschi, E., Suzuki, H., Menegazzi, M. Antiinflammatory action of EGCG, the main component of green tea, through STAT-1 inhibition. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 973: 435-7.
- Tenopoulou, M., Doulias, P. T., Barbouti, A., Brunk, U., Galaris, D. Role of compartmentalized redox-active iron in hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem J.* 2005; 387(Pt 3): 703-10.
- Terzoudi, G. I., Pantelias, G. E. Cytogenetic methods for biodosimetry and risk individualisation after exposure to ionising radiation. *Radiat Prot Dosimetry.* 2006; 122(1-4): 513-20.
- Tessner, T., Muhale, F., Schloemann, S., Cohn, S., Morrison, A., Stenson, W. Ionizing radiation up-regulates cyclooxygenase-2 in I407 cells through p38 mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis.* 2004; 25(1): 37.
- Tomlins, S., Rubin, M., Chinnaiyan, A. Integrative biology of prostate cancer progression. *Annu Rev Pathol.* 2006; 1: 243-71.
- Tong, X., Van Dross, R., Abu-Yousif, A., Morrison, A., Pelling, J. Apigenin prevents UVB-induced cyclooxygenase 2 expression: coupled mRNA stabilization and translational inhibition. *Mol Cell Biol.* 2007; 27(1): 283-96.
- Torkin, R., Lavoie, J. F., Kaplan, D. R., Yeger, H. Induction of caspase-dependent, p53-mediated apoptosis by apigenin in human neuroblastoma. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4(1): 1-11.
- Toyoda, M., Bhawan, J. Electron-microscopic observations of cutaneous photoaging versus intrinsic aging. *J Geriatr Dermatol.* 1995; 3(5): 131-43.

- Toyoda, M., Morohashi, M. Morphological alterations of epidermal melanocytes in photoageing: an ultrastructural and cytomorphometric study. *Br J Dermatol*. 1998; 139(3): 444-52.
- Travis, E. L. *Radiología médica*. 1979, Madrid, Editorial A.C.
- Tripp, C. S., Blomme, E. A., Chinn, K. S., Hardy, M. M., LaCelle, P., Pentland, A. P. Epidermal COX-2 induction following ultraviolet irradiation: suggested mechanism for the role of COX-2 inhibition in photoprotection. *J Invest Dermatol*. 2003; 121(4): 853-61.
- Trochon, V., Blot, E., Cymbalista, F., Engelmann, C., Tang, R., Thomaïdis, A., Vasse, M., Soria, J., Lu, H., Soria, C. Apigenin inhibits endothelial-cell proliferation in G(2)/M phase whereas it stimulates smooth-muscle cells by inhibiting P21 and P27 expression. *Int J Cancer*. 2000; 85(5): 691-6.
- Uma Devi, P., Ganasoundari, A., Vrinda, B., Srinivasan, K. K., Unnikrishnan, M. K. Radiation protection by the ocimum flavonoids orientin and vicenin: mechanisms of action. *Radiat Res*. 2000; 154(4): 455-60.
- Uma Devi, P., Satyamitra, M. Protection against prenatal irradiation-induced genomic instability and its consequences in adult mice by Ocimum flavonoids, orientin and vicenin. *Int J Radiat Biol*. 2004; 80(9): 653-62.
- Umegaki, K., Fenech, M. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis*. 2000; 15(3): 261-9.

Usda, U. Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. Release 2.1. *US Department of Agriculture*. 2007.

Valster, A., Tran, N. L., Nakada, M., Berens, M. E., Chan, A. Y., Symons, M. Cell migration and invasion assays. *Methods*. 2005; 37(2): 208-15.

Van Dross, R. T., Hong, X., Pelling, J. C. Inhibition of TPA-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by apigenin through downregulation of Akt signal transduction in human keratinocytes. *Mol Carcinog*. 2005; 44(2): 83-91.

Van Dross, R., Hong, X., Essengue, S., Fischer, S., Pelling, J. Modulation of UVB-induced and basal cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by apigenin in mouse keratinocytes: role of USF transcription factors. *Mol Carcinog*. 2007; 46(4): 303-14.

Van Hien, T., Huong, N. B., Hung, P. M., Duc, N. B. Radioprotective effects of Vitexina for breast cancer patients undergoing radiotherapy with cobalt-60. *Integr Cancer Ther*. 2002; 1(1): 38.

van Rijn, J., van den Berg, J. Flavonoids as enhancers of x-ray-induced cell damage in hepatoma cells. *Clin Cancer Res*. 1997; 3(10): 1775-79.

Vicente, J. R., Ortega, V. V., Jordana, M. C. Valor del ensayo colorimétrico con MTT en el estudio del crecimiento y citotoxicidad in vitro de líneas de melanoma. *Patología*. 1997; 30(1): 18-27.

von Knethen, A., Soller, M., Brüne, B. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and sepsis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007; 55(1): 19-25.

- Vrinda, B., Uma Devi, P. Radiation protection of human lymphocyte chromosomes in vitro by orientin and vicenin. *Mutat Res.* 2001; 498(1-2): 39-46.
- Walle, U. K., Walle, T. Induction of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by flavonoids-structural requirements. *Drug Metab Dispos.* 2002; 30(5): 564-9.
- Walle, T. Methylation of dietary flavones greatly improves their hepatic metabolic stability and intestinal absorption. *Mol Pharm.* 2007; 4(6): 826-32.
- Wang, W., VanAlstyne, P. C., Irons, K. A., Chen, S., Stewart, J. W., Birt, D. F. Individual and interactive effects of apigenin analogs on G2/M cell-cycle arrest in human colon carcinoma cell lines. *Nutr Cancer.* 2004; 48(1): 106-14.
- Wang, L., Lee, I. M., Zhang, S. M., Blumberg, J. B., Buring, J. E., Sesso, H. D. Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89(3): 905-12.
- Watanabe, N., Hirayama, R., Kubota, N. The chemopreventive flavonoid apigenin confers radiosensitizing effect in human tumor cells grown as monolayers and spheroids. *J Radiat Res.* 2007; 48(1): 45-50.
- Way, T., Kao, M., Lin, J. Apigenin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2004; 279(6): 4479-89.

- Way, T., Kao, M., Lin, J. Degradation of HER2/neu by apigenin induces apoptosis through cytochrome c release and caspase-3 activation in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. *FEBS Lett.* 2005; 579(1): 145-52.
- Wei, H., Cai, Q., Rahn, R. O. Inhibition of UV light- and Fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein. *Carcinogenesis.* 1996; 17(1): 73-7.
- Wei, H., Bowen, R., Zhang, X., Lebwohl, M. Isoflavone genistein inhibits the initiation and promotion of two-stage skin carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis.* 1998; 19(8): 1509-14.
- Wei, H., Zhang, X., Wang, Y., Lebwohl, M. Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein. *Cancer Lett.* 2002; 185(1): 21-9.
- Wei, H., Saladi, R., Lu, Y., Wang, Y., Palep, S. R., Moore, J., Phelps, R., Shyong, E., Lebwohl, M. G. Isoflavone genistein: photoprotection and clinical implications in dermatology. *J Nutr.* 2003; 133(11 Suppl 1): 3811S-19S.
- Wheeler, D. L., Martin, K. E., Ness, K. J., Li, Y., Dreckschmidt, N. E., Wartman, M., Ananthaswamy, H. N., Mitchell, D. L., Verma, A. K. Protein kinase C epsilon is an endogenous photosensitizer that enhances ultraviolet radiation-induced cutaneous damage and development of squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 2004; 64(21): 7756-65.
- Wilgus, T., Parrett, M., Ross, M., Tober, K., Robertson, F., Oberyszyn, T. Inhibition of ultraviolet light B-induced cutaneous inflammation by a

- specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Adv Exp Med Biol.* 2002; 507: 85-92.
- Wilgus, T., Koki, A., Zweifel, B., Rubal, P., Oberyszyn, T. Chemotherapeutic efficacy of topical celecoxib in a murine model of ultraviolet light B-induced skin cancer. *Mol Carcinog.* 2003a; 38(1): 33-9.
- Wilgus, T., Koki, A., Zweifel, B., Kusewitt, D., Rubal, P., Oberyszyn, T. Inhibition of cutaneous ultraviolet light B-mediated inflammation and tumor formation with topical celecoxib treatment. *Mol Carcinog.* 2003b; 38(2): 49-58.
- Willoughby, D. A., Moore, A. R., Colville-Nash, P. R., Gilroy, D. Resolution of inflammation. *Int J Immunopharmacol.* 2000; 22(12): 1131-35.
- Winter, C. A., Risley, E. A., Nuss, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1962; 111: 544-47.
- Wu, Z. H., Mabb, A., Miyamoto, S. PIDD: a switch hitter. *Cell.* 2005; 123(6): 980-2.
- Wu, Z. H., Shi, Y., Tibbetts, R. S., Miyamoto, S. Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science.* 2006; 311(5764): 1141-6.
- Wu, Z. H., Miyamoto, S. Many faces of NF-kappaB signaling induced by genotoxic stress. *J Mol Med.* 2007; 85(11): 1187-202.
- Wang, W., VanAlstyne, P. C., Irons, K. A., Chen, S., Stewart, J. W., Birt, D. F. Individual and interactive effects of apigenin analogs on G2/M

- cell-cycle arrest in human colon carcinoma cell lines. *Nutr Cancer*. 2004; 48(1): 106-14.
- Xiao, D., Zeng, Y., Choi, S., Lew, K., Nelson, J., Singh, S. Caspase-dependent apoptosis induction by phenethyl isothiocyanate, a cruciferous vegetable-derived cancer chemopreventive agent, is mediated by Bak and Bax. *Clinical Cancer Res*. 2005; 11(7): 2670.
- Yaar, M., Gilchrest, B. A. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol*. 2007; 157(5): 874-87.
- Yabroff, K. R., Warren, J. L., Brown, M. L. Costs of cancer care in the USA: a descriptive review. *Nat Clin Pract Oncol*. 2007; 4(11): 643-56.
- Yamamoto, O., Bhawan, J., Hara, M., Gilchrest, B. A. Keratinocyte degeneration in human facial skin: documentation of new ultrastructural markers for photodamage and their improvement during topical tretinoin therapy. *Exp Dermatol*. 1995; 4(1): 9-19.
- Yamori, Y., Moriguchi, E. H., Teramoto, T., Miura, A., Fukui, Y., Honda, K. I., Fukui, M., Nara, Y., Taira, K., Moriguchi, Y. Soybean isoflavones reduce postmenopausal bone resorption in female Japanese immigrants in Brazil: a ten-week study. *J Am Coll Nutr*. 2002; 21(6): 560-63.
- Yang, M., Tanaka, T., Hirose, Y., Deguchi, T., Mori, H., Kawada, Y. Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary-bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Int J Cancer*. 1997; 73(5): 719-24.
- Wang, W., VanAlstyne, P. C., Irons, K. A., Chen, S., Stewart, J. W., Birt, D. F. Individual and interactive effects of apigenin analogs on G2/M

- cell-cycle arrest in human colon carcinoma cell lines. *Nutr Cancer*. 2004; 48(1): 106-14.
- Yano, S., Umeda, D., Maeda, N., Fujimura, Y., Yamada, K., Tachibana, H. Dietary apigenin suppresses IgE and inflammatory cytokines production in C57BL/6N mice. *J Agric Food Chem*. 2006; 54(14): 5203-07.
- Yano, S., Umeda, D., Yamashita, T., Ninomiya, Y., Sumida, M., Fujimura, Y., Yamada, K., Tachibana, H. Dietary flavones suppresses IgE and Th2 cytokines in OVA-immunized BALB/c mice. *Eur J Nutr*. 2007; 46(5): 257-63.
- Yano, S., Umeda, D., Yamashita, S., Yamada, K., Tachibana, H. Dietary apigenin attenuates the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *J Nutr Biochem*. 2009; 20(11): 876-81.
- Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M., Teruel, J. A. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. *Nutr Cancer*. 2004; 49(2): 191-9.
- Yi, L. T., Li, J. M., Li, Y. C., Pan, Y., Xu, Q., Kong, L. D. Antidepressant-like behavioral and neurochemical effects of the citrus-associated chemical apigenin. *Life Sci*. 2008; 82(13-14): 741-51.
- Yoo, H., Jeon, B., Jeon, M. S., Lee, H., Kim, T. Y. Reciprocal regulation of 12- and 15-lipoxygenases by UV-irradiation in human keratinocytes. *FEBS Lett*. 2008; 582(21-22): 3249-53.

- Yoon, J. H., Baek, S. J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med J.* 2005; 46(5): 585-96.
- Yu, Z., Persson, H. L., Eaton, J. W., Brunk, U. T. Intralysosomal iron: a major determinant of oxidant-induced cell death. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34(10): 1243-52.
- Zhang, B., Liu, J. Y., Pan, J. S., Han, S. P., Yin, X. X., Wang, B., Hu, G. Combined treatment of ionizing radiation with genistein on cervical cancer HeLa cells. *J Pharmacol Sci.* 2006; 102(1): 129-35.
- Zhang, Q., Zhao, X. H., Wang, Z. J. Cytotoxicity of flavones and flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line (KYSE-510) by induction of G2/M arrest and apoptosis. *Toxicol In Vitro.* 2009; 23(5): 797-807.
- Zhou, Y., Mi, M. Genistein stimulates hematopoiesis and increases survival in irradiated mice. *J Radiat Res (Tokyo).* 2005; 46(4): 425-33.
- Wang, W., VanAlstyne, P. C., Irons, K. A., Chen, S., Stewart, J. W., Birt, D. F. Individual and interactive effects of apigenin analogs on G2/M cell-cycle arrest in human colon carcinoma cell lines. *Nutr Cancer.* 2004; 48(1): 106-14.



## **ANEXO I: ABREVIATURAS**

---



<b>6-4 PP</b>	Fotoaductos de 6-4 pirimidona
<b>8-oxo-dG</b>	8-oxo-7,8-dihidroxi-2' deoxiguanosina
<b>Abs.</b>	Absorbancia
<b>AINE</b>	Antiinflamatorio no esteroideo
<b>Akt</b>	Akt / proteín quinasa B
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>AP</b>	Proteína activadora
<b>Apaf</b>	Factor activador de proteasas de la apoptosis
<b>Apig.</b>	Apigenina potásica
<b>AR</b>	Receptor de andrógenos
<b>ATM</b>	Quinasa mutada en ataxia telangiectasia
<b>ATR</b>	Proteína relacionada con ataxia telangiectasia y Rad3
<b>Ba</b>	Filtro de barrera
<b>BAD</b>	Promotor de muerte asociado con Bcl-2/Bcl <sub>XL</sub>
<b>BCC</b>	Carcinoma de células basales
<b>bFGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
<b>BPH</b>	Hiperplasia benigna de próstata
<b>CB</b>	Célula bloqueada en citoquinesis
<b>cdk</b>	Quinasa dependiente de ciclinas
<b>cdki</b>	Inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas
<b>Chk</b>	Quinasa de control
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>CPD</b>	Dímero de ciclobutano pirimidina
<b>cPLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipasa A <sub>2</sub> citosólica
<b>CYP</b>	Citocromo P450

<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>Di</b>	Espejo dicroico
<b>DMEM</b>	Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGCG</b>	Galato de epigallocatequina
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EGF-R</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintasa endotelial
<b>ERK</b>	Quinasa regulada por señales extracelulares
<b>Ex</b>	Filtro de excitación
<b>FAK</b>	Quinasa de adhesión focal
<b>FD</b>	Factor de protección
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FISH</b>	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
<b>FRD</b>	Factor reductor de dosis
<b>FSC</b>	<i>Forward scatter</i>
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos / macrófagos
<b>HAT</b>	Histona acetiltransferasa
<b>HDAC</b>	Histona deacetilasa
<b>HETE</b>	Ácido hidroxieicosatetraenoico
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos
<b>HIF</b>	Factor inducible por hipoxia
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alto rendimiento
<b>IC</b>	Concentración inhibitoria

<b>ICAM</b>	Molécula de adhesión intercelular
<b>IFN</b>	Interferón
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento similar a insulina
<b>IKK</b>	Quinasa de la proteína inhibidora de NF-κB
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>INK</b>	Inhibidor de quinasa
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible
<b>IP</b>	Proteína inducible por IFN
<b>iPLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipasa A <sub>2</sub> independiente de calcio
<b>IκB</b>	Proteína inhibidora de NF-κB
<b>JAK</b>	Quinasa Janus
<b>JNK</b>	Quinasa N-terminal de c-Jun/proteín quinasa activada por estrés
<b>KGF</b>	Factor de crecimiento de queratinocitos
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>LOX</b>	Lipooxigenasa
<b>LSD</b>	Test de la mínima diferencia significativa
<b>MAPK</b>	Quinasa activada por mitógenos
<b>MAPKK</b>	Quinasa de MAPK
<b>MCP</b>	Proteína quimiotáctica de monocitos
<b>M-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de macrófagos
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>MIP</b>	Proteína inflamatoria de macrófagos
<b>MMP</b>	Metaloproteasa de matriz
<b>MN</b>	Micronúcleo

<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear κB
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso
<b>NIK</b>	Quinasa inductora de NF-κB
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintasa neuronal
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>NQO1</b>	NAD(P)H-quinona óxido-reductasa
<b>Nrf</b>	Factor relacionado con NF-E2 p45
<b>OCD</b>	Ornitina decarboxilasa
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PDK</b>	Quinasa dependiente de fosfoinositol
<b>PECAM</b>	Molécula de adhesión de plaquetas / células endoteliales
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol quinasa
<b>PIN</b>	Neoplasia intraepitelial de alto grado
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidil inositol (4,5) bifosfato
<b>PIP<sub>3</sub></b>	Fosfatidil inositol (3,4,5) trifosfato
<b>PKB</b>	Proteín quinasa B
<b>PKC</b>	Proteín quinasa C
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PPAR</b>	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas
<b>PSA</b>	Antígeno específico prostático
<b>PTEN</b>	Homólogo de fosfatasa y tensina
<b>RNasa</b>	Ribonucleasa A

<b>RNS</b>	Especie reactiva de nitrógeno
<b>ROS</b>	Especie reactiva de oxígeno
<b>RP</b>	Radioprotector
<b>RXR</b>	Receptor de retinoides X
<b>SBF</b>	Suero bovino fetal
<b>SCC</b>	Carcinoma de células escamosas
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>sPLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipasa A <sub>2</sub> secretora
<b>SSC</b>	<i>Side scatter</i>
<b>STAT</b>	Proteína transductora de señal y activadora de la transcripción
<b>STS</b>	Estaurosporina
<b>TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformante
<b>TIMP</b>	Inhibidor tisular de metaloproteasas
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>TRAMP</b>	Adenocarcinoma de próstata de ratón transgénico
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>uPA</b>	Activador de plasminógeno tipo uroquinasa
<b>UV</b>	Radiación ultravioleta
<b>VCAM</b>	Molécula de adhesión vascular
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular