



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**“Fitoquímicos como Agentes Adyuvantes Terapéuticos
frente al Cáncer Oral”**

D. Eduardo Pons-Fuster López

2018



**UNIVERSIDAD DE MURCIA FACULTAD DE MEDICINA Y
ODONTOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGÍA, ESTOMATOLOGÍA,
RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA**

**“FITOQUÍMICOS COMO AGENTES ADYUVANTES TERAPÉUTICOS
FRENTE AL CANCER ORAL”**

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

EDUARDO PONS-FUSTER LÓPEZ

AGRADECIMIENTOS



Para todas aquellas personas que me han acompañado en este viaje
A mis directores de Tesis, Pía López y Francisco Gómez, por su guía en este largo camino
A los profesores Wei Wei y Qintong Wang, por acogerme y hacerme vivir una experiencia tan
increíble en una cultura tan distinta
A todos los miembros del SAI, ya que sin su paciencia y conocimiento esto no podría haberse
realizado
A todos por los que luchan día a día por convertir el conocimiento a través de la ciencia en una
herramienta abierta y libre para todos, dedicados al progreso de la vida y el saber
A mi familia y amigos
Especialmente a mi madre



INDICE

INDICE DE ABREVIATURAS	7
INDICE DE TABLAS	9
INDICE DE FIGURAS	10
RESUMEN	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUCCIÓN	18
1.1 CÁNCER ORAL	19
1.1.1. GENERALIDADES Y EPIDEMIOLOGÍA	19
1.1.2. CÁNCER ORAL DE LAS CÉLULAS ESCAMOSAS	20
1.1.3. ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO	20
1.1.4. CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA	23
1.1.5. ASPECTOS CLÍNICOS	24
1.1.6. DIAGNÓSTICO Y ESTADIAJE	26
1.1.7. PREVENCIÓN	27
1.1.8. TRATAMIENTO	28
1.1.8.1. 5-FLUOROURACILO	31
1.1.9. COMPLICACIONES ORALES DEL TRATAMIENTO	33
1.2. BIFOSFONATOS	36
1.2.1. ESTRUCTURA QUÍMICA Y CLASIFICACIÓN	36
1.2.2. FARMACOLOGÍA Y FARMACOCINÉTICA	37
1.2.2.1. EFECTO EN OSTEÓBLASTOS	39
1.2.3. APLICACIONES TERAPÉUTICAS	40
1.2.4. EFECTOS SECUNDARIOS	41
1.2.5. ÁCIDO ZOLEDRÓNICO	44
1.3. FITOQUÍMICOS	46
1.3.1. GENERALIDADES Y CLASIFICACIÓN	46
1.3.2. POLIFENÓLES	47
1.3.2.1. EPIGALO-3-CATEQUINGALATO	52



1.3.3. SAPONINAS	56
1.3.3.1. DIOSGENINA	58
2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	61
2.1. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	62
2.2. OBJETIVOS	64
3. MATERIAL Y MÉTODOS	65
3.1. MATERIAL	66
3.1.1. LÍNEAS CELULARES	66
3.1.2. REACTIVOS	68
3.1.3. INSTRUMENTACIÓN	69
3.2. MÉTODOS	73
3.2.1. MÉTODO DE CULTIVO	73
3.2.2. DISEÑO DEL ESTUDIO	74
3.2.2.1. ESTUDIO 1: POTENCIAL QUIMIOTERAPÉUTICO DEL ÁCIDO ZOLEDRÓNICO, DIOSGENINA Y EGCG SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER ORAL	75
3.2.2.2. ESTUDIO 2: EVALUCIÓN DE LA COMBINACIÓN DE 5-FLUOROURACILO CON EGCG Y RADIOTERAPIA EN LAS LÍNEAS DE CÁNCER ORAL PE/CA-PJ15 y H357	79
3.2.2.3. ESTUDIO 3: EFECTOS DEL ÁCIDO ZÓLEDRONICO SÓLO O EN COMBINACIÓN CON EGCG SOBRE LAS CELULAS CON FENOTIPO DE OSTEOLASTO SAOS-2	81
3.2.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	84
4. RESULTADOS	86
4.1. RESULTADOS ESTUDIO 1: POTENCIAL QUIMIOTERAPÉUTICO DEL ÁCIDO ZOLEDRÓNICO, DIOSGENINA Y EGCG SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER ORAL	87
4.1.1. EFECTOS DE EGCG, DG Y ZA EN LA VIABILIDAD CELULAR DE PE/CA-PJ15	87
4.1.2. EFECTOS DE EGCG, DG Y ZA SOBRE LA APOPTOSIS CELULAR DE PE/CA-PJ15	92
4.1.3. EFECTOS DE EGCG, DG Y ZA EN LA MIGRACIÓN CELULAR DE PE/CA-PJ15	93
4.1.4. EFECTOS DE EGCG, DG Y ZA SOBRE EL CICLO CELULAR DE PE/CA-PJ15	95



4.2. RESULTADOS ESTUDIO 2: EVALUCIÓN DE LA COMBINACIÓN DE 5-FLUOROURACILO CON EGCG Y RADIOTERAPIA EN LAS LÍNEAS DE CÁNCER ORAL PE/CA-PJ15 Y H357	99
4.2.1. EFECTOS DE LA RADIACIÓN, 5-FU Y EGCG SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR	99
4.2.2. EFECTOS DE LA RADIACIÓN, 5-FU Y EGCG SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR	102
4.2.3. EFECTOS DE LA RADIACIÓN, 5-FU Y EGCG SOBRE EL CICLO CELULAR	104
4.3. RESULTADOS ESTUDIO 3: EFECTOS DEL ÁCIDO ZÓLEDRONICO SÓLO O EN COMBINACIÓN CON EGCG SOBRE LAS CELULAS CON FENOTIPO DE OSTEOLASTO SAOS-2	107
4.3.1. EFECTO DE ZA Y EGCG SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR	107
4.3.2. EFECTO DE ZA Y ZA+EGCG SOBRE LA MINERALIZACIÓN	108
4.3.3. EFECTO DE ZA Y ZA+EGCG SOBRE LA DEPOSICIÓN DE COLÁGENO	110
4.3.4. EFECTO DE ZA Y ZA+EGCG SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR	112
5. DISCUSIÓN	115
5.1. DISCUSIÓN ESTUDIO 1: POTENCIAL QUIMIOTERAPÉUTICO DEL ÁCIDO ZOLEDRÓNICO, DIOSGENINA Y EGCG SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER ORAL	116
5.2. DISCUSIÓN ESTUDIO 2: EVALUCIÓN DE LA COMBINACIÓN DE 5-FLUOROURACILO CON EGCG Y RADIOTERAPIA EN LAS LÍNEAS DE	118
5.3. DISCUSIÓN ESTUDIO 3: EFECTOS DEL ÁCIDO ZÓLEDRONICO SÓLO O EN COMBINACIÓN CON EGCG SOBRE LAS CELULAS CON FENOTIPO DE	120
6. CONCLUSIONES	124
6.1. CONCLUSIONES	125
6.2. CONCLUSIONS	126
7. BIBLIOGRAFÍA	127
8. ANEXOS	147
8.1. TRABAJOS PUBLICADOS EN RELACIÓN CON LA TESIS DOCTORAL	148
8.2. COMUNICACIONES ORALES EN RELACIÓN CON LA TESIS DOCTORAL	148



INDICE DE ABREVIATURAS

5-FU: 5-fluorouracilo	DG: Diosgenina
AA: Ácido ascórbico	DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle médium)
ADN: Ácido desoxirribonucleico	ECACC: Colección europea de cultivos celulares autenticados (European collection of authenticated cell cultures)
AP-1: Proteína activadora (Activator protein-1)	EC: (-)-epicatequin
ARN: Ácido ribonucleico	EDTA: ácido etilendiaminotetracético
AJCC: Comité conjunto estadounidense sobre el cáncer (American joint committee on cancer)	EGC: (-)-epigallocatechin
ATP: Adenosin trifosfato	EGCG: Epigalo-3-catequingalato
Bcl2: proteína antiapoptotica (B-cell lymphoma 2)	EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico (Epidermal growth factor receptor)
BFs: Bifosfonatos	FDA: Administración de medicamentos y alimentos (Food and drug administration)
BFs-N: Bifosfonatos nitrogenados	FPP: Farnesilpirofosfato
Bid: proteína antiapoptotica	G: Fuerza G
BG: β -glicerolfosfato	Gy: Gray
CCS: Carcinoma de células escamosas	GGOH: ácido geranilgeranilo
cm ² : centímetros cuadrados	GGPP: Geranilgeranildifosfato
CO ₂ : Dióxido de Carbono	GGPPi: Geranilgeranil pirofosfato
COCE: Carcinoma oral de células escamosas	
COMT: catecol-O-metiltransferasa	



HA: Hidroxiapatita	ONM: Osteonecrosis mandibular
hBMSCs: células osteoprogenitoras humanas derivados de células mesenquimales (Human bone marrow stromal osteoprogenitor cells)	OPG: Osteoprotegerina
HCL: Ácido Clorhídrico	PBS: Tampón fosfato salino (Phosphate buffer saline)
HOB: osteoblastos humanos (human osteoblasts)	PE/CA: Línea celular PE/CA-PJ15
IARC: agencia internacional para la investigación del cáncer (International agency for reseach on cancer)	PI: Yoduro de propidio (propidium iodide)
IMDM: Modificación de Iscove del medio Dulbecco (Iscove's modified Dulbecco's medium)	PINP: propéptido de Procolágeno tipo I
IV: Intravenosa	PKB: Proteína kinasa B
IPP: Isopentenil pirofosfato	PPI: Pirofosfato inorgánico
JNK: C-jun N-terminal proteína quinasa	ROS: Especies reactivas del oxígeno (Reactive oxygen species)
M-CSF: factor estimulador de colonias de macrófagos	RNAsa: Ribonucleasa A
mg: Miligramos	SBF: Suero bovino fetal
ml: Mililitros	SULT: <i>fenolsulfotransferasa</i>
mM: milimolar	UGT: UDP-glucuroniltransferasa
MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil- 2H-tetrazolio	VPH: Virus del papiloma humano
NaOH: Hidróxido de sodio	ZA: Ácido zoledrónico (Zoledronic acid)
nM: nanomolar	µg: microgramos
nm: nanómetros	µL: microlitros
NNK: 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridilo)-1-butanona	µM: micromolar
NNN: N-nitrosornicotina	
NF-κβ: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	



INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Estadíaje clínico. (T) Extensión del tumor primario; (N) Ausencia o presencia de afectación de ganglios linfáticos regionales;(M) Ausencia o presencia de metástasis a distancia	27
Tabla 2 Potencia de los BFs para inhibir la reabsorción ósea	37
Tabla 3: Clasificación de los polifenoles principales modificado de Tiwari y cols	47
Tabla 4: Clasificación de las saponinas modificado de Tiwari y cols.	57
Tabla 5: Diseño de los estudios 1, 2 y 3	74
Tabla 6: Diseño del estudio 1	75
Tabla 7: Ensayos realizados en el estudio 1	75
Tabla 8: Diseño del estudio 2	79
Tabla 9: Ensayos realizados en el estudio 2	79
Tabla 10: Diseño del estudio 3	81
Tabla 11: Ensayos realizados en el estudio 3	81
Tabla 12: Efectos de ZA a 24, 48 y 72 horas sobre la viabilidad celular de las células PE/CA-PJ15. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%	88
Tabla 13: Efectos de DG a 24, 48 y 72 horas sobre la viabilidad celular de las células PE/CA-PJ15. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%	89
Tabla 14: Efectos de EGCG a 24, 48 y 72 horas sobre la viabilidad celular de las células PE/CA-PJ15. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%	90
Tabla 15: Efectos de la combinación de ZA, DG y EGCG (E) a 24, 48 y 72 horas sobre la viabilidad celular de las células PE/CA-PJ15. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%	91
Tabla 16: Efectos de las distintas concentraciones de ZA, DG y EGCG (E) sobre la apoptosis en la línea celular PE/CA-PJ15 tras 24, 48 y 72 horas de exposición	93
Tabla 17: Efectos de EGCG (E), DG y ZA sobre la migración celular de PE/CA-PJ15 a las 4 y 8 horas. Los resultados están expresados como distancia migrada por las células en micrómetros	94
Tabla 18: Efectos de EGCG (E), DG y ZA sobre la migración celular de PE/CA-PJ15 a las 4 y 8 horas. Los resultados están expresados como distancia migrada por las células en micrómetros	96
Tabla 19: Efectos ZA, DG y EGCG (E) sobre el ciclo celular de PE/CA-PJ15 a las 48 horas. Las células fueron clasificadas en tres fases. G0/G1, G2/M y S.	97
Tabla 20: Resumen de los resultados del estudio 1	98
Tabla 21: Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG (E) sobre la viabilidad celular en la línea H357. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%	99
Tabla 22: Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG (E) sobre la viabilidad celular a las 48 horas en la línea PE/CA. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%	101
Tabla 23: Resumen de los resultados del estudio 2	106
Tabla 24 : Resumen de los resultados del estudio 3	114
Tabla 25: Resumen de los efectos de ZA en distintas líneas celulares de osteoblastos	121



INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Factores de riesgo predominantes en el desarrollo del cáncer oral	23
Figura 2: (A) carcinoma verrucoso en mucosa yugal (B) Carcinoma oral de las células escamosas (COCE) en el borde lateral de la lengua	25
Figura 3: Estructura química del 5-fluorouracilo	31
Figura 4: Estructura química del (A) pirofosfato inorgánico y (B) de los bifosfonatos	36
Figura 5: Estructura química del ácido zoledrónico	44
Figura 6: Clasificación de los fitoquímicos modificado de Tiwari y cols (114)	46
Figura 7: Estructura química de los ácidos fenólicos (A) Cinámico y (B) Benzoico	49
Figura 8: Estructura química del (A) benzopireno y (B) cumarina escopoletina	50
Figura 9: Estructura química (A) general de los estilbenos y (B) resveratrol	50
Figura 10: Estructura química del lignano Enterodiol	51
Figura 11: Estructura química (A) general de los flavonoides y (B) quercetina	51
Figura 12: Estructura química del epigallocatequin-3-galato	52
Figura 13: Estructura química de la saponina triterpenoide ginsegósido RG1	57
Figura 14: Estructura química de la saponina esteroidea dioscina, formada (A) por una porción esteroidea (Diosgenina) y (B) una porción glucídica unidas por (C) un átomo de oxígeno	58
Figura 15: Estructura química de la diosgenina	59
Figura 16: Línea celular de carcinoma oral de células escamosas PE/CA-PJ15	66
Figura 17: Línea celular de carcinoma oral de células escamosas H357	67
Figura 18: Línea celular de osteosarcoma SAOS-2	67
Figura 19: Reactivos usados en los experimentos. (A) β -glicerolfosfato (B) Ácido ascórbico (C) Azul tripán (D) DMSO (E) Direct Red 80 (F) Alizarina roja	68
Figura 20: Lector de placas FLUOstar Omega	69
Figura 21 : Microscopio Óptico Nikon Eclipse TE2000-U	69
Figura 22: Irradiador de Rayos X YXLON	70
Figura 23: Citómetro de flujo FACSCaliburTM	70
Figura 24: Balanza de precisión Ohaus explorer	71
Figura 25: Extracto concentrado de EGCG	71
Figura 26: Extracto concentrado de diosgenina	72
Figura 27: Ácido Zoledrónico	72
Figura 28: 5-fluorouracilo	72
Figura 29: Cabina de flujo laminar vertical Cultair modelo ASB II	73
Figura 30: Placas de 96 pocillos con células sembradas para realizar el MTT	76
Figura 31: Placas de 96 pocillos con células para cuantificar la apoptosis	77
Figura 32: Surco producido en la monocapa de células para medir la migración celular	78
Figura 33: Análisis de las distintas fases celulares capturando más de 20.000 eventos	78
Figura 34: Imagen 10X de las nódulos de calcio teñidos con Alizarina Roja	83
Figura 35: Imagen 10X de la tinción de Sirius Red sobre células SAOS-2	84
Figura 36: Efectos de ZA a 24, 48 y 72 horas sobre la viabilidad celular de las células PE/CA-PJ15. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%	87



Figura 37: Efectos de DG a 24, 48 y 72 horas sobre la viabilidad celular de las células PE/CA-PJ15. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%	89
Figura 38: Efectos de EGCG a 24, 48 y 72 horas sobre la viabilidad celular de las células PE/CA-PJ15. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%.	90
Figura 39: Efectos de la combinación de ZA, DG y EGCG (E) a 24, 48 y 72 horas sobre la viabilidad celular de las células PE/CA-PJ15. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%	91
Figura 40: Efectos de las distintas concentraciones de ZA, DG y EGCG (E) sobre la apoptosis en la línea celular PE/CA-PJ15 tras 24, 48 y 72 horas de exposición.	92
Figura 41: Efectos de EGCG (E), DG y ZA sobre la migración celular de PE/CA-PJ15 a las 4 y 8 horas. Los resultados están expresados como distancia migrada por las células en micrómetros	94
Figura 42: Imágenes de la migración celular de las células tratadas con EGCG (E), DG y ZA a las 4 y 8 horas.	95
Figura 43: Efectos ZA, DG y EGCG (E) sobre el ciclo celular de PE/CA-PJ15 a las 24 horas. Las células fueron clasificadas en tres fases. G0/G1, G2/M y S	96
Figura 44: Efectos ZA, DG y EGCG (E) sobre el ciclo celular de PE/CA-PJ15 a las 48 horas. Las células fueron clasificadas en tres fases. G0/G1, G2/M y S	97
Figura 45: Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG (E) sobre la viabilidad celular a las 48 horas en la línea H357. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%.	100
Figura 46: Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG (E) sobre la viabilidad celular a las 48 horas en la línea PE/CA. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%	101
Figura 47: Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG (E) sobre la migración celular a las 5 y 10 horas de la línea H357. Los resultados están expresados como distancia migrada por las células en micrómetros	102
Figura 48: Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG (E) sobre la migración celular a las 5 y 10 horas de la línea PE/CA. Los resultados están expresados como distancia migrada por las células en micrómetros	103
Figura 49: Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG (E) sobre el ciclo celular tras 48 horas de exposición en la línea H357. Las células fueron clasificadas en tres fases. G0/G1, G2/M y S	104
Figura 50: Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG (E) sobre el ciclo celular tras 48 horas de exposición en la línea PE/CA. Las células fueron clasificadas en tres fases. G0/G1, G2/M y S.	105
Figura 51: Efecto de EGCG sobre la viabilidad celular de las células SAOS-2 a las 72 horas	107
Figura 52: Efecto de ZA sobre la viabilidad celular de la línea SAOS-2	108
Figura 53: Efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la mineralización de las células SAOS-2 a los 7 días	109
Figura 54: Efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la mineralización de las células SAOS-2 a los 14 días	109
Figura 55: Efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la mineralización de las células SAOS-2 a los 7 y 14 días mediante la tinción de alizarina roja	110
Figura 56: Efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la deposición de colágeno a los 7 días	111
Figura 57 Efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la deposición de colágeno a los 14 días	111



Figura 58: Efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la deposición de colágeno de las células SAOS-2 a los 7 y 14 días mediante la tinción de Sirius Red	112
Figura 59: Efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la migración celular a las 6 horas. Los resultados están expresados como distancia migrada por las células en micrómetros	113
Figura 60: Efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la migración celular a las 24 horas. Los resultados están expresados como distancia migrada por las células en micrómetros	113



RESUMEN

Justificación: El carcinoma oral de las células escamosas (COCE) es el cáncer más común de cabeza y cuello. La extirpación quirúrgica es el tratamiento de referencia, junto a la quimioterapia y radioterapia, en combinación con la cirugía. Pese a los avances conseguidos, estos tratamientos aumentan de manera substancial los efectos adversos. En estudios recientes, se han usado distintos extractos y fitoquímicos para explotar su acción adyuvante terapéutica, con el objetivo de reducir los efectos adversos de los tratamientos convencionales.

Objetivo: Búsqueda de agentes noveles como adyuvantes para el tratamiento del cáncer oral y sus complicaciones.

Métodos: Realizamos ensayos de migración, viabilidad, ciclo celular y apoptosis sobre la línea de cáncer oral escamoso PE/CA-PJ15 tras el tratamiento con los agentes antirresortivos epigalo-3-catequingalato (EGCG), diosgenina (DG) y ácido zoledrónico (ZA). Evaluamos la efectividad de la combinación del 5-Fluorouracilo (5-FU) con EGCG y radiación (0,2.5 y 5 Gy), mediante ensayos de viabilidad, migración y ciclo celular en las líneas PE/CA-PJ15 y H357 de cáncer oral escamoso. Por último, estudiamos el efecto del ZA y los efectos protectores de la combinación de ZA con EGCG mediante pruebas de viabilidad, mineralización, deposición de colágeno y migración en células con fenotipo de osteoblasto SAOS-2.

Resultados: Dosis de 100 μ M de DG o ZA redujeron la viabilidad ($p < 0.01$) y estimularon la apoptosis. ZA, DG y EGCG redujeron la migración celular y alteraron el ciclo celular, cada uno en una fase distinta. La combinación de 5-FU+EGCG redujo la viabilidad celular y la migración celular en mayor medida que el 5-FU sólo. La adición de EGCG modificó el ciclo celular aumentando la fase G2/M mientras que 5-FU secuestraba la fase S del ciclo celular. La exposición de las células a 5 Gy de radiación disminuye el efecto de la combinación con EGCG. Por último, dosis micromolares (1 y 5 μ M) de ZA redujeron la viabilidad celular ($p < 0.001$), migración ($p < 0.001$) y síntesis de colágeno ($p < 0.001$), mientras que la dosis nanomolar (0.1 μ M) no produjo ningún efecto. La adición de EGCG tuvo un efecto protector revirtiendo parcialmente la inhibición producida por ZA, incluso aumentando la mineralización ($p < 0.001$).

Conclusiones: DG y ZA fueron capaces de reducir la viabilidad, incrementar la apoptosis, modificar el ciclo y reducir la migración celular, mientras que EGCG fue capaz únicamente de modificar el ciclo celular y reducir la migración, por lo tanto los tres agentes testados presentan un potencial efecto quimioterapéutico en el cáncer oral. La combinación de 5-FU con EGCG redujo la viabilidad, migración y alterar el ciclo celular en mayor medida que el 5-FU sólo, principalmente sin radiación o a 2.5 Gy, ya que el aumento de radiación desvanecía el efecto de EGCG. ZA produce efectos negativos sobre la viabilidad, mineralización, deposición colágeno y migración de los osteoblastos a nivel micromolar. Mientras, la adición de EGCG pudo revertir parte de los efectos inhibitorios del ZA. Por ello, la administración conjunta podría reducir los efectos adversos producidos por el tratamiento. Los resultados obtenidos muestran posibles terapias adyuvantes en el tratamiento del cáncer oral, pero han de ser estudiadas *in vivo* para poder confirmar estos hallazgos.



ABSTRACT

Background: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most frequent head and neck cancer. It can frequently invade bone from the mandible causing severe bone destruction, thus presenting problems not only in function but also in prognosis. Surgical excision is the benchmark treatment for OSCC patients, but it is not effective in the advanced phases of the disease. Other options are chemotherapy and radiotherapy in combination with surgery, although the mortality ratio is approximately 50% after 5 years, due to the difficulty of preventing metastasis and reappearance of the tumor. In high-risk patients, recurrent post-operative chemotherapy and radiotherapy increase patients' survival rates, although this combined treatment substantially increases adverse effects that can include oral mucositis, xerostomy, infection, loss of taste, osteoradionecrosis, fatigue, diarrhea, loss of hearing, anemia, nausea, and other problems.

Zoledronic acid (ZA; 2-(Imidazol-1-yl)-1-hydroxyethane-1,1-diphosphonic Acid) belongs to a group of agents denominated bisphosphonates, which are pyrophosphate analogues. It acts on the bone remodeling process as a powerful antiresorptive agent, due to its osteoclast-inhibiting action. Despite Zoledronic acid has been widely used to avoid bone metastasis, in numerous cases it has shown serious adverse effects such as osteonecrosis of the jaw. Therefore, adverse effects in the management of oral cancer are a serious obstacle in order to improve the quality of life of patients under treatment.

On the other hand, in recent studies, different plant extracts and phytochemicals have been used to explore their potential action as adjuvants in cancer therapy, with the purpose of decreasing the adverse effects of conventional treatment without losing efficacy. Diosgenin (DG; 3-hydroxy-5-spirostene) is a steroidal saponin found in numerous plants, such as Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). It has proven several chemotherapeutic properties on different studies, such as reducing cell viability with cell cycle arrest and boosting apoptosis on different squamous cell carcinoma lines, as well as presenting antiresorptive properties. Polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) represents the major catechin found in green tea (*Camellia sinensis*). EGCG, exhibits a wide variety of properties that may offer health benefits such as antioxidant, anti-inflammatory and bone regulating activities. It has also shown to have different chemotherapeutic effects. However, the effect of this substances on oral cancer still remain unclear.

Objectives: There are three main objectives in this study. The first objective is to measure the potential chemotherapeutic effects of the antiresorptive drugs zoledronic acid, diosgenin and epigallocatechin-3-gallate on PE/CA-PJ15 oral cancer cells. The second objective consists in evaluating the effects of the combination of 5-Fluorouracil (5-FU) with EGCG and radiotherapy on PE/CA-PJ15 and H357 oral cancer cells. The third objective of this study was to assess the effect of zoledronic acid on osteoblast cells and whether the combination of zoledronic acid with EGCG could reduce ZA's damage on SAOS-2 osteoblast-like cells.

Methods: Cell viability, migration, apoptosis and cell cycle evaluation assays were performed in order to measure the effects of different doses (5-100 μ M) of the antiresorptive drugs diosgenin, zoledronic acid and EGCG on the PE/CA-PJ15 oral cancer cell line. Cell viability, migration and cell cycle were assayed in H357 and PE/CA-PJ15 oral cancer cell lines treated with 5-Fluorouracil (5-FU)



alone or in combination with EGCG and radiation (0, 2.5 and 5 Gy) to evaluate the effectiveness of the combination of 5-FU and EGCG. Lastly, we studied the effect of ZA and the protective effects of the combination of ZA with EGCG on SAOS-2 osteoblast-like cells, assaying cell viability, mineralization, collagen synthesis and migration.

Results: On our first study we performed cell viability, migration, apoptosis and cell cycle evaluation assays on the PE/CA-P15 cell line and obtained the following results: Zoledronic's acid action on cell viability was time-dependent but not dose-dependent until 72 hours, when the most noticeable effects were observed: cell viability was reduced with statistically significant differences in comparison with the control group for all doses assayed at 72 hours, the 100 μ M dose being the most effective ($p < 0.001$). ZA boosted apoptosis of PE/CA-PJ15 cells in a dose dependent manner at 48 and 72 hours, but not at 24 hours, with major differences in comparison with the other tested substances. 50 and 100 μ M doses reduced cell migration at 4 and 8 hours and prolonged the cell cycle on phase S. Regarding diosgenin's action on cell viability, it had a dose-dependent action, causing a significant reduction in comparison with the control group after 24 hours, especially at 50 and 100 μ M doses ($p < 0.001$). The most powerful effects were seen with the 100 μ M dose at 72 hours ($p < 0.001$). At 5 μ M, viability increased at all times, although only the 24-h time was statistically significant ($p < 0.01$). Diosgenin enhanced apoptosis at all times tested in a dose-dependent manner, while only 50 μ M DG could reduce migration at 4 and 8 hours tested ($p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively). Diosgenin boosted the G2/M phase to the detriment of the S phase, this being a time-dependent effect, although statistical significance was reached only at the 25 μ M dose at 24 hours ($p < 0.05$). EGCG did not reduce cell viability nor boost apoptosis, but it could reduce cell migration and arrest the cell cycle on phase G0/G1.

On our second study, where we evaluated the combination of 5-FU with EGCG and radiation measuring cell viability, migration and changes in the cell cycle, we had the following results: At most doses, 5-FU alone and in combination with EGCG reduced cell viability in both cell lines in comparison with control samples. For the H357 cell line, it was seen that higher doses of radiation produced smaller decreases in cell viability with 5-FU and 5-FU+E. At 2.5 Gy and over, the addition of EGCG to 5-FU produced less synergy, whereby the addition or not of EGCG did not produce significant differences. 0 Gy produced the greatest reduction in cell viability in comparison with control samples, with the 200 μ M dose of 5-FU+EGCG ($p < 0.001$); this radiation dose also showed more contrast between 5-FU and 5-FU+EGCG, at doses of 3.12, 12.5 100 and 200 μ M ($p < 0.05$). For the PE/CA cell line, 2.5 Gy produced the greatest differences between 5-FU and 5-FU+E, at doses of 6.25 μ M ($p < 0.05$), 12.5 μ M ($p < 0.05$), 25 μ M ($p < 0.001$), 50 μ M ($p < 0.001$), 100 μ M ($p < 0.001$) and 200 μ M ($p < 0.01$). At 5 Gy, the addition of EGCG had less effect, with significant differences produced by 5-FU+EGCG at doses of 25-200 μ M between the three radiation doses ($p < 0.05$). The dose that produced the greatest reduction in cell viability was 200 μ M 5-FU+EGCG ($p < 0.001$) at 0 Gy. For both cell lines, 5-FU and 5-FU+EGCG reduced cell migration in comparison with control samples. Variations in dose repeated the same pattern as in the cell viability assay, so that 5-FU reduced migration and the addition of EGCG produced a synergy that boosted this effect. Differences between 5-FU and 5-FU+EGCG were significant in both cell lines at 0 and 2.5 Gy; when EGCG was added to the same dose of 5-FU significant decreases in cell migration were produced in



comparison with the same dose without EGCG. At 5 Gy, the efficacy of EGCG decreased, as were the differences between the same doses of 5-FU with and without EGCG. The greatest reductions in migration were seen with 0 Gy, and 50 μM 5-FU+EGCG after 10 hours in the H357 line ($p < 0.001$) and the same dose after 5 hours in the PE/CA cell line ($p < 0.001$). Finally, both 5-FU and 5-FU+EGCG modified the cell cycle of both cell lines in comparison with control samples. In the H357 cell line, the addition of 5-FU and 5-FU+E reduced the G0/G1 phase in comparison with control samples at all radiation doses. Numbers of cells in the G2/M phase increased with the addition of EGCG, also increasing as radiation doses increased. Lastly, 5-FU increased the number of cells in the S phase. Most of the cells were found to be in this phase in all experiments. The greatest contrasts between 5-FU and 5-FU+EGCG were seen at 2.5 Gy, at doses of 25 μM in the G2/M and S phases ($p < 0.01$) and 50 μM in the G0/G1 and S phases ($p < 0.05$), and in the G2/M phase ($p < 0.01$).

On our last study, we evaluated the effect of ZA and ZA+EGCG on SAOS-2 osteoblast-like cells, assaying cell viability, mineralization, collagen synthesis and migration, from which we obtained the following results: All EGCG doses stimulated cell viability, the 10 μM dose showing the maximum effect of all doses tested ($p < 0.001$). On the basis of this finding, the 10 μM dose was used (in combination with ZA) in subsequent assays. With regard to ZA, while nanomolar doses (0.01-0.1 μM) did not appear to produce any effect, it was found that over and above a dose of 1 μM ZA did significantly reduce cell viability in a dose-dependent manner ($p < 0.001$). It was also observed that with higher doses of ZA in combination with 10 μM EGCG, cell viability increased in comparison with cells treated with ZA alone ($p < 0.001$), while lower (nanomolar) doses of ZA did not produce any effect on viability. The addition of ZA altered the mineralization of SAOS-2 cells. After 7 days of induced mineralization, this was abruptly inhibited when doses of 1 or 5 μM of ZA were added, slightly reversing ZA's inhibition of mineralization with the addition of 10 μM EGCG to 5 μM ZA ($p < 0.001$). ZA 0.1 μM did not produce any significant difference in comparison with control samples, nor was any effect produced by the addition of EGCG to this dose of ZA. After 14 days, it was found that the 1 and 5 μM doses of ZA continued to reduce the formation of calcium nodules ($p < 0.001$). When EGCG was added to 1 μM ZA, it partly reversed this inhibition effect ($p < 0.001$). For 0.1 μM dose of ZA, the value obtained was similar to the control sample, and when EGCG was added, mineralization increased significantly in comparison with the control sample ($p < 0.001$) and the same dose without EGCG ($p < 0.05$). Doses of 1 and 5 μM ZA decreased collagen deposition dose-dependently after 7 and 14 days of treatment ($p < 0.001$). While ZA 0.1 μM concentration at 7 days had no effect in comparison with control samples, keeping the same dose at 14 days slightly stimulated collagen synthesis. After 7 days exposure, the addition of EGCG appeared to partially reverse the inhibition of collagen synthesis for doses of 1 ($p < 0.05$) and 5 μM ($p < 0.001$), while after 14 days this effect only occurred with the 1 μM dose ($p < 0.001$). Treatment with ZA produced a decrease in cell migration compared with control samples at both assay times, an effect that increased as the dose and time increased, 5 μM ZA after 24 hours being the dose that reduced migration the most ($p < 0.001$). The addition of EGCG reversed this effect notably and increased migration distances in comparison with the same ZA dose without EGCG at all dose and time measured, except for 0.1 μM at 6 hours. This EGCG migration-stimulating effect was more evident at higher concentrations, with greater migration distances of 5 μM ZA + EGCG at 6 hours in comparison with control samples ($p < 0.01$) and the same dose without EGCG ($p < 0.001$).



Conclusions: Diosgenin and zoledronic acid were able to decrease viability, boost apoptosis, modify the cell cycle and reduce migration, whereas EGCG only modified the cell cycle and decreased migration: therefore, these compounds display potential chemotherapeutic effects on oral cancer. The combination of EGCG and 5-FU reduced cell viability and migration and altered the cell cycle to a greater extent than 5-FU alone, mainly without radiation or at 2.5 Gy, as an increase in radiation dose decreased EGCG's effect. ZA at micromolar doses produced negative effects on osteoblast-like cells at all parameters measured, while at nanomolar levels, ZA only affected cell migration. The addition of EGCG partly reversed the effects produced by ZA, thus the joint application of both could reduce the adverse effects produced by conventional treatment. The obtained results show possible promising adjuvant therapies on the treatment of oral cancer. However, these results must be studied in further depth in order to be confirmed.

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer oral

1.1.1 Generalidades y epidemiología

El cáncer es una enfermedad que crece exponencialmente y por tanto es una amenaza global a la salud pública. Según las últimas cifras que arroja la IARC (agencia internacional para la investigación del cáncer), el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer. Las previsiones para el futuro no son ni mucho menos esperanzadoras, pues se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas (1).

El cáncer oral pertenece al grupo de cánceres de cabeza y cuello siendo el noveno tipo de cáncer más común en el mundo (2). La incidencia mundial anual estimada es alrededor de 275.000 casos de cáncer oral, con una gran disparidad geográfica, ocurriendo dos tercios de los casos en países en vías de desarrollo. Las zonas con mayor incidencia de cáncer oral son el sur y sureste asiático (Taiwán, Pakistán, India y Sri Lanka), regiones de Latinoamérica y el caribe (Uruguay, Puerto Rico y Brasil), regiones del pacífico (Papua Nueva Guinea, Melanesia) y parte de Europa del este y occidental (Hungría, Eslovaquia , Eslovenia y Francia). En países como Bangladesh, el cáncer oral es el tipo de cáncer más frecuente en hombres, llegando hasta un 25% de los casos totales de cáncer diagnosticados (3).

Dentro de Europa, Francia tiene las mayores tasas de incidencia, con alrededor de 15.500 cánceres de labio, cavidad oral y faringe diagnosticados cada año, siendo un 5.5% de la incidencia de cáncer en el país (3). En España, el número estimado de casos en 2015 fue de 6670, apareciendo mayoritariamente en varones (4980 casos, alrededor del 3% del total de hombres pacientes con cáncer) mientras que en la mujer fue de 1690 casos, inferior al 2% de los cánceres diagnosticados en mujeres en el país (4).



1.1.2 Cáncer oral de células escamosas

Con un 90%, el tipo de cáncer oral más común es el grupo de carcinoma de células escamosas (CCS). El carcinoma oral de células escamosas (COCE) surge del epitelio de la mucosa del tracto aero-digestivo superior, en su mayoría en el labio o la cavidad oral (2,5). En un gran número de casos, se desarrollan metástasis locales en los nódulos linfáticos y con el paso del tiempo, metástasis a distancia.

1.1.3 Etiología y factores de riesgo

En el COCE, como en la mayoría de los cánceres, no se conoce un mecanismo único que conlleve su aparición, ya que es una enfermedad multifactorial, en el que la suma de distintos factores de riesgo puede conllevar a desarrollar la enfermedad. Entre estos factores de riesgo, hay algunos que pueden ser modificables y otros que no pueden ser modificados.

La célula de origen del COCE es el queratinocito oral, en el cual de forma espontánea o inducida por mûgatenos, se produce una modificación del ADN (ácido desoxirribonucleico). Posteriormente, los efectos que tengan los factores de riesgo sobre los individuos dependerán de los mecanismos de protección que tenga el organismo frente al daño en el ADN: la variabilidad en las enzimas encargadas de metabolizar los xenobióticos, la capacidad de reparar el ADN así como de otros mecanismos de protectores frente al posible daño celular (6). Por lo tanto, los factores de riesgo se caracterizan por su capacidad de aumentar el número de mutaciones.

Las lesiones orales potencialmente malignas son , leucoplasia, eritoplasia, liquen plano oral y fibrosis oral submucosa (7).

Entre los factores de riesgo, los que más peso tienen son fundamentalmente el tabaco y el alcohol; ambos factores actúan sinérgicamente. En un estudio de Petty y cols (8) , 25 % de los cánceres orales son atribuibles al consumo de tabaco, 7-19 % al consumo de alcohol y 10-15% debido a una déficit de micronutrientes. En zonas donde el consumo de betel es de alta prevalencia, el porcentaje puede llegar hasta el 50%. Aquí enumeramos los distintos factores de riesgo, ilustrados en la figura 1:

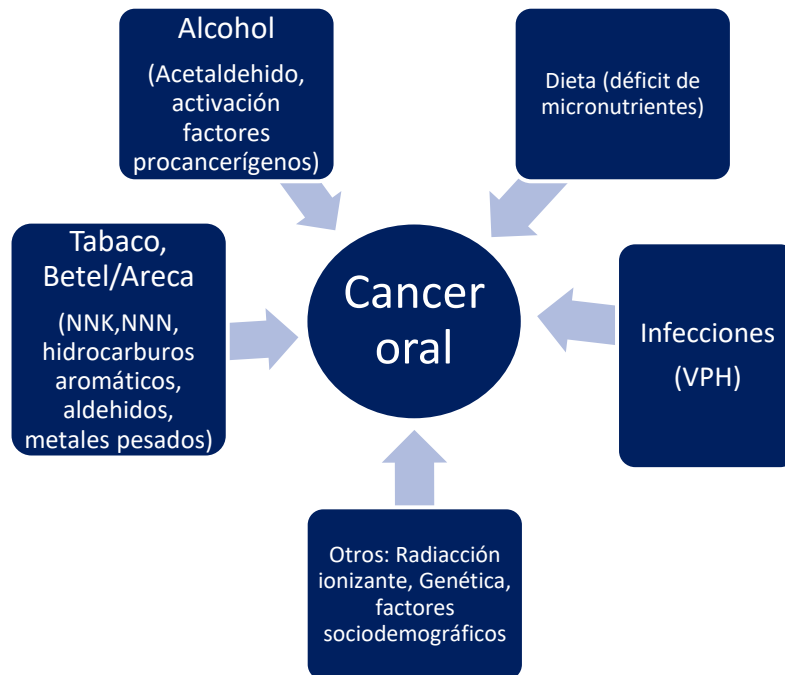


- **Tabaco:** el tabaco es de lejos el mayor factor de riesgo para el desarrollo del COCE. El humo del tabaco contiene gran diversidad de carcinógenos, entre los que figuran las nitrosaminas específicas del tabaco 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridilo)-1-butanona (NNK) y N-nitrososornicotina (NNN); hidrocarburos aromáticos policíclicos como el benzopireno y bezantraceno; aldehídos y aminas aromáticas; metales pesados como el plomo o el arsénico; así como la liberación de numerosos radicales libres, induciendo un estrés oxidativo (9). El riesgo es proporcional a la cantidad de cigarrillos fumados por día y al tiempo de exposición al tabaco. Por lo tanto, los fumadores poseen un riesgo de 2 a 13 veces más alto que un no fumador a la hora de desarrollar un cáncer oral (10). También el consumo de tabaco no fumado aumenta el riesgo de padecer este tipo de cáncer (7). El consumo en países asiáticos de sustancias como Betel, Areca y bidi está relacionado con un aumento del cáncer oral, independientemente de que este mezclado con tabaco, sean o no fumadores (8,11–14), posiblemente debido a su composición de alcaloides, nitrosaminas y otros compuestos que pueden hacer la mucosa oral sensible a varias infecciones virales y microbianas, desencadenando el proceso de carcinogénesis (15,16).
- **Alcohol:** El rol del alcohol (etanol) en el desarrollo del cáncer oral es controvertido. Por un lado, es complicado investigar los efectos del alcohol por sí solo, ya que suele ir asociado a fumar. Sin embargo, se ha podido observar como el cese del consumo de alcohol reduce en un 40% el riesgo de padecer un carcinoma de cabeza y cuello tras 20 años de abandono del hábito (17). Otro estudio relacionó el aumento de la incidencia del cáncer oral (especialmente individuos jóvenes) con el consumo de alcohol (18). El mecanismo más importante por el que el etanol es cancerígeno surge de su metabolización. El etanol es transformado por las alcohol deshidrogenasas en acetaldehído, un reconocido carcinógeno (19). El consumo de tabaco aumenta el efecto del acetaldehído tras la ingesta de alcohol y el consumo de alcohol aumenta a su vez la activación de procarcinógenos presentes en el tabaco, inducido por la biotransformación microsomal en la mucosa e hígado de la enzima citocromo P450 (20).
- **Dieta:** La relación de la dieta respecto al cáncer oral y otro tipo de cánceres ha sido ampliamente analizada con distintos estudios epidemiológicos, en los que se observa el



rol importante de una alimentación correcta. Actúa tanto como factor de riesgo como factor protector. En uno de estos estudios, se observó una relación inversa entre el riesgo de padecer cáncer oral y el consumo de frutas y verduras (21). Éste efecto protector puede ser debido a los compuestos hallados en éstos (fitoquímicos) como los polifenoles, saponinas, estilbenos, vitaminas y micronutrientes. El mecanismo por el que pueden reducir el riesgo depende de la naturaleza del compuesto pero puede ser debido al carácter antioxidante de estas sustancia protegiendo a la mucosa oral frente al daño oxidativo (22). Además el consumo de frutas y verduras suele estar asociado con una mejor dieta y por tanto un mejor estado nutricional. Incluso con un gran consumo de alcohol o tabaco, una ingesta alta de verduras y frutas podría prevenir el desarrollo de alrededor de un 50% casos de COCE (23). Por otro lado, el déficit de micronutrientes está asociado a un mayor riesgo de desarrollo del cáncer oral (8).

- **Infecciones:** Varios micro-organismos orales (bacterias, cándida) pueden producir acetaldehído carcinogénico a partir del alcohol (24). Sin embargo no hay estudios en el que el control de las infecciones por estos organismo aumente la incidencia de cáncer oral (8). El VPH (Virus del Papiloma Humano) –principalmente los genotipos 16 y 18 – también es considerado como un factor carcinogénico en la cavidad oral y es responsable de la infección del epitelio escamoso y de la generación de lesiones (25).
- **Otros:** factores ambientales, como la radiación ionizante de los rayos ultravioleta del sol o por fuentes terapéuticas o accidentes nucleares, pueden contribuir a aumentar el riesgo(8). Un meta-análisis asoció un estatus social y económico bajo con un riesgo aumentando de padecer cáncer oral (26).Varios condicionantes genéticos también podrían aumentar el riesgo de incidencia (19).

**Fig.1: Factores de riesgo predominantes en el desarrollo del cáncer oral**

1.1.4 Caracterización histológica

Desde el punto de vista histológico, la mayoría de los cánceres orales son carcinomas de células escamosas (2).

En función del tejido del que derivan encontramos (27):

a) Tumores malignos derivados del epitelio:

- Carcinoma oral de células escamosas (90%).
- Carcinoma verrugoso.
- Carcinoma de células fusiformes.
- Melanoma.
- Adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide.
- Carcinoma basocelular.



b) Tumores malignos derivados del tejido conectivo.

En función de las células conectivas de las que derivan se dividen en:

- Fibrosarcoma
- Fibrohistocitoma maligno
- Liposarcoma
- Angiosarcoma
- Neurosarcoma
- Rabdomyosarcomas
- Leiomyosarcomas

c) Metástasis en las partes blandas de la cavidad

Son poco frecuentes en la mucosa oral, ya que de todas las neoplasias del organismo sólo un 1% metastatizan en mucosa oral, el 90% en huesos maxilares y el 10% en partes blandas. Los tumores primarios suelen localizarse en pulmón, riñón e hígado.

d) Neoplasias del sistema inmune con afectación oral:

- Linfoma No Hodgkin
- Plasmocitoma-mieloma múltiple

1.1.5 Aspectos clínicos

Para realizar una evaluación clínica de un paciente con sospecha de cáncer oral, es fundamental una historia clínica con una anamnesis completa, seguida de una exploración física. En relación con los signos y síntomas iniciales del carcinoma intraoral, el motivo de consulta más frecuente suele ser la úlcera indolora. Aproximadamente un 50% de los carcinomas células escamosas se desarrollan sobre un epitelio previamente alterado; sobre lesiones de leucoplasia o eritoplasia (28,29).

La forma clínica de presentación es variable, pudiendo encontrar:

- Morfología endofítica: presentan un área central deprimida, de forma irregular, ulcerada, rodeada de un borde revertido de mucosa normal, roja o blanca, que resulta de la invasión del tumor hacia abajo y lateralmente en el epitelio adyacente, siendo ésta su presentación más típica apareciendo como una úlcera irregular con bordes evertidos y fondo sucio.

- Morfología exofítica: de crecimiento tumoral irregular vegetante y exofítico de forma e indurada a la palpación.
- Tipo mixto: formado por asociación de las dos formas anteriores. La superficie puede estar con frecuencia ulcerada y presenta induración a la palpación, pudiendo aparecer también en forma de lesiones mixtas endofíticas y exofíticas.

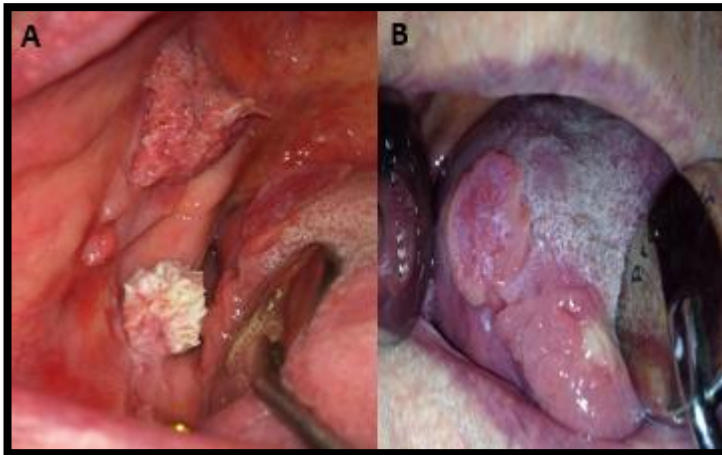


Fig.2 (A) carcinoma verrucoso en mucosa yugal (B) Carcinoma oral de células escamosas (COCE) en el borde lateral de la lengua

La palpación del cuello es un componente imprescindible para la estadificación del cáncer de la cavidad oral, porque revela la localización y la extensión de las adenopatías. Cuanto mayor es el tumor primario y más larga su evolución, mayor es la probabilidad de que presente afectación de los ganglios linfáticos cervicales. Sin embargo, tumores pequeños y de corta evolución también pueden producir metástasis ganglionares. En ocasiones, la presencia de una metástasis en un ganglio cervical, puede ser el primer síntoma de un COCE de la cavidad oral, siendo esto más frecuente en tumores primarios de hipofaringe o nasofaringe (28).

Con el tiempo invade y destruye estructuras vecinas, como músculo, hueso o glándulas salivales. Este proceso de crecimiento y de invasión se desarrolla generalmente durante varios meses, desde un tumor localizado de pocos milímetros, hasta una masa de importantes dimensiones que destruye estructuras vecinas. Durante este período de crecimiento localizado, el tumor produce metástasis en los ganglios linfáticos cervicales, generalmente en los más próximos al drenaje linfático del tumor primario, extendiéndose progresivamente a otros ganglios linfáticos más alejados y rompiendo los límites anatómicos de dichos ganglios, afectando a las estructuras anatómicas del cuello (29).



El tumor puede frecuentemente invadir el tejido óseo de la mandíbula, causando gran destrucción ósea, por lo tanto presentando problemas no solo en la funcionalidad del paciente sino también en la prognosis (30,31). Durante la resorción ósea, los osteoclastos locales erosionan el hueso, permitiendo a las células tumorales invadir el tejido adyacente.

La duración de los síntomas y la rapidez de crecimiento pueden indicar la agresividad del tumor. La hiperestesia puede indicar la afección perineural, mientras que la otalgia indica afección del nervio lingual o del dentario inferior. Los síntomas sistémicos incluyen anorexia, pérdida de peso, debilidad y fatiga, sobre todo en caso de tumores avanzados(27–29).

1.1.6 Diagnóstico y Estadíaje

Para llevar a cabo un buen diagnóstico se debe realizar la descripción clínica que indique la apariencia, tamaño, espesor, histopatología, localización, afección de estructuras estratégicas adyacentes, alteraciones morfológicas y funcionales locales, niveles ganglionares afectados, clasificación TNM y estadificación, diagnósticos de enfermedades intercurrentes y estado general del paciente (28).

La exploración oral convencional (examen visual y palpación) constituye el criterio de referencia en los estudios sobre cribado de cáncer y precáncer oral. La referencia la constituye la biopsia; esta prueba es imprescindible para obtener un diagnóstico.

El estadíaje de la enfermedad en el momento del diagnóstico es el factor predictivo importante en el pronóstico de la misma. El TNM está basado en el AJCC (American Joint Committee on Cancer) (32). Las definiciones para el estadíaje del tumor primario (T), basadas en el tamaño tumoral, son uniformes para las localizaciones del labio, del resto de la cavidad oral y la orofaringe. En general, los estadios I y II de la enfermedad son tumores relativamente pequeños y sin afectación ganglionar. Los estadios III y IV son tumores de gran tamaño, que pueden invadir las estructuras adyacentes y/o tienen afectación ganglionar regional (33).



Tabla 1: Estadíaje clínico. (T) Extensión del tumor primario; (N) Ausencia o presencia de afectación de ganglios linfáticos regionales; (M) Ausencia o presencia de metástasis a distancia

Estadio			
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T1,T2	N1	M0
	T3	N0,N1	M0
Estadio IVA (labio)	T1,T2,T3	N2	M0
	T4a	N0,N1,N2	M0
Estadio IVB (cavidad oral)	Cualquier T	N3	M0
	T4b	Cualquier N	M0
Estadio IVC (labio y cavidad oral)	Cualquier T	Cualquier N	M1

El pronóstico depende de diversos factores como son: la clínica, la localización, el grado histológico, la presencia o no de metástasis y la clasificación TNM. Pero hay que considerar que el pronóstico también depende de factores relacionados directamente con el paciente: edad, sexo, condición general y parámetros inmunológicos.

Las tasas de curación dependen en general del estadio de detección del mismo. Esto es importante, porque tiene una influencia significativa sobre el plan de tratamiento y el pronóstico del mismo. Los pacientes con carcinomas bucales de células escamosas tienen una tasa de supervivencia del 80% en estadios iniciales dentro de los 5 años, del 40% en neoplasias con afectación regional, y menos del 20% en metástasis a distancia (34,35).

1.1.7 Prevención

La prevención está orientada a reducir la incidencia de la enfermedad. Así, la detección precoz y el reducir los factores de riesgo constituyen la mejor política de salud encaminada a reducir la morbi-mortalidad por cáncer oral (27).



Prevención primaria (promoción de un estilo de vida saludable)

La etiología del cáncer oral es multifactorial, siendo los factores de riesgo más importantes el tabaco y el consumo de alcohol; son muchos los factores relacionados con el estilo de vida, pero el medio ambiente y la genética también juegan un papel importante. Por lo tanto, muchos de los cánceres orales podrían prevenirse mediante un cambio en el estilo de vida (3,8).

Prevención secundaria

Se refiere a la detección de la enfermedad en una etapa precoz de su historia natural. La detección precoz en estadios asintomáticos garantiza no sólo un aumento en las tasas de supervivencia, sino también una mejor calidad de vida, como consecuencia de tratamientos menos agresivos y mutilantes. Por ello, un examen sistemático de la mucosa oral debe formar parte de todo examen dental rutinario (27,36).

El retraso diagnóstico se puede deber tanto al paciente, como al profesional y también a la accesibilidad al sistema de salud. Entre las causas del retraso profesional se incluyen el examen clínico deficiente, signos clínicos no específicos, un bajo índice de sospecha, la falta de familiaridad y experiencia con la enfermedad, y la presencia de comorbilidades.

Prevención Terciaria

Persigue prevenir la aparición de recidivas así como reducir la morbilidad terapéutica, mejorando la calidad de vida.

1.1.8 Tratamiento

La finalidad del tratamiento de los tumores de cabeza y cuello consiste en erradicar el tumor, manteniendo una adecuada función fisiológica e intentando conseguir una buena calidad de vida. Se trata de tumores muy estigmatizantes por las secuelas físicas de los tratamientos. Existen tres opciones principales de tratamiento contra el cáncer oral: cirugía, radioterapia y quimioterapia (37).

El tratamiento del cáncer de la cavidad oral es complejo y multidisciplinar. El objetivo del tratamiento quirúrgico es lograr el control locorregional del tumor y la supervivencia del paciente, junto con el mínimo de daños funcionales y/o estéticos. Los avances en el tratamiento se han enfocado, en la enfermedad local o localmente avanzada resecable e irresecable y en la enfermedad recurrente/metastásica (37).



Si bien el principal objetivo de un tratamiento es curar, eliminando el tumor, también es muy importante preservar la función de los nervios, órganos y tejidos cercanos, así como restaurar la morfología y la función del órgano perdido, minimizar las secuelas y prevenir la aparición de una recidiva o un nuevo tumor primario.

Las opciones y recomendaciones en cuanto a los tratamientos dependen de varios factores, entre ellos, el tipo y estadio del cáncer, los efectos secundarios posibles así como las preferencias del paciente y su estado de salud general (38,39).

En general, los pacientes con cáncer de cabeza y cuello en etapas tempranas se tratan con una sola modalidad, ya sea radioterapia o cirugía. Los pacientes con un cáncer más extendido se tratan a menudo con quimioterapia y radioterapia concurrentes. A veces, según el escenario clínico, los pacientes se tratan con cirugía seguida de radioterapia y quimioterapia postoperatorias. Los progresos en las técnicas quirúrgicas y en la administración de la radiación, así como el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos, han producido notables avances en el tratamiento de estos tumores, pero en muchas ocasiones este aumento ha sido a costa de una importante toxicidad (40).

La cirugía puede ocasionar mutilaciones que impiden una correcta alimentación, existiendo riesgo de aspiración hacia el aparato respiratorio con posibilidad de infecciones graves. Las radiaciones causan una inflamación transitoria de la mucosa del tracto aerodigestivo, lo que también dificulta la alimentación y también pueden producirse episodios de disnea, que precisan un tratamiento inmediato.

En el empleo de la radioterapia, deben considerarse parámetros técnicos tales como dosis total, dosis por fracción, tipo de haz de radiación empleado, utilización de bolus, y tamaño del área tratada, ya que tienen impacto sobre los resultados. Actualmente, la radioterapia se usa como único tratamiento del cáncer o en combinación con cirugía, quimioterapia o ambas. Se puede usar como tratamiento previo a la cirugía, posterior a la cirugía o bien como tratamiento único (38,41,42).

El papel de la quimioterapia en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello ha sido controvertido y limitado. La pauta del tratamiento quimioterapéutico, se lleva a cabo mediante combinaciones de agentes frente al tratamiento único, buscando un efecto sinérgico de los fármacos a la vez que la disminución de los efectos adversos. Existen diversas formas de administrar la quimioterapia (27):



- Quimioterapia neoadyuvante o de inducción: Es la que se administra antes de un tratamiento quirúrgico o radioterápico. Disminuye el estadio tumoral y es un factor pronóstico.
- Quimioterapia adyuvante o coadyuvante: Es la que se administra después del tratamiento principal, para disminuir la incidencia de diseminación del cáncer a distancia.
- Quimioterapia concomitante o concurrente: Es la que se administra a la vez junto con la radioterapia para potenciar su efecto, integrando los efectos locorregional y sistémico desde el comienzo. Presenta tasas de respuesta más altas.

Entre los fármacos antineoplásicos usados en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello tenemos metrotexato, bleomicina, cisplatino, carboplatino, 5-fluoruracilo (5-FU), gemcitabina, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y vinblastina. Los fármacos antineoplásicos actúan sobre diversas fases de la cinética celular, bien sobre una o varias fases de la división celular o bien sobre células en reposo, controlando el crecimiento o replicación y/o destruyendo células cancerosas; pero debido a su falta de selectividad, también actúan sobre células normales con una elevada tasa de replicación, causando diversos efectos secundarios que variarán en función de la dosis, ciclos y vías de administración (43).

Gran parte de la investigación se está enfocando en mejorar los resultados de la quimioterapia. Esto incluye encontrar el momento propicio para suministrar estos medicamentos y averiguar cuáles son las combinaciones de medicamentos que funcionan mejor (44). También se están desarrollando nuevos medicamentos de quimioterapia que podrían ser más eficaces contra los tumores cancerosos avanzados de la cavidad oral y de la orofaringe.

Algunos medicamentos que se dirigen al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) pueden ayudar a tratar los tipos de cáncer de la cavidad oral y de la orofaringe. Actualmente se están estudiando otros medicamentos como cetuximab, erlotinib, panitumumab, lapatinib, y gefitinib. Existen en el momento actual numerosos estudios de inmunoterapia sola y en combinación con quimioterapia que aclararán el algoritmo terapéutico en la enfermedad recurrente metastásica (45).



En estudios recientes, se han usado distintos extractos y fitoquímicos para explotar su acción adyuvante quimioterapéutica, con el objetivo de reducir los efectos adversos de los tratamientos, ya que estos compuestos suelen presentar pocos efectos secundarios (46,47).

1.1.8.1 5-Fluorouracilo

5-fluorouracilo es un fármaco indicado para el tratamiento de muchos tumores sólidos, incluyendo los, cánceres colorectales tumores de mama y cáncer de cabeza y cuello. El 5-fluorouracilo es una pirimidina fluorada que pertenece a la clase de los antimetabolitos antineoplásicos, con actividad de amplio espectro; actúa sobre células de rápida proliferación (39,44).

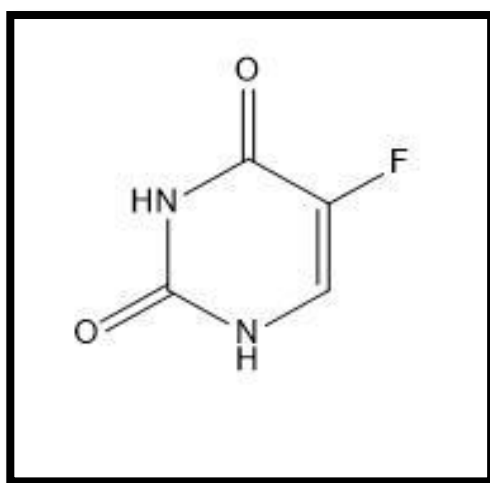


Fig. 3:
estructura
química del
5-
fluorouracilo

La toxicidad y eficacia del 5-FU depende de la forma de administración, siendo muy alta la variabilidad entre pacientes y la vía y forma de administración. Produce mielosupresión, mucositis, vómitos, síndrome pseudogripal y, a dosis altas, neurotoxicidad central(48).

Mecanismo de acción

El 5-FU es un antimetabolito que inhibe la timidilato sintasa , por lo tanto interfiere con la síntesis del ARN (ácido ribonucleico) y del ADN(49):

Efectos sobre el ARN: para incorporarse al ARN, el 5-FU se debe transformar en monofosfato de fluoruracilo, lo que se puede producir de dos maneras: la primera es mediante la transferencia directa de una ribosa desde el fosforibosilpirofosfato al 5-fluoruracilo, transferencia que es catalizada por la acido-orótico-fosforribosiltransferasa. La segunda es la adición de una ribosa al 5-fluorouracilo mediante la uridina-fosforilasa para formar la fluorouridina. Esta experimenta



seguidamente una fosforilización con uridina kinasa para ocasionar el monofosfato de fluoruracilo. Este último experimenta dos fosforilizaciones secuenciales a través de la pirimidina monofosfato kinasa y pirimidina difosfato kinasa, respectivamente. El trifosfato de fluoruracilo es entonces incorporado al RNA, bloqueando la actividad del ADN y su síntesis (49).

Efectos sobre el ADN: 5-FU puede ser transformado en fluorodeoxiuridina mediante la acción de la timidina fosforilasa y luego a fluorodeoxiuridina monofosfato a través de la timidina kinasa. Alternativamente, la fluorodeoxiuridina monofosfato puede formarse indirectamente mediante la conversión de la fluoruridina difosfato a fluorodeoxiuridina difosfato y luego a fluorodeoxiuridina monofosfato. Esta última es capaz de formar un enlace covalente, firme pero reversible con la timidilato sintasa en presencia de metilentetrahidrofolato. La ligazón de la fluorodeoxiuridina monofosfato a la timidina sintasa bloquea la síntesis del timidilato a partir del uracilo. Como el timidilato es el precursor de la timidina trifosfato, uno de los cuatro deoxiribonucleótidos necesarios para la síntesis de ADN, su deficiencia ocasiona la depleción del trifosfato de timidina y, la interrupción de la síntesis de ADN. Además, tanto la fluorodeoxiuridina monofosfato como la fluorodeoxiuridina difosfato pueden ser convertidas a fluorodeoxiuridina que puede ser incorporada al ADN mediante la ADN-polimerasa en lugar de la timidina trifosfato ocasionando un ADN aberrante. Además, cuando se administra en combinación con la leucovorina, los efectos del 5-fluorouracilo son incrementados al estabilizarse el complejo timidilato sintasa-metilentetrahidrofolato-fluorodeoxiuridina (48,49).

Citotoxicidad

Durante las primeras 24 horas de exposición al 5-fluorouracilo, se observa una citotoxicidad en la fase S del ciclo celular, probablemente debida a los efectos del fármaco sobre el DNA. A las 24 horas, la citotoxicidad tiene lugar en la fase G-1, probablemente a consecuencia de la incorporación del 5-fluorouracilo en el RNA. La selectividad del 5-FU hacia las células en división rápida se debe a que las concentraciones de timidilato sintasa son 20 veces mayores en las células en división que en las células no proliferantes (44,48).

La resistencia al 5-FU puede ser debida a una variedad de mecanismos. Se han descrito la reducción o desaparición de la actividad de varias enzimas activantes, la reducción de la biodisponibilidad de algunos cofactores, la competición con sustratos naturales y un aumento de la actividad de las enzimas asociadas con el catabolismo del fármaco. 5-FU no tiene efectos citotóxicos cuando se administra de forma aislada, pero en combinación con el tegafur inhibe la enzima



encargada de catabolizar el 5-FU, que también tiene concentraciones más altas en el tejido tumoral que en el sano (49,50).

Produce mielosupresión y el síndrome palmo-plantar (eritema y descamación dolorosa de manos y pies). Cuando su acción se ve modificada por otros fármacos (como el folinato cálcico), su perfil de toxicidad puede alterarse; la mucositis y la diarrea pueden ser problemas importantes. También puede producir neurotoxicidad central, sobre todo en forma de síndrome cerebeloso. La toxicidad cardiológica es independiente de la dosis. Se utiliza principalmente para el tratamiento adyuvante del cáncer colorrectal, el cáncer gástrico y el de mama (48,50).

Farmacocinética

El 5-FU se puede administrar tópica o parenteralmente. Debido a su absorción digestiva muy baja y variable, este fármaco no se administra por vía oral. Después de la aplicación tópica de 1 gramo de 5-fluorouracilo sobre la piel, se absorbe aproximadamente el 6% de la dosis. El fármaco se distribuye ampliamente por todo el organismo, cruzando la barrera hematoencefálica y produciendo concentraciones significativas en el líquido cefalorraquídeo que se mantienen durante varias horas. También se distribuye en el líquido pleural y ascítico. 5-FU tiene una amplia distribución sistémica, farmacocinética no lineal, su biotransformación depende de enzimas las cuales cada una con variaciones genéticas y dificultad de mantener las concentraciones en la ventana terapéutica(48).

Después de la administración intravenosa de 5-FU, la semi-vida de eliminación es de 16 minutos (entre 8 y 20 minutos) y es dosis-dependiente. A diferencia del fármaco nativo, los nucleótidos intracelulares fluoruridina trifosfato y fluorodeoxiuridina monofosfato tienen semi-vidas muy prolongadas. 5-FU sin alterar y sus metabolitos son eliminados primariamente a través de la bilis y de la orina. Se ha administrado intra-arterialmente mediante infusión en la vena hepática. En estas condiciones, el 19-50% de la dosis experimenta un metabolismo de primer paso y los niveles plasmáticos alcanzados son del 12 al 52% de los que se obtienen con la misma dosis por vía intravenosa (48).

1.1.10 Complicaciones orales del tratamiento

La cavidad oral es muy susceptible a los efectos tóxicos debido a la alta tasa de renovación celular de la mucosa, la microflora compleja y diversa, y el trauma en los tejidos orales durante la función oral normal. El tratamiento puede producir efectos tóxicos inevitables en las células



normales. El recubrimiento mucoso, es el blanco principal de los efectos tóxicos relacionados con el tratamiento a causa de su alta tasa de proliferación celular (51).

Las complicaciones orales aparecen prácticamente en todos los pacientes. La frecuencia con que se presentan las complicaciones orales varía dependiendo de la terapia para el cáncer utilizada (51).

La toxicidad observada en los tumores de cabeza y cuello, es el resultado del daño producido en los tejidos sanos incluidos dentro del volumen de irradiación: glándulas salivares, mucosa oral y faringo-laríngea, piel, hueso, dientes, musculatura y articulación témporo-mandibular. Clínicamente se expresa como mucositis, radiodermatitis, xerostomía (boca seca), disgeusia o ageusia (pérdida total o parcial del gusto), aumento del riesgo de problemas dentales (caries, pérdida de piezas, etc.), osteonecrosis, trismus y alteraciones de la deglución. Muchos de estos síntomas van apareciendo a lo largo del tratamiento, mientras que otros aparecen después del mismo persistiendo en el tiempo (osteoradionecrosis, xerostomía), lo que va a afectar su calidad de vida a largo plazo (41,43,51).

Las complicaciones orales más comunes relacionadas con los tratamientos del cáncer incluyen mucositis, infecciones, disfunción de las glándulas salivales, disfunción del sentido del gusto y dolor y osteonecrosis. Estas complicaciones pueden producir a su vez deshidratación y desnutrición (43,51).

La quimioterapia, al asociarse con la radioterapia, agrava la mucositis radioinducida y añade otros efectos secundarios como la inmunosupresión, que obligan a la hospitalización de los pacientes. Los efectos secundarios al administrar la radioquimioterapia de forma concurrente son más severos y puede ser que también lo sean los tardíos. Los nuevos avances de las técnicas de irradiación, como la Intensidad modulada de dosis, permitirán disminuir las secuelas de los tratamientos. La toxicidad aguda exige un seguimiento estrecho del paciente durante el tratamiento y un completo tratamiento de soporte (39,41,43,51).

Casi todos los pacientes sufren algún grado de mucositis. Su severidad dependerá del volumen de radiación, esquema de aplicación y del uso combinado con quimioterapia. Se describe que la mucositis oral aparece alrededor de las 2 semanas posteriores al inicio de la radioterapia. Dosis de 10-20 Gy (Grey) pueden generar mucositis, aunque los cambios más significativos ocurren cuando la dosis acumulada alcanza 30 Gy (41).



Cada vez se entienden mejor los mecanismos relacionados con las complicaciones orales pero, desafortunadamente, no existen fármacos ni protocolos universales que eviten estos efectos secundarios. Sin embargo, la eliminación de infecciones dentales preexistentes, periodontales y de la mucosa, la instauración de protocolos de higiene oral integrados y la reducción de otros factores que pueden afectar a la integridad de la mucosa oral pueden reducir la frecuencia y severidad de las complicaciones orales en el paciente con cáncer (41–43).

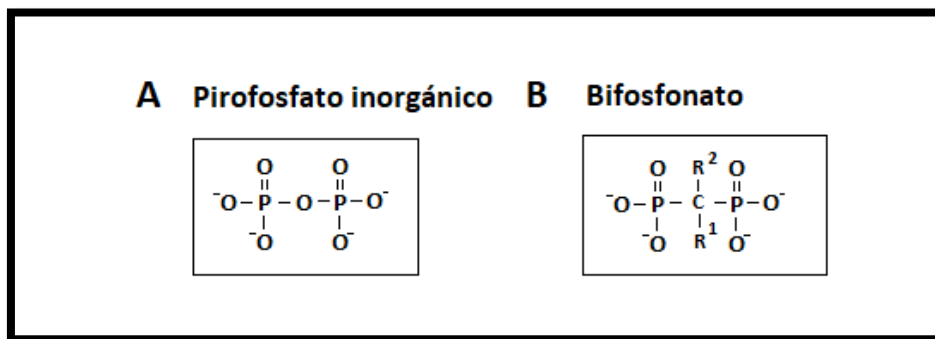


1.2 BIFOSFONATOS

1.2.1 Estructura química y clasificación

Los bifosfonatos (BFs) son un grupo de agentes químicos que han tenido un uso diverso desde su aparición, hace más de 100 años. Son estructuralmente análogos al pirofosfato inorgánico (PPI) (Fig.4) , un compuesto que se halla de forma natural en nuestro organismo(52). El PPI dentro de nuestro organismo es liberado como un sub-producto de numerosas reacciones que ocurren en nuestro organismo y desde hace tiempo se relacionó con el proceso de regulación de la mineralización ósea, debido a la capacidad de inhibir la calcificación uniéndose a los cristales de hidroxiapatita (HA) (52,53).

Fig.4: estructura química del (A) pirofosfato inorgánico y (B) de los bifosfonatos



Los bisfosfonatos están formados químicamente por un átomo central de carbono enlazado a dos grupos fosfato siendo una estructura P-C-P en vez de la P-O-P del PPI. Los bifosfonatos tienen dos grupos radicales en el átomo de carbono, que modifican las propiedades de éste. La estructura P-C-P es lo que provee la gran afinidad por los cristales de HA, mientras que la posición R¹, en la que suele haber unido un grupo hidroxilo, potencia esta afinidad, por lo que todos los bisfosfonatos usados en clínica incluyen este grupo hidroxilo (52,53). Es la posición R² la que determina la potencia del bifosfonato. Por ello se clasifican en dos grupos:

- No nitrogenados: fueron los primeros bifosfonatos descubiertos, considerados de primera generación. A este grupo pertenecen el etidronato, clodronato y tiludronato. Su mecanismo de acción es distinto de los bifosfonatos no nitrogenados. Debido a la similitud de estos compuestos con el PPI, son transformados mediante las aminoacil-tRNA-sintetasa de los osteoclastos en adenosintrifosfato (ATP) no hidrolizable. El osteoclasto es



incapaz de usar el ATP para diversos procesos ATP-dependientes, acumulándose y resultando citotóxico para los osteoclastos, conduciéndolos a la apoptosis (53,54).

- Nitrogenados: llamados bifosfonatos nitrogenados o aminobisfosfonatos (BFs-N), son considerados de 2º y 3º generación y son los utilizados hoy en día en clínica por su mayor afinidad a la HA (55). A este grupo pertenecen el pamidronato, risendronato, ibandronato y el ácido zoledrónico (ZA) y en la cadena R² llevan nitrógeno. La presencia del nitrógeno en la cadena lateral hace que la potencia antirresortiva aumente de 10 a 10.000 veces, respecto a los que no la contienen (53,54,56). El mecanismo de acción es distinto a los de primera generación, ya que inducen la apoptosis de los osteoclastos mediante la unión e inhibición de la enzima farnesil pirofosfato, que se encuentra en la ruta del ácido mevalónico, indispensable en la síntesis del colesterol y otros lípidos necesarios para el metabolismo de la célula (53,56,57).

Tabla 2. Potencia de los BFs para inhibir la reabsorción ósea(53,54,56)

1x	10x	100x	≥100 ≤1000x	≥1000 x ≤10.000x	≥10.000x
Etidronato	Clodronato Tiludronato	Pamidronato Neridronato	Alendronato Incadronato Olpadronato	Ibandronato Risendronato	Zoledrónico

1.2.2 Farmacología y farmacocinética

El mecanismo de acción de los bifosfonatos, como hemos comentado anteriormente, depende de si son nitrogenados o no nitrogenados. Como los utilizados en clínica son los del grupo de los nitrogenados, nos centraremos en este tipo de bifosfonatos.

El mecanismo de acción de todos los BFs-N tiene en común la inhibición de la ruta del mevalonato. Esta ruta es responsable de la formación de lípidos indispensables para el organismo, como son el colesterol y otros esteroides, lípidos isoprenoides como isopentenil pirofosfato (IPP), farnesilpirofosfato (FPP) y geranilgeranildifosfato (GGPP) (54). FPP y GGPP son importantes para el correcto funcionamiento del osteoclasto, ya que se encargan de realizar el proceso de prenilación



de las GTPasas. Este grupo prenilo que se añade mediante una modificación posttranslacional (prenilación), se cree clave para la interacción proteína-proteína y para anclar las proteínas a la membrana celular (58).

Las GTPasas (Ras, Rab, Rho y Rac) son pequeñas proteínas de señalización celular, que cumplen un papel clave en el osteoclasto, regulando procesos celulares como el tráfico de vesículas, apoptosis, cambios en la morfología y organización del citoesqueleto, entre otros (54,59,60).

Por tanto, la inhibición de la ruta mevalónica – eliminando la producción de los metabolitos FPP y GGPP– evita la prenilación de las GTPasas y éstas pierden su función, llevando al osteoclasto a la apoptosis. En estudios más recientes se pudo observar como la inclusión de geranilgeranil pirofosfato (GGPPi) y ácido geranilgeranilo (GGOH) , los cuales son metabolitos que forman parte de la ruta mevalónica, recuperaron parcialmente la osteoclastogenesis que había sido inhibida previamente por acción del ZA (61).

Estos efectos consiguen que se reduzca el remodelado óseo en el organismo como también la mineralización. Por ello han sido utilizados en distintas complicaciones relacionadas con el metabolismo óseo (62–64).

En cuanto a la farmacocinética de los bifosfonatos, se caracterizan por su baja biodisponibilidad tras la administración oral (absorción de menos del 1% de la dosis) debido a su carácter hidrófilo, mientras que mejora mediante la administración intravenosa (IV). Administrado de esa forma se evitan las molestias gastrointestinales, aunque pueden aparecer síntomas similares a un resfriado, con dolor en los huesos, escalofríos y náuseas tras la IV (65) . En el tracto intestinal, atraviesan mediante el transporte paracelular debido a su baja lipofilia (66).

La retención y reabsorción de los BFs en el hueso dependerá de distintos factores endógenos (tasa de remodelado óseo, función renal y disponibilidad de sitios de fijación) y de la potencia del bifosfonato, siendo ZA el que más afinidad tiene por la HA. Solo el 50% del bifosfonato absorbido será retenido en el hueso, mientras que el resto será expulsado mediante la orina sin llegar a ser metabolizado por el cuerpo. Pese a esto, debido a su parecido al PPI, tendrán una alta



afinidad para ser depositados en el hueso, por lo que permite a los BFs alcanzar una alta concentración local en todos los tejidos óseos (53).

La máxima inhibición del remodelado óseo en caso de ingesta oral ocurre tras los 3 meses del tratamiento inicial, mientras que de forma intravenosa la resorción se inhibe en un menor plazo de tiempo (67,68). Tras la administración IV de una dosis de 4 o 5 mg de zoledrónico, se eliminan los marcadores de resorción ósea durante un año en mujeres postmenopáusicas (65). Calcular la vida media del fármaco es más complicado debido a la incapacidad de obtener medidas en suero u orina, aunque la estimación de vida media para el alendronato puede ser de más de 10 años tras una única administración IV (69).

1.2.2.1 Efecto en osteoblastos

Mientras hemos podido observar que el rol de los bifosfonatos en los osteoclastos ha sido ampliamente estudiado (52,57,61,70,71), no podemos decir lo mismo sobre las células encargadas de la formación del hueso, los osteoblastos. En los primeros estudios se pudo observar que parte del efecto de los bifosfonatos podría también ser debido a la interacción osteoblasto-osteoclasto, mediante la liberación de factores que disminuyen la actividad de los osteoclastos. Los BFs activaban la liberación de osteoprotegerina (OPG) y desactivaban la liberación del receptor de activación del ligando NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), disminuyendo el remodelado óseo (72–75).

En estudios más recientes han observado como los BFs regulan la expresión de sustancias que regulan la osteoclastogenesis como el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y la expresión de OPG, estimulando la liberación del primero e inhibiendo la liberación del segundo (76).

Hay abundancia de evidencia para apoyar la teoría de que los bifosfonatos modulan la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, aunque hay gran variedad en los efectos y sobre todo depende de las dosis utilizadas (77,78). En estudios preclínicos, parece que los BFs a concentraciones del nivel nanomolar (10^{-9} M) estimulan el crecimiento y diferenciación de los osteoblastos (79,80). En estos estudios realizados, se observa como con estas dosis, aumenta la



viabilidad, la capacidad de mineralización, liberación de enzimas como la fosfatasa alcalina y la expresión de colágeno. Por otro lado, a dosis mayores ($\geq 10^{-6}$ M) producen efectos inhibitorios (78,81,82).

1.2.3 Aplicaciones terapéuticas

El principal efecto de los bifosfonatos es la disminución del remodelado óseo por inhibición de los osteoclastos, por lo que lo hace una herramienta muy importante para ser utilizada en enfermedades óseas en las que hay un exceso de remodelado óseo u otras enfermedades que cursan con procesos óseos. Éstas son la osteoporosis, enfermedad de Paget y el cáncer, principalmente.

1. Osteoporosis : Hoy en día, los BFs son el tratamiento de referencia para tratar las distintas formas de osteoporosis (osteoporosis post-menopáusica, osteoporosis por privación de andrógenos, osteoporosis inducida por glucocorticoides y osteogenia imperfecta) (53).
Los más usados para tratar esta enfermedad son alendronato, risendronato e ibandronato en forma oral, mientras que el ZA ha sido utilizado IV, con una mejor afinidad y adherencia al tratamiento, ya que solo hay que dar una dosis por año. El efecto que consiguen este grupo de medicamentos es reducir el riesgo de fractura, especialmente la de cadera y podrían mejorar la densidad mineral ósea (65,83).
2. Enfermedad de Paget: Los BFs y en concreto ZA son el tratamiento de referencia para tratar ésta enfermedad. La enfermedad, de etiología desconocida, se caracteriza por un exceso de remodelado óseo que por consiguiente provoca deformidad y una microarquitectura defectuosa en los huesos. El ZA ha sido capaz de disminuir el remodelado óseo y mantener esa remisión (63).
3. Bifosfonatos en el cáncer: El papel de bisfosfonatos en el cáncer abarca un gran abanico de posibilidades y sigue creciendo según se hacen nuevas investigaciones. Se cree que un 90% o más de los pacientes con cáncer avanzado llegan a desarrollar lesiones en el sistema esquelético (84).



Por un lado, muchos tipos de cáncer, especialmente los de próstata, mama y pulmón, pueden desarrollar metástasis en los huesos en la progresión de la enfermedad, por lo que con la disminución del remodelado óseo producida por los BFs, se reducen las posibilidades de metastatización. En un estudio en mujeres con cáncer de mama operable, la administración de clodronato redujo la recurrencia de metástasis óseas, habiendo una significativa reducción de la mortalidad (85).

Por otro lado, en el caso de mieloma múltiple, se utiliza para reducir la incidencia de hipercalcemia y eventos óseos (86). En el caso de cáncer de mama y próstata, han podido aliviar el dolor de huesos y complicaciones esqueléticas (87,88), así como prevenir la pérdida ósea debido a la privación de hormonas (89,90). Por último, estudios preclínicos recientes indican una acción directa de los BFs frente al cáncer, como inductor de apoptosis y disminuyendo la viabilidad de células cancerosas (46,91).

1.2.4 Efectos secundarios

Los bifosfonatos, pese a ser los tratamientos de referencia de numerosas enfermedades y siendo efectivos en la reducción del dolor óseo, pérdida de masa ósea y otras complicaciones, tiene numerosos efectos adversos.

- Respuesta inflamatoria aguda: Se caracteriza por pirexia transitoria asociada a artralgias, mialgias, dolores de cabeza y síntomas parecidos a los de un resfriado. Ocurre en un 10-30% de pacientes recibiendo la primera dosis de N-BFs vía IV (53) Esta tasa disminuye a un 2.8% tras las subsiguientes administraciones (65). El pretratamiento con anti-histamínicos o antipiréticos pueden aliviar estos síntomas. En menor porcentaje, puede conllevar a una inflamación ocular.
- Fractura femoral atípica: la fractura atípica femoral ocurre con sin necesidad de que haya un trauma o con un trauma mínimo. El mecanismo por el que ocurre este proceso es desconocido. Se cree que puede ser causado por una suma de distintos factores: aumento de la mineralización, alteración de la tasa de remodelado óseo, procesos antiangioénicos, alteraciones en la estructura del colágeno y acumulación de micro-lesiones (92). Pese a esto, el beneficio que se obtiene al tomar esta terapia es mayor al riesgo posible de sufrir una fractura femoral atípica (75).



- Fibrilación atrial: la primera vez que se registraron este efecto secundario fue durante un estudio de 3 años en el que se administraba anualmente una dosis intravenosa de ZA en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis (65). En este estudio, se observó un aumento en la incidencia de casos de fibrilación auricular. Pese a esto, en otro estudio en el que mujeres postmenopáusicas tomaban alendronato o risendronato oral no se observaron estas complicaciones (93).
- Supresión excesiva del remodelado óseo: La supresión del remodelado óseo de manera excesiva debido al tratamiento prolongado con BFs puede conducir al estado conocido como “hueso congelado”. La disminución del remodelado óseo de manera constante produce que el hueso sea incapaz de reparar las microfracturas producidas, incrementado el riesgo de fractura (53). No es un síntoma común en mujeres postmenopáusicas tratadas con BFs de manera oral o IV (94), pero se han detallados casos aislados dónde si ocurrió (95).
- Molestias gastrointestinales: la irritación gastrointestinal es la causa más común de abandono o discontinuación del tratamiento de bifosfonatos(96). El Alendronato, ingerido de forma oral provoca numerosos síntomas gastrointestinales como dispepsia, gastritis, reflujo esofagogástrico y esofagitis. Estos efectos secundarios solo ocurren cuando se consumen de forma oral (97).
- Hipocalcemia: ocurre con mayor frecuencia tras la perfusión IV y en pacientes con alta resorción ósea mediada por osteoclastos (enfermedad de Paget), hipoparatiroidismo sin diagnóstico previo, insuficiencia de vitamina D antes del tratamiento o deterioro de la función renal. Para evitar estos efectos, se suplementa a los pacientes con vitamina D y calcio (53).
- Dolor musculoesquelético severo: es un efecto adverso potencial que esta descrito dentro del prospecto del medicamento. Pese a ello, la FDA americana (administración de alimentos y medicamentos) avisó de la posibilidad que tras el inicio del tratamiento con BFs puede llegar a desarrollarse un dolor musculoesquelético severo, de carácter incapacitante (53).



- Osteonecrosis maxilar o mandibular por bifosfonatos (ONM): se denomina así a un área expuesta del hueso en el área maxilofacial que tras 8 semanas, no ha cicatrizado, habiendo estado expuesto a terapia con bifosfonatos y sin haber estado expuesto a radioterapia en la región craneofacial (98). Ha sido descrita en pacientes que recibían dosis altas de bifosfonatos vía IV (mayormente ZA y pamidronato) durante el tratamiento oncológico, mientras que por vía oral el número de casos es muy inferior. La incidencia real aún tiene que ser calculada pero las estimaciones a partir de la incidencia acumulativa de casos de ONM tras la administración IV de altas dosis de bifosfonatos están entre 0.8-12% (99). Según el fabricante del alendronato (Merck), la incidencia de BRONJ es de 0,7/100,000 personas/años de exposición (100). Los factores de riesgo asociados son los siguientes (100,101):
 - Factores relacionados con los BFs: el riesgo incrementa con la potencia del BF, siendo el ZA el más potente. También si es administrado por IV, por la duración del tratamiento y la dosis.
 - Factores locales: cirugías dentales incluyendo extracciones dentales, colocación de implantes dentales, lesiones en la mandíbula y maxilar (abscesos), enfermedad concomitante oral, cirugía periapical y cirugía periodontal con implicación ósea.
 - Factores demográficos y sistémicos: el riesgo aumenta con el aumento de edad, raza caucásica y otros factores (diálisis renal, hemoglobina baja, obesidad y diabetes).
 - Factores de riesgo genéticos: mutaciones en el gen que codifica la enzima citocromo P450-2 están asociadas con un riesgo aumentado en pacientes de múltiple mieloma tratados con bifosfonatos vía IV.

La clásica presentación clínica consiste en un área expuesta de hueso que puede ser el lugar de una infección secundaria. El tejido mucoso alrededor del hueso necrosado suele estar inflamado y es sensible a la palpación. En ocasiones, los dientes contiguos pueden estar envueltos, presentando una movilidad aumentada. La evolución de la enfermedad lleva a la fractura de los huesos maxilar/mandibulares (102). En casos más severos, se han reportado fístulas mucosas y hueso expuesto a través de la piel (100). Pese al tiempo que ha pasado desde la primera vez que fuese reportado la aparición de este efecto adverso



(103) , no se ha podido elucidar el mecanismo exacto por el que ocurre. Según las investigaciones hechas sobre este tema, se cree que puede ser una suma de distintos factores. Por un lado, en la manera que afecta a los osteoblastos y osteoclastos, disminuyendo el remodelado óseo resultando en un acumulamiento de microlesiones. Por otro lado, esas lesiones expuestas pueden ser infectadas (mayormente por actinomyces) y junto a posibles traumas, aumentan la demanda de reparación del hueso que no puede ser completada, concluyendo en necrosis. Otro factor que puede participar en el desarrollo es la capacidad antiangiogénica de los bifosfonatos, aumentando el riesgo de persistencia o progresión(104–106). Una vez diagnosticado, el tratamiento actual es plenamente paliativo, con enjuagues orales antisépticos, antibióticos y desbridamiento quirúrgico limitado(107).

1.2.5 Ácido Zoledrónico

El ácido zoledrónico pertenece al grupo de los BF_s-N. Como hemos podido observar anteriormente, es el bifosfonato más potente ya que es el que tiene más afinidad por el cristal de HA(56). Por lo tanto es uno de los bifosfonatos más usados en clínica para el tratamiento de enfermedades que cursan con un remodelado óseo alto.

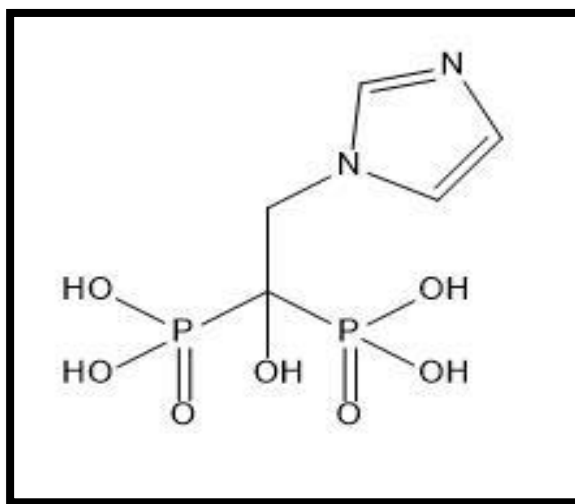


Fig.5:
Estructura
química del
ácido
zoledrónico

El ZA ha sido ampliamente estudiado tanto en estudios preclínicos como estudios clínicos. A pesar de ello, aún hay mucho que saber de este compuesto, ya que en los últimos años se ha estado investigando su uso como agente anticancerígeno en diferentes tipos de cáncer.



En células de carcinoma de pulmón, ZA ha sido capaz de inhibir la prenilación en las células cancerosas, induciendo la apoptosis e inhibiendo la proliferación mediante la supresión de la activación de la cascada de señalización Ras y EGFR (108). En células de cáncer de próstata provocó efectos similares mediante la regulación decreciente de la proteína Survivin (109), con resultados similares en el cáncer cervical (110).

En lo que respecta al cáncer oral, hay algunos estudios en los que también ha mostrado potenciales efectos anticancerígenos. Principalmente inhibiendo la proliferación celular, modificando el ciclo celular y estimulando la apoptosis, mediante la activación de las caspasas -3,-8 y -9 y disminuyendo la expresión de las familias proteicas Bcl-2 y Bid (111,112). Pese a esto, aún hay mucho que estudiar del potencial anticancerígeno de este compuesto.



1.3 Fitoquímicos

1.3.1 Generalidades y clasificación

Los fitoquímicos son compuestos químicos naturales que tienen su origen en el reino vegetal. Son un metabolito secundario de los vegetales y aunque no es un nutriente esencial para los humanos, tienen múltiples propiedades que les confieren un interés especial, ya sean ingeridos por interés médico o como parte de una dieta balanceada.

Las frutas y verduras hace tiempo que fueron reconocidas como importantes fuentes de micronutrientes, pero no ha sido hasta recientemente cuando se ha mostrado un mayor interés por estos compuestos, ya que se ha podido observar la importancia que pueden tener para mantener nuestra salud (113). Nuevas investigaciones muestran el rol que pueden tener estos compuestos en distintas enfermedades como cánceres, enfermedades degenerativas y problemas cardíacos. Estas sustancias suelen ser complejas, encontrándose en pequeñas cantidades (micro y miligramos) y mayoritariamente presentan actividad antioxidante, captando radicales libres presentes en nuestro organismo (114).

Hay una gran cantidad de fitoquímicos con una gran diversidad en su estructura y función. Los grupos más investigados han sido los compuestos fenólicos, en particular los polifenoles y los terpenos. En la figura 6 podemos ver la clasificación de estos.

Fig.6: Clasificación de los fitoquímicos modificado de Tiwari y cols (114)





1.3.2 Polifenoles

Los polifenoles son los antioxidantes que más abundan en la dieta. Han sido identificados más de 8000 compuestos en distintas especies de plantas. Todos los componentes tienen un intermediario común, la fenilalanina o el ácido shikímico. Estos compuestos se caracterizan por tener grupos fenol (uno anillo aromático con uno o más grupo hidroxilo), que les confiere sus propiedades. Éstos se clasifican según el número de grupos fenol y las estructuras que conforman estos anillos. Hay dos grupos mayoritarios a la hora de clasificarlos, los flavonoides y los no flavonoides. Los flavonoides son compuestos con una estructura C6-C3-C6: flavanonas, flavonas, dihidroflavonoles, flavonoles, flavan-3-oles, antocianidinas, isoflavonas y proantocianidinas. Los no flavonoides se clasifican de acuerdo al número de carbonos y a su vez tiene otros subgrupos: fenoles simples, ácidos benzoicos, taninos hidrolizables, acetofenonas, ácidos fenil acéticos, ácidos cinámicos, cumarinas, benzofenonas, xantanos, Estilbenos, chalcones, Lignanós y secoiridoides (114,115).

Tabla 3: Clasificación de los polifenoles principales modificado de Tiwari y cols (114)

Clases	Subclases	Polifenoles principales	Alimentos que los contienen
Ácidos fenólicos	Ácido hidroxibenzoico Ácido hidroxicinámico	Ácido benzoico Ácido p-cumárico Ácido sinápico Ácido caféico Ácido ferúlico	Frutos rojas, canela, cebollas, rábano negro, aceite de argán
Benzopirenos	Furanocumarinas simples Piranocumarinas Cumarinas sustituidas	Umbelliferon Escopoletina Psoralen	Género garcinia, mango, <i>Anthoxanthum odoratum</i> , <i>Dipteryx odorata</i>
Estilbenos	Fitoalexinas	Capsidiol Resveratrol Rapontina	Uva, ruibarbo, nueces, cacahuete, avellanas
Lignanós		Enterodiol Enterolactona	Cereales, fresas, sésamo, crucíferas, soja



Flavonoides	Flavonoles Flavononas Antocianinas Flavonas Isoflavonas Taninos condensados	Catequinas Genisteína Luteína Hesperidina	Cacao, soja, té verde, maíz, pimiento rojo, remolacha
--------------------	--	--	--

Estos compuestos presentan distintas propiedades. Suele aportar color, un sabor amargo, astringencia y aroma, por lo que le confieren propiedades únicas a la planta que los contiene(114).

Suelen estar distribuidos de manera no uniforme en las plantas, repartidos entre niveles subcelulares, tisulares, como paredes celulares o vacuolas. Ciertos polifenoles como la quercetina, se encuentran en distintas plantas y en distintas ubicaciones (flores, cereales, hojas). La mayoría de los alimentos suele tener combinaciones de distintos polifenoles, aunque algunos son solo encontrados en alimentos concretos (114).

La cantidad de polifenoles presentes en los alimentos depende de numerosos factores: grado de madurez, almacenaje, procesamiento, tiempo de cosecha, así como de los factores previos a su recogida como son el tipo de suelo, los nutrientes que disponga, la exposición solar, precipitaciones, etc. El grado de maduración afecta considerablemente a las concentraciones de los polifenoles (116).

En cuanto a la biodisponibilidad de los polifenoles, es bastante baja, debida a que la forma nativa de estos (en forma de ésteres, glicósidos o polímeros) no puede ser absorbida. Sin embargo, las agliconas pueden ser absorbidas en el intestino delgado (117). Antes de ser absorbidos deben ser hidrolizados por enzimas intestinales o por la microflora intestinal. Las agliconas se rompen por la apertura del heterociclo en diferentes puntos dependiendo de la estructura química, y esto produce distintos ácidos, que luego son metabolizados a derivados del ácido benzoico. Durante ese proceso, sufren grandes modificaciones, para poder ser absorbidos y posteriormente eliminados mediante las reacciones de detoxificación del organismo (118).

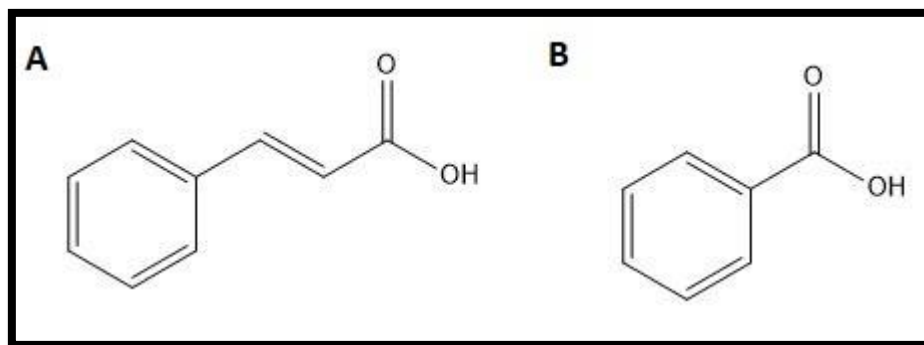
Los polifenoles han demostrado numerosos efectos en el ser humano. Estudios epidemiológicos muestran una asociación positiva entre la ingesta de estos compuestos y la prevención de distintas enfermedades (118,119). Los grupos fenol presentes pueden captar un



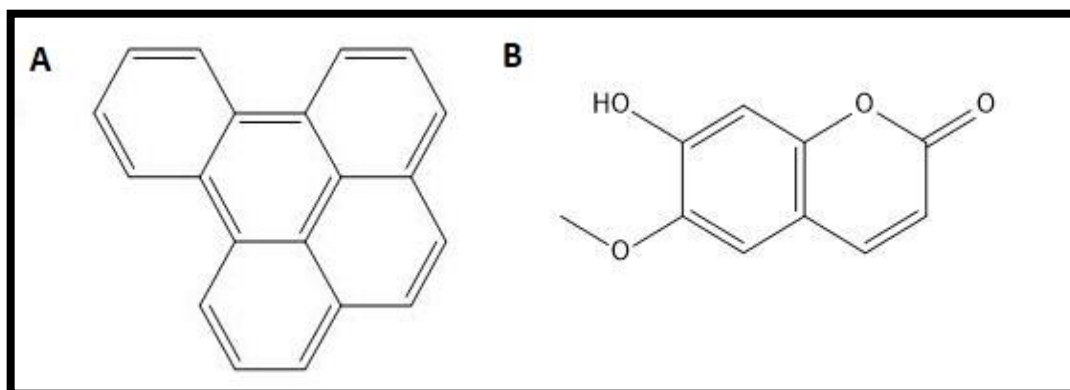
electrón para formar radicales fenoxilo-compuestos relativamente estables- parando la cadena de reacciones de oxidación celular. Por lo tanto, actúan como antioxidantes, reduciendo el proceso de estrés oxidativo, ligado al desarrollo de un gran número de enfermedades. Se cree que por este mecanismo ejercen su acción protectora, habiendo presentado efectos cardioprotectores, anticancerígenos, anti-envejecimiento, neuroprotectores, osteoreguladores, etc.

- Ácidos fenólicos: se dividen en dos subgrupos, los ácidos hidroxicinámicos y los hidroxibenzóicos (Fig.7). De estos, los ácidos hidroxicinámicos son los más abundantes. Están formados por un anillo aromático y una cadena de tres átomos de carbono. A su vez se dividen en cuatro grupos, los ácidos p-cumáricos, caféicos, ferúlicos y sinápicos. En la naturaleza suelen estar asociados a compuestos como el ácido clorogénico. Se encuentran en alimentos como frutos rojos, el aceite de argán, cebollas, canela y rábano negro, entre otros (115).

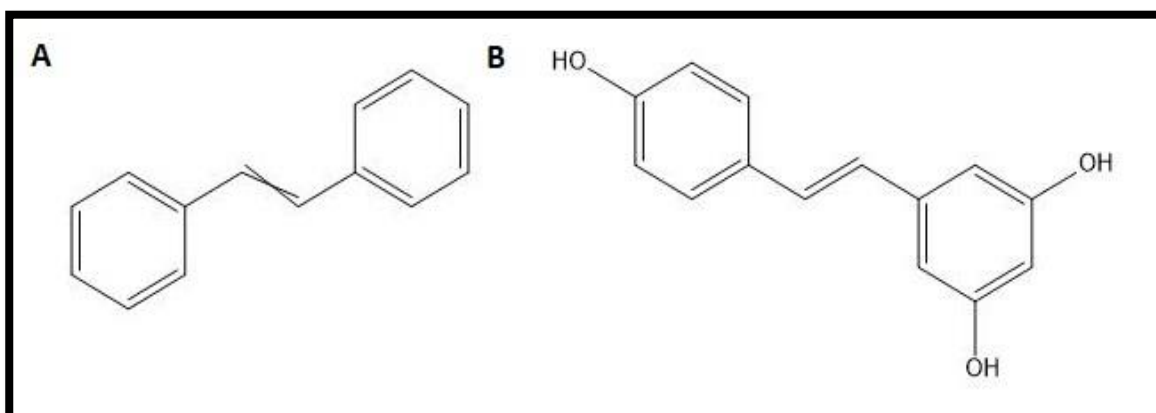
Fig.7: Estructura química de los ácidos fenólicos (A) Cinámico y (B) Benzoico



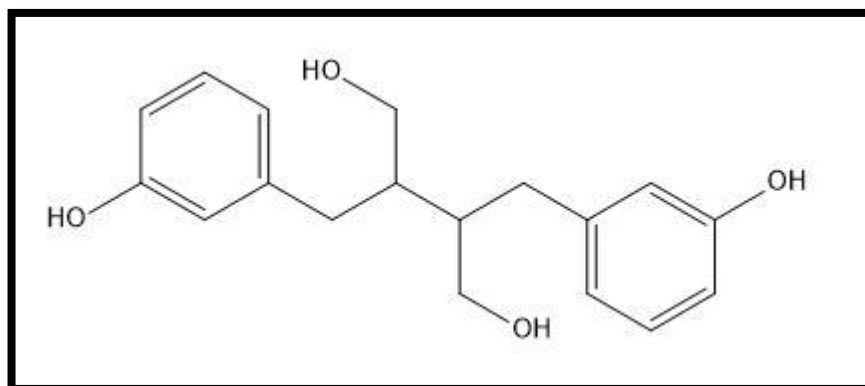
- Benzopirenos: Su estructura consta de un anillo bencénico unido a una pirona (Fig.8). En la naturaleza suelen encontrarse junto a azúcares, formando glicósidos. Se dividen en tres grupos, Furanocumarinas simples, Piranocumarinas y cumarinas sustituidas. Se hallan en el género garcinia y mango entre otros.

Fig.8: Estructura química del (A) benzopireno y (B) cumarina escopoletina

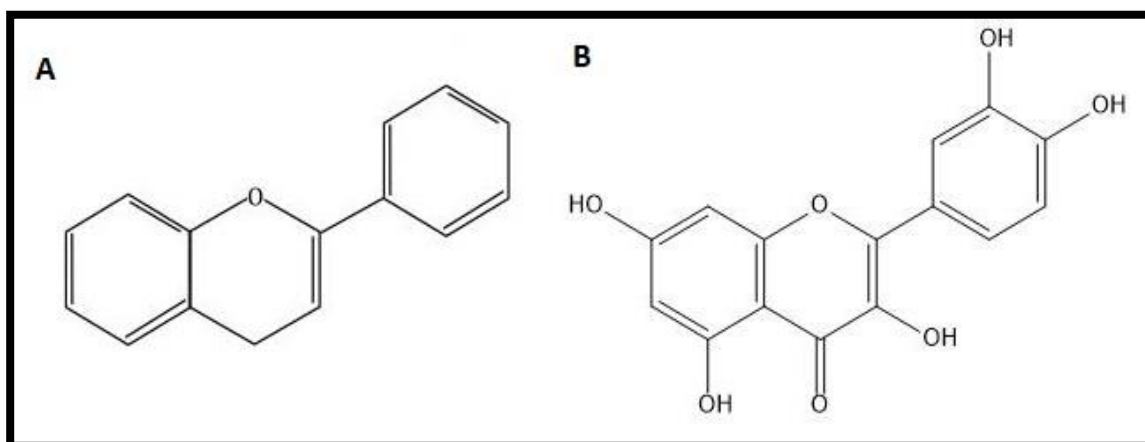
- Estilbenos: su estructura básica consta de 1,2-difeniletileno (C₆-C₂-C₆) (Fig.9) y el grupo mayoritario son las fitoalexinas. La presencia de estilbenos en la dieta es baja, actuando en los organismos que los contienen como antifúngicos. El más popular y estudiado es el resveratrol, hallado en la vid roja. Abundan en la uva, ruibarbo, nueces, cacahuetes y avellanas, entre otros (115).

Fig.9: Estructura química (A) general de los estilbenos y (B) resveratrol

- Lignan: son compuestos derivados de la unión β - β' de dos fenilpropanoides (C₆-C₃) (Fig. 10). Tienen una amplia distribución en el reino vegetal en cereales, fresas, sésamo, crucíferas y soja. Muchos de éstos están considerados como fitoestrógenos, como el secoisolariciresinol encontrado en el lino (115).

Fig.10: Estructura química del lignano enterodiol

- Flavonoides: su estructura común consta de dos anillos aromáticos unidos por tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado (Fig. 11). Es el grupo más estudiado, habiéndose encontrado más de 4000 variedades distintas. Basados en la modificación del heterociclo, hay distintos grupos: Flavonoles, Flavononas, Antocianinas, Flavonas, Isoflavonas y Taninos condensados. En la naturaleza suelen encontrarse glicosilados con glucosa o ramnosa. Los flavonoides se hallan repartidos por gran diversidad de plantas y frutos, como el pimiento rojo, té, maíz cacao, soja, entre otros. Los componentes más estudiados son la hesperidina, luteína, genisteína y catequinas (114,115).

Fig.11: Estructura química (A) general de los flavonoides y (B) quercetina



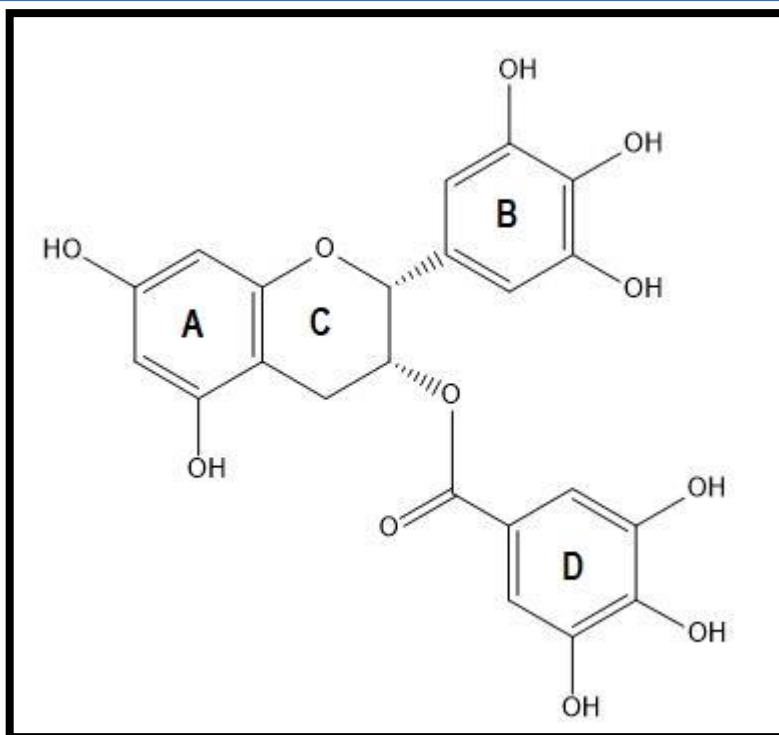
1.3.2.1 Epigalo-3-catequingalato

Características generales y estructura

El polifenol epigalo-3-catequingalato (EGCG) es la catequina más abundante en el té verde (*Camellia sinensis*). Aparte de EGCG, las principales catequinas en las hojas frescas del té verde son, (-)-epicatequin (EC) y (-)-epigallocatechin (EGC). Las formas trans menos activas están presentes en menor cantidad (120).

EGCG es un éster del ácido gálico y epigallocatequin (Fig. 12). Es la catequina más abundante y con mayor actividad de las estudiadas. Estructuralmente, tiene grupos hidroxilos en 3',4' y 5' del anillo B y una fracción galato esterificada en el carbono 3 del anillo C, confiriéndoles capacidad para poder captar electrones y mantenerse con mayor estabilidad que otros compuestos (121,122). Sin embargo la estructura de EGCG también le confiere susceptibilidad de ser degradada mediante la auto-oxidación (120).

Fig.12: Estructura química del epigallocatequin-3-galato





Biodisponibilidad

La vía de administración más usada para el EGCG es la oral, ya sea en infusiones de té o en capsulas. Las hojas secas de té verde aportan aproximadamente un 10% de catequinas, que serían entre 8-15 gramos por cada 100 gramos de hojas secas. El promedio de hojas secas usadas sería de unos 4-5 gramos por taza, por lo que de 400-500mg de catequinas podrían ser ingeridas por cada taza de té (300-400 ml) (123). Sin embargo, tras la ingesta oral, EGCG es sometida a modificaciones metabólicas no beneficiosas en el hígado y tracto digestivo.

Tras la ingesta de una dosis de EGCG se ha llegado a medir concentraciones plasmáticas de 1 -10 μ M en humanos y en roedores (124,125). Solo un 0.1-1% de las dosis administradas oralmente alcanzan la circulación sistémica (125). Sin embargo, los niveles de EGCG pueden ser muy superiores en tejidos que entran en contacto directo, como la cavidad oral (126).

Tras ser ingerido, las primeras reacciones de transformación comienzan en la saliva, mediante la hidrólisis del EGCG por las esterasas. La metabolización suele ser llevada a cabo en gran parte en el intestino e hígado, donde ocurren las reacciones de glucuronidación, sulfuración de los grupos hidroxilo y la O-metilación de los grupos catecol a través de la UDP-glucuroniltransferasa (UGT), fenolsulfotransferasa (SULT) y catecol-O-metiltransferasa (COMT) (125).

Las catequinas que se encuentran en forma libre, tanto las O-metiladas como las O-metiladas y conjugadas con ácido glucurónico pueden ser encontrados en plasma, orina y bilis (127). Los conjugados que siguen manteniendo intacta la fracción galato tienen actividades similares a los compuestos primarios. Posteriormente las catequinas que no son absorbidas por el intestino delgado y las excretadas por la bilis llegan al colon donde pueden ser metabolizadas por la flora bacteriana y reabsorbidas (127,128).

Propiedades

EGCG, por ser la catequina con mayor actividad, ha sido la más estudiada, con gran cantidad de propiedades. Aquí veremos las más importantes:



- ❖ **Antioxidante:** como hemos visto antes, la estructura molecular de EGCG le confiere la capacidad de captar electrones. Los tres grupos hidroxilo en el anillo B (Fig. 12) participan en la deslocalización de electrones y estabilización (129), mientras que el anillo A está identificado como un punto antioxidante (130). Por otro lado, la fracción galato en la posición 3 del anillo C está asociado con la capacidad de eliminar radicales libres y especies nitrogenadas (122).

Se ha podido observar como la función antioxidante de EGCG puede mejorar la función de la mitocondria (131). En plaquetas ha sido capaz de inhibir el estrés oxidativo producido por la nitración del aminoácido tirosina (132). Sin embargo en otros estudios –al igual que ocurre con todos los antioxidantes- concentraciones altas de EGCG pueden revertir la capacidad antioxidante y convertirse en pro-oxidante, pudiendo auto-oxidarse la molécula de EGCG. En este caso, la propia molécula de EGCG produciría radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno y otros intermediarios generando toxicidad (132,133).

En la concentración fisiológica de 1-10 μ M, EGCG puede producir pequeñas cantidades de especies reactivas del oxígeno (ROS) que activan rutas de señalización que estimulan la línea de defensa celular que tiene el organismo (134).

- ❖ **Anti-inflamatorio:** EGCG tiene un papel fundamental en la transcripción y expresión de genes que regulan la respuesta inflamatoria. La respuesta inflamatoria comprende numerosos procesos complejos en nuestro organismo, como la agregación de células inmunitarias, liberación de moléculas de señalización celular - citoquinas y ROS - , activación del NF- κ B y la proteína activadora (AP-1). Estas dos se integran en el núcleo celular regulando la síntesis de genes que producirán la reacción inflamatoria. EGCG consigue reducir la expresión de factores que producen la inflamación y así obtener efectos antiinflamatorios mediante distintos métodos: inhibiendo la transfección del factor NF- κ B y AP-1 y eliminando los radicales de óxido nítrico, peroxinitrilos y otros radicales libres, evitando la reacción inflamatoria exacerbada (135). EGCG también ha sido capaz de inhibir la liberación de interleucinas como la IL-8 en el epitelio respiratorio, reduciendo la respuesta inflamatoria (136). En otro estudio fue capaz de inhibir la liberación de especies reactivas del nitrógeno de una manera dosis-dependiente en líneas celulares de cáncer de colon, por lo que podría tener gran importancia en enfermedades inflamatorias crónicas (135).



- ❖ Osteoregulador: numerosos estudios se han hecho respecto a la capacidad del té verde de regular el metabolismo óseo. En un estudio realizado en mujeres entre 70 y 85 años, mostró que el consumo de té estaba relacionado con una mejor preservación de la estructura de la cadera (137). EGCG tiene un doble papel sobre las células óseas. Por un lado, tiene potencial antirresortivo, produciendo la apoptosis de osteoclastos y disminuyendo el remodelado óseo, mediante el bloqueo de la generación del factor NF- κ B y la interleucina 1b (138). Por otro lado, EGCG actúa aumentando la proliferación, mineralización y diferenciación de osteoblastos (139,140). Concentraciones de 5 μ M fueron capaces de promover la diferenciación de células osteoprogenitoras a osteoblastos (132,141).

- ❖ Anticancerígeno: EGCG tiene distintos efectos anticancerígenos y ha sido la propiedad más estudiada de esta sustancia. EGCG fue capaz de inhibir la angiogénesis del tumor en células endoteliales y progenitoras (142), así como aumento la apoptosis y redujo la viabilidad en una línea celular de fibrosarcoma(143).

En numerosos estudios, ha demostrado distintas propiedades quimiopreventiva y quimioterapéuticas en líneas celulares de cáncer oral, como reducción de la invasión y migración vía reducción de la expresión de matrix metalloproteinasas y activador del plasminógeno (46,144–146), inhibición de la proliferación celular (147,148), inducción de apoptosis y autofagia (148), alteración del ciclo celular (46,147), así como efecto antitumoral *in vivo* (145).

También hay estudios en relación a la combinación de EGCG con agentes quimioterapéuticos usados en clínica. EGCG ha demostrado sensibilizar a células de cáncer colorrectal frente a la actividad del 5-FU, exhibiendo sinergia en células quimio-resistentes (44,149) y aumentó los efectos inhibitorios sobre la proliferación celular del 5-FU en células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (150).

La administración de extracto de té verde a fumadores durante 4 semanas consiguió reducir el daño en el ADN de los queratinocitos (151). En otro estudio aleatorizado, con grupo control y placebo en fase dos, evaluó el papel quimiopreventivo del EGCG en lesiones orales premalignas. Se observó que aquellos que tomaban dosis más altas tenían mayores tasas de respuesta clínica que el grupo placebo, indicando un efecto dosis-



dependiente, aunque no tuvo significancia estadística. EGCG fue dado en capsulas y fue bien tolerado, con diarrea, insomnio y molestias en el cuello como efectos adversos. Tras 27.5 meses de estudio, no hubo diferencias en la supervivencia con ausencia de cáncer entre un grupo y otro (152).

1.3.3 Saponinas

Las saponinas son un grupo de compuestos que se encuentran en distintas especies del reino vegetal, especialmente en las legumbres. Su nombre viene de la palabra del latín sapo, haciendo referencia a las propiedades detergentes y tensioactivas que tienen estos compuestos. En contacto con agua forman una espuma similar al jabón y habían considerado a este grupo de nutrientes “factores antinutricionales” por lo que su uso había sido limitado(114).

Sin embargo, en los últimos años se ha vuelto a poner la atención en este grupo de sustancias por sus efectos sobre la salud y por el interés de la industria para la producción sintética de esteroides (153). Se han investigado para el desarrollo de nuevas medicinas naturales y para probar la eficacia de las plantas medicinales ya usadas. Los medicamentos que contienen saponinas tienen un menor efecto irritativo al ser ingeridas vía oral y han sido usadas generalmente como agentes antitusígenos y expectorantes (154). Otros efectos investigados son sus propiedades anti-inflamatorias (155), antirresortivas (156) y anticancerígenas (157).

Las saponinas son glucósidos de triterpenoides y esteroides. Tienen una parte compuesta por un glúcido y la otra compuesta por un triterpenoide o un esteroide. Por ello se clasifican en saponinas esteroideas y saponinas triterpenoides. En general, en el carbono C-3 de la parte no glucídica (aglicona), es donde se une la parte glucídica, que pueden ser de una a varias unidades de monosacáridos (158).

La complejidad estructural de las saponinas es responsable de las distintas propiedades farmacológicas, físico-químicas y biológicas, así como la relevancia que puedan tener por su aplicación en cosméticos, tecnología alimentaria y en su uso medicinal (159).



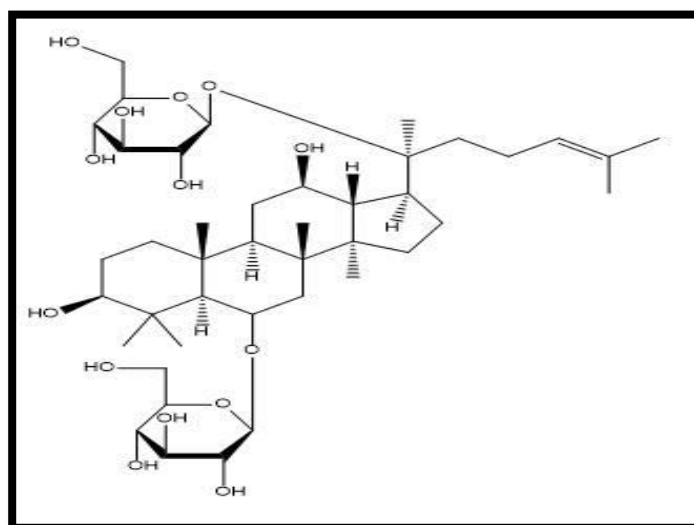
Tabla 4: Clasificación de las saponinas modificado de Tiwari y cols(114).

Clases	Subclases	Saponinas principales	Alimentos que los contienen
Saponinas triterpenoides		Ginsenósidos Cucurbitacina	Lentejas, garbanzos, soja, guisantes, ginseng, brionia, eleuterococo, regaliza
Saponinas esteroideas	Glicósidos del furoestanol Glicósidos del espirostano	Dioscina Gracilina Protoneodioscina Protoneogracilina Diosgenina	Legumbres, familias <i>Agavaceae</i> , <i>Dioscoreaceae</i> , <i>Liliaceae</i> , <i>Solanaceae</i> , <i>Scrophulariaceae</i> , <i>Amaryllidaceae</i> , <i>Leguminosae</i> , y <i>Rhamnaceae</i>

- Saponinas triterpenoides

Las aglicona de las saponinas triterpenoides contienen 30 carbonos y son estructuralmente diferentes entre ellas. Suelen consistir de 5 o raramente 4 unidades de carbono formando ciclos. Los más estudiados son los ginsenósidos, presentes en el ginseng. Se encuentran aparte en otros alimentos como legumbres (lentejas, garbanzos, soja, guisantes) y plantas como el eleuterococo y la brionia (159,160).

Fig. 13: Estructura química de la saponina triterpenoide ginsegósido RG1

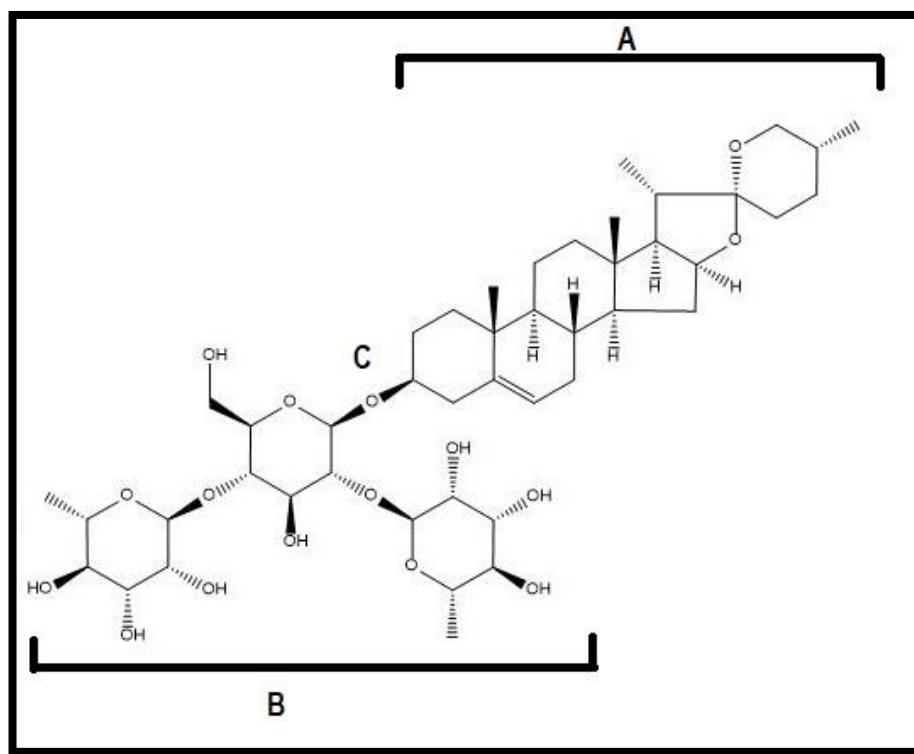




- Saponinas esteroideas

La estructura base es de 27 carbonos y puede estar formado por un espirostanos de 6 anillos o un furostanos de 5 anillos. Por ello, a su vez se clasifican a su vez en dos grupos. Por un lado, los glicósidos del furoestanol, como la protoneodioscina y protoneogracilina y por otro lado los glicósidos del espirostanos, como la dioscina y gracilina (114). Las saponinas más importantes son la gracilina y la dioscina (Fig.14), de la cual se extrae la aglicona Diosgenina (DG). Éstas están presentes en numerosas legumbres y en las familias *Agavaceae*, *Dioscoreaceae*, *Liliaceae*, *Solanaceae*, *Scrophulariaceae*, *Amaryllidaceae*, *Leguminosae*, y *Rhamnaceae* (160).

Fig. 14: Estructura química de la saponina esteroidea dioscina, formada (A) por una porción esteroidea (Diosgenina) y (B) una porción glucídica unidas por (C) un átomo de oxígeno

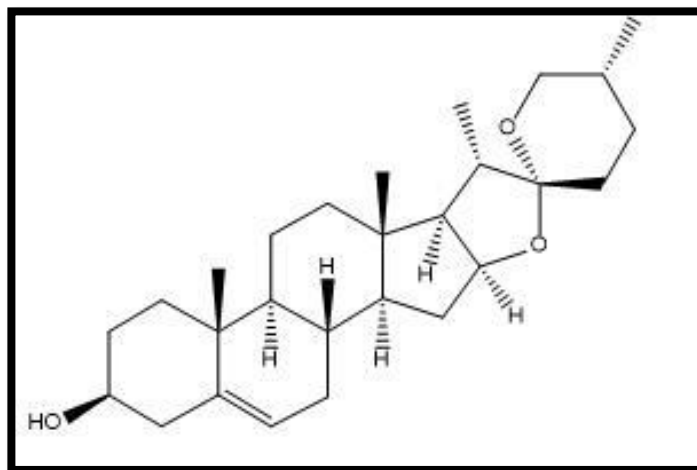


1.3.3.1 Diosgenina

La diosgenina (3-hydroxy-5-spirostenos) es una sapogenina esteroidea que se encuentra en numerosas plantas, como el fenogreco (*Trigonella foenum graecum*), *Agave Sisalana* o *Cheilocostus speciosus*, entre otros (Fig. 15)



Fig. 15: Estructura química de la diosgenina



La DG es la aglicona de la saponina esteroidea dioscina, que es separada del glúcido mediante hidrólisis. Tradicionalmente, ha sido usada en la industria farmacéutica como precursor para la síntesis de hormonas esteroideas (153), pero ha suscitado nuevo interés debido a recientes investigaciones, en las que se ha podido observar numerosos beneficios sobre la salud, como anti-inflamatoria, antirresortiva, y sobre todo, anticancerígena.

- Antiinflamatoria y modulación de la respuesta inmunitaria: En diversos estudios, se ha podido observar como DG redujo varios mediadores inflamatorios -incluyendo interleucinas 1 y 6 y óxido nitroso- en macrófagos murinos (155). Por otro lado, fue capaz de aliviar síntomas alérgicos en ratones mediante la regulación de la respuesta inmune de las células T, la supresión de la producción de Inmunoglobulina E y la infiltración y degranulación de mastocitos (161,162)
- Actividad anti-infecciosa: DG ha mostrado significativa susceptibilidad frente a varios microbios Gram negativos (*Escherichia coli* y *Salmonella typhi*) y positivos (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*) (163).
- Anticoagulante y antitrombótico: Modelos *in vitro* e *in vivo* demostraron el efecto antitrombótico que ejerce DG, prolongando el sangrado y la coagulación mediante la inhibición plaquetaria de manera dosis-dependiente (164).



- Antirresortivo y regulador óseo: DG ha mostrado efectos antirresortivos *in vitro* con la inhibición de la formación, proliferación y diferenciación de osteoclastos (156,165). De manera similar, en un modelo de osteoporosis post-menopáusica en ratas, se pudo observar como DG previene la pérdida de masa ósea inducida por la deficiencia de estrógenos (166).
- Anticancerígeno: ha sido el efecto más estudiado en los últimos años y ha despertado un gran interés debido a su polivalencia. Chang y cols (167) observaron cómo DG fue capaz de inhibir el factor de crecimiento de hepatocitos, que regula la transición epidermal-mesenquimal, clave en el proceso de diseminación del tumor. También fue capaz causar efectos antiproliferativos mediante la activación de la proteína p53 y estimular la apoptosis mediante la modulación de la actividad de la caspasa-3 en distintas líneas de cáncer (168). Por otro lado modificó el ciclo celular mediante un secuestro en la fase G2/M, causando la apoptosis en células de cáncer hepático (169). En cuanto al cáncer oral, ha demostrado capacidad para inhibir la migración e invasión mediante la reducción de la expresión de metalomatrixproteasas y la reducción de la actividad de la vía de señalización PI3K-Akt-mTOR (157). Se cree que la capacidad anticancerígena proviene de la modulación de las vías de señalización PI3K/Akt, mapquinasas, NF-κB y desregulación de ciertas proteínas funcionales (160).

**JUSTIFICACIÓN,
HIPÓTESIS
Y
OBJETIVOS**



2.1 Justificación e hipótesis

En los últimos años se ha observado un aumento de la supervivencia de los pacientes debido principalmente al avance de las técnicas quirúrgicas, a un mejor conocimiento de la biología molecular del cáncer, al desarrollo de nuevos fármacos antitumorales y a la utilización de fármacos dirigidos contra dianas moleculares específicas (38,170).

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es el cáncer más común de cabeza y cuello. La extirpación quirúrgica es el tratamiento de referencia para los pacientes de COCE, pero no suele ser suficientemente efectivo cuando se encuentra en fase avanzada. Las otras opciones de tratamiento son la quimioterapia y radioterapia, en combinación con la cirugía (36,171).

El tratamiento exitoso de pacientes con cáncer oral por lo tanto se basa en estrategias de tratamiento multidisciplinario para maximizar el control oncológico y minimizar el impacto de la terapia. Por ello, al elegir la modalidad de tratamiento, muchos factores deben tenerse en cuenta. El tratamiento debe adaptarse individualmente a las necesidades de cada paciente, con el fin de garantizar una buena calidad de vida, así como una supervivencia favorable (38,170). La quimioterapia y la radioterapia, aumentan la tasa de recuperación y supervivencia de los pacientes, aunque estos tratamientos también aumentan de manera substancial los efectos adversos, como mucositis oral, xerostomía, infecciones, pérdida de sabor, radio-osteonecrosis, cansancio, fatiga, diarrea, pérdida de audición, anemia y náuseas, entre otros (40,172).

En estudios recientes, se han usado distintos extractos de plantas y fitoquímicos para explotar su acción adyuvante terapéutica, con el objetivo de reducir los efectos adversos de los tratamientos, ya que estos compuestos suelen presentar pocos efectos secundarios (47).

Los fitoquímicos presentan características que los han hecho atractivos para la investigación anticancerígena. Interfieren *in vitro* por distintos mecanismos en el proceso oncogénico, lo que los hace posibles agentes de utilidad en las primeras fases del cáncer o en la inhibición de las etapas posteriores de progresión o invasión. Existen todavía dos problemas cruciales: por un lado, el escaso conocimiento sobre la biodisponibilidad de los fitoquímicos en humanos y por otro lado, la posible acción mutagénica de algunos de éstos compuestos.



Los modelos celulares son considerados una herramienta útil en investigación ya que proporcionan información importante sobre mecanismos de acción y eficacia de las sustancias. Los modelos animales y estudios en humanos son costosos y por tanto, no son siempre apropiados para la caracterización inicial de los fitoquímicos. Por esta razón, es interesante realizar una evaluación previa mediante ensayos *in vitro* para posteriormente proceder a su evaluación *in vivo*.

Basándonos en los razonamientos anteriores nos planteamos la siguiente hipótesis H0: La utilización de fitoquímicos asociados a los tratamientos utilizados actualmente en el cáncer oral no reducen los efectos adversos de los mismos.



2.2 Objetivos

Los objetivos de este estudio están descritos en dos niveles; un objetivo general que determina el planteamiento global de la investigación y unos objetivos específicos que componen y desarrollan los diversos aspectos del objetivo general.

Nuestro objetivo fundamental es analizar el efecto de los fitoquímicos con los tratamientos usados en el cáncer oral de células escamosas, para evaluar un posible efecto sinérgico y si son capaces de reducir los efectos adversos producidos por el tratamiento convencional. Los objetivos específicos los dividiremos en tres bloques:

Objetivo 1

- Determinar los efectos potenciales quimioterapéuticos de los agentes antirresortivos ácido zoledrónico, diosgenina y epigalo-3-catequingalato en la línea PE/CA-PJ15 de cáncer oral, mediante la evaluación de la viabilidad celular, apoptosis, migración y ciclo celular.

Objetivo 2

- Evaluar el efecto de la combinación de 5-Fluorouracilo con EGCG y radioterapia en el cáncer oral, midiendo parámetros como la viabilidad, migración y ciclo celular en las líneas de cáncer oral PE/CA-PJ15 y H357 .

Objetivo 3

- Estudiar el rol que tiene el ácido zoledrónico sobre los osteoblastos y el efecto de la combinación del mismo con EGCG, mediante la evaluación de la proliferación, migración, mineralización y deposición de colágeno en la línea celular SAOS-2.

MATERIAL

Y

MÉTODOS



3.1 Material

3.1.1 Líneas celulares

En los siguientes experimentos hemos utilizado las siguientes líneas celulares:

- **Línea celular de carcinoma oral de células escamosa PE/CA-PJ15**

La línea celular PE/CA-PJ15 (PE/CA) fue obtenida de la colección Europea de cultivos celulares autenticados (ECACC). Son células adherentes de tipo epitelial provenientes de un tejido de lengua de un paciente de 45 años con cáncer oral de células escamosas

Las células fueron cultivadas en medio Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) con 10% de SBF (suero bovino fetal), 1% de penicilina y 1% estreptomina (medio completo) a 37°C, en una atmosfera de 95% oxígeno y 5% CO₂.

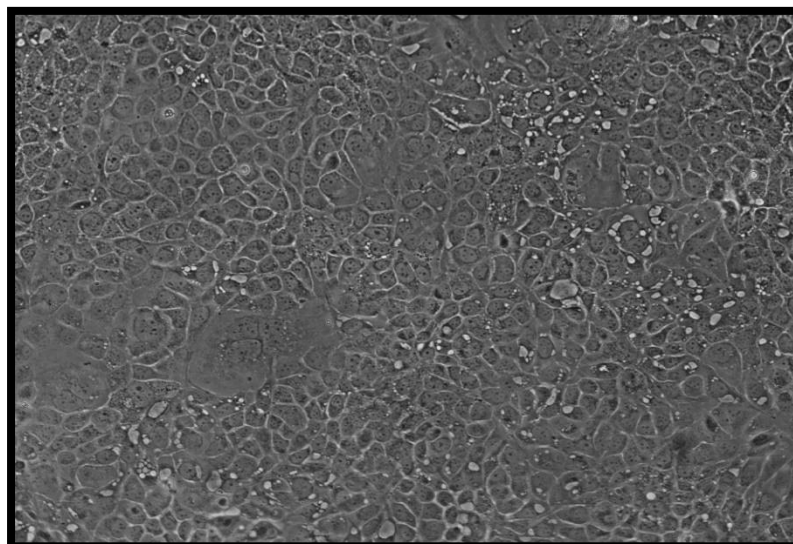


Fig. 16:
Línea
celular de
carcinoma
oral de
células
escamosas
PE/CA-
PJ15

- **Línea celular de carcinoma oral de células escamosas H357**

Esta línea celular fue obtenida de la ECACC. Son células adherentes con morfología poligonal provenientes de un tejido de lengua de un paciente de 74 años con cáncer oral escamoso. Fueron cultivadas en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco): HAMS F12 (1:1) con 10% de SBF, 2mM de glutamina, 1% penicilina, 1% estreptomina y 0.5 µg/ml



de succinato de hidrocortisona (medio completo) en una atmosfera de 37 °C, 95% oxígeno y 5% CO₂.

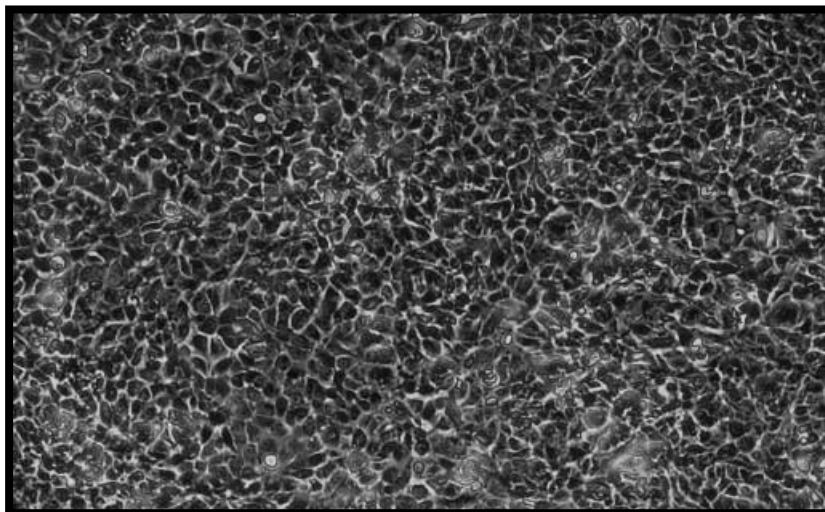


Fig. 17:
Línea
celular de
carcinoma
oral de
células
escamosas
H357

Esta línea celular fue obtenida de la ECACC. Son células adherentes con fenotipo de osteoblasto, cuyo origen es un osteosarcoma primario de una niña de 11 años. Tiene un fenotipo de osteoblasto estable, por lo que es un buen modelo para estudiar las propiedades y funciones de los osteoblastos (139).

La línea fue cultivada en medio McCoy 5-alpha modificado, suplementado con 2 mM de glutamina, 10% FBS, 1% de penicilina y 1% estreptomicina (medio completo) en una incubadora con una atmosfera de 37°C, con 95% oxígeno y 5% CO₂.

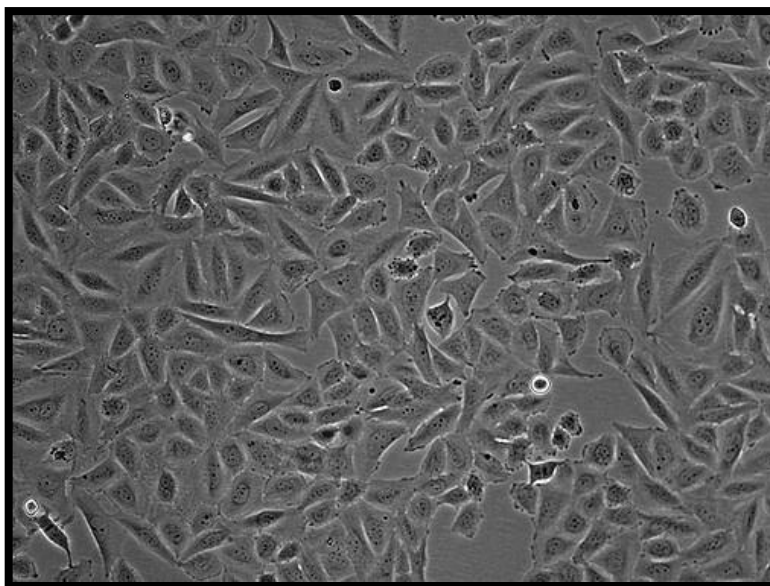


Fig. 18:
Línea
celular de
osteosarco-
ma SAOS-2



3.1.2 Reactivos

- El medio Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), El medio McCoy 5-alpha modificado, el medio DMEM, el medio HAMS 12, la penicilina, la estreptomicina, la glutamina, el bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), el DMSO (Dimetilsulfóxido), el PBS (Tampón fosfato salino), la RNAsa (Ribonucleasa A), el yoduro de propidio (PI) el epigalo-3-catequingalato, la diosgenina, el ácido ascórbico (AA), el β -glicerolfosfato (BG), el ácido pícrico en solución acuosa saturada al 1.3 %, el 5-Fluorouracilo, la tinción Direct red 80 y la hidroclorona sódica provenían de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Química, S.A. Madrid, España)
- El ácido zoledrónico procedía de Intatrade Chemical GmbH (Muldestausee, Alemania).
- El suero bovino fetal procedía de Gibco (EEUU).
- El etanol y el formaldehído se obtuvieron de Scharlab (Scharlab S.L; España).
- El kit de apoptosis Cell Death Detection ELISAPLUS, 10X pertenece a Roche (Roche Diagnostics GmbH; Alemania).
- La alizarina roja S fue comprada a VWR internacional (Barcelona, España).

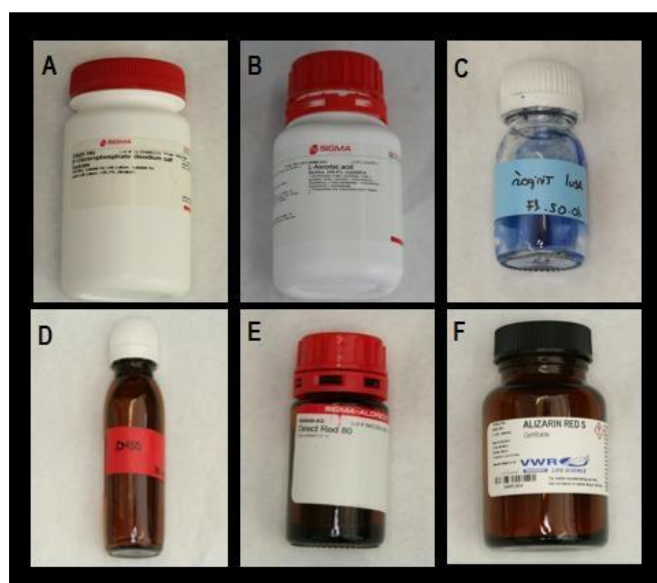


Fig. 19: Reactivos usados en los experimentos. (A) β -glicerolfosfato (B) Ácido ascórbico (C) Azul tripán (D) DMSO (E) Direct Red 80 (F) Alizarina roja

3.1.3 Instrumentación

- Lector de placas de 96 pocillos (Servicio de Cultivo de Tejidos, Servicio de Apoyo a la investigación (SAI), Universidad de Murcia) modelo FLUOstar Omega (BMG Lab. Technologies, USA), que realiza medidas de absorbancia en placas múltiples de 96 pocillos, y que es capaz de medir absorbancia (220-850 nm), fluorescencia y luminiscencia (Fig.20).

Fig. 20: Lector de placas FLUOstar Omega



- Microscopio óptico (Servicio de Cultivo de Tejidos, SAI, Universidad de Murcia) Nikon Eclipse TE2000-U (Nikon corp; Japón) equipado con contraste de fases, objetivos de 4, 10, 20 y 40 aumentos y epifluorescencia. Esta acoplado a un sistema de grabación de video y fotografía digital.

Fig. 21: Microscopio Óptico Nikon Eclipse TE2000-U



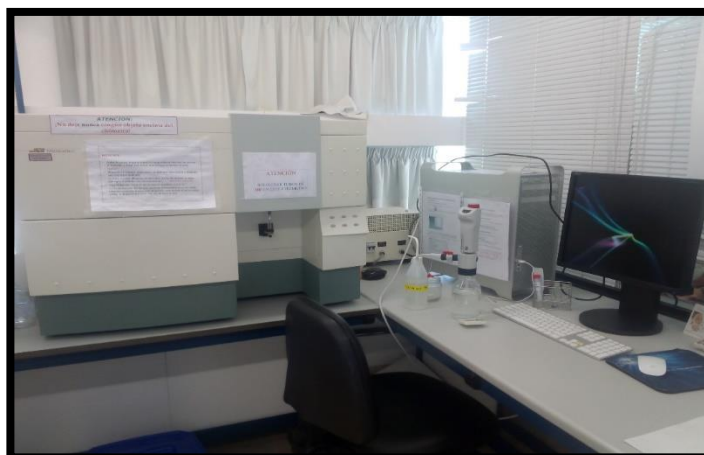
- Irradiador de rayos X (Servicio de Radioprotección y Residuos, SAI, Universidad de Murcia) de la marca YXLON (YXLON International AS, Dinamarca) de 200 kilovoltios y 4,5 miliamperios, que consta de una unidad control modelo SMART 583 E y un tubo de rayos X modelo SMART 200 E (Fig. 22).

Fig. 22: Irradiador de Rayos X YXLON



- Citómetro de flujo (Servicio de Cultivo de Tejidos, SAI, Universidad de Murcia) modelo FACSCalibur™ (Becton Dickinson, EEUU) equipado con láser de argón de 15mW a 488nm y detectores para fluorescencia a longitudes de onda aproximadas de 530, 585 y 661nm (Fig. 23)

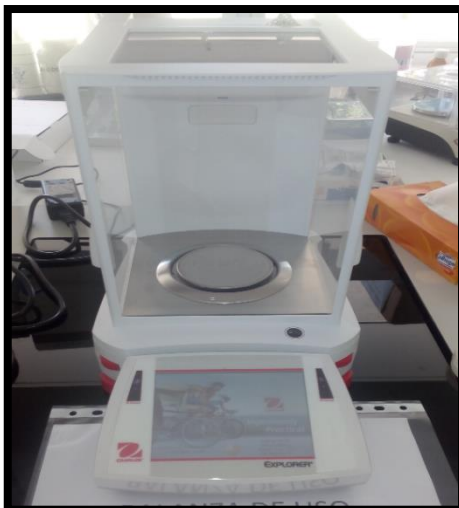
Fig. 23: Citómetro de flujo FACSCalibur™





- Balanza de precisión (SAI, Servicio de cultivo de Tejidos) Ohaus Explorer (Ohaus Corporation; EE.UU). Es capaz de pesar desde 1 miligramo a 220 gramos.

Fig. 24: Balanza de precisión Ohaus explorer

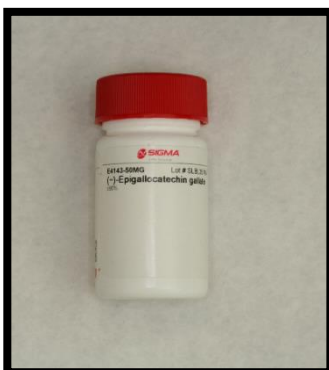


3.1.5 Agentes

En nuestros ensayos, hemos usado distintos agentes. Todos ellos fueron disueltos en sus respectivos vehículos para hacer soluciones stock de 10 mM y ser congelados en múltiples viales a -20°C . Cuando realizábamos un experimento, descongelábamos los viales previamente al experimento para realizar las diluciones necesarias. A las células control (células sin tratamiento alguno) se les añadía el vehículo usado para disolver los agentes.

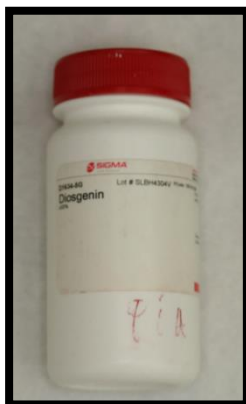
- Extracto concentrado de epigallocatequin-3-galato (Sigma-Aldrich Química, S.A. Madrid. España) procedente de *Camellia sinensis* al $\geq 97\%$, soluble en DMSO y PBS (Fig. 25).

Fig. 25: Extracto concentrado de EGCG



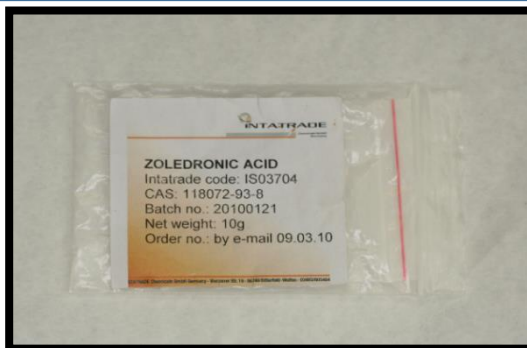
- Extracto concentrado de diosgenina (Sigma-Aldrich Química, S.A. Madrid. España) procedente de *Agave Sisalana* $\geq 93\%$, soluble en etanol (Fig. 26).

Fig. 26: Extracto concentrado de diosgenina



- Ácido Zoledrónico procedente de Intatrade Chemical GmbH (Muldestausee, Alemania), soluble en PBS (Fig.27)

Fig. 27: Ácido Zoledrónico



- 5-Fluorouracilo procedente de Sigma-Aldrich (Madrid. España), soluble en DMSO (Fig.28)

Fig. 28: 5-fluorouracilo





3.2 Métodos

3.2.1 Método de cultivo

El material utilizado era previamente esterilizado y manipulado en condiciones de esterilidad en cabinas de flujo laminar vertical Cultair modelo ASB II (Fig. 29). Los cultivos fueron establecidos a partir de viales criocongelados en nitrógeno líquido. Los viales sufrían una descongelación rápida para evitar el daño producido por el DMSO presente en el medio de congelación. Mezclábamos las células recién descongeladas con más medio de cultivo en un tubo de 50 ml para diluir el DMSO y procedíamos a centrifugar. Resuspendíamos las células en 2 ml de medio y las contábamos con azul tripán mediante cámaras de recuento automáticas o manuales para ser sembradas en frascos de 75 cm y 25 cm², según la densidad requerida por cada línea celular.

El crecimiento y replicación de las células podía ser observado por un microscopio invertido de contraste de fases. Cada 2-3 días el medio de cultivo era removido y medio nuevo era añadido. Al llegar a una confluencia cercana al 70%, realizábamos el subcultivo de la línea celular. Para ello añadíamos al frasco de cultivo 2ml de tripsina con ácido etilendiaminotetracético (EDTA), incubábamos a 37°C las células durante 5-7 minutos (hasta que se habían despegado del frasco) y posteriormente añadíamos más medio para inactivar la tripsina mediante el suero presente en el medio. Una vez despegadas, recogíamos todo el medio, lo metíamos en un tubo de ensayo y lo centrifugábamos a 200 G durante 10 minutos, para poder eliminar el medio y quedarnos con las células que formaban un sedimento al final del tubo.

Fig. 29: Cabina de flujo laminar vertical Cultair modelo ASB II





Por último añadíamos 2 ml de medio en el tubo y resuspendíamos, para finalmente poder hacer el recuento y sembrar el número de células deseadas para cada experimento.

3.2.2 Diseño del estudio

El manejo de los cultivos y la realización de los experimentos fueron hechas por el mismo investigador en las mismas condiciones.

Antes de realizar los experimentos, congelábamos varios criotubos de células para hacer un stock. Una vez descongeladas, les realizábamos varios subcultivos a las células para que volvieran a su metabolismo normal antes de hacer experimentos. Por otro lado, hicimos curvas de crecimiento para saber la concentración óptima de células que sembrar para los experimentos. Si la línea superaba un determinado número de pases indicado por el proveedor, éstas eran desechadas y se volvía a descongelar otro vial de células de pases anteriores.

Siempre dejábamos un mínimo de 24 horas después de sembrar las células para que éstas estuvieran adheridas correctamente a la superficie donde habían sido sembradas y recuperaran su metabolismo normal. Posteriormente se añadían los tratamientos.

La siguiente sección la vamos a dividir en tres bloques.

Tabla 5: Diseño de los estudios 1, 2 y 3

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	LÍNEA CELULAR	VARIABLES DEL ESTUDIO
<u>ESTUDIO 1</u> Efecto quimioterapéutico de los agentes antirresortivos - Ácido zoledrónico, - Diosgenina - Epigalo-3-catequingalato(EGCG)	Línea PE/CA-PJ15	✓ VIABILIDAD CELULAR ✓ APOPTOSIS CELULAR ✓ MIGRACIÓN CELULAR ✓ CICLO CELULAR
<u>ESTUDIO 2</u> Determinación combinación 5-Fluorouracilo - Epigalo-3-catequingalato(EGCG) - Radioterapia	Líneas PE/CA-PJ15 y línea H357.	✓ VIABILIDAD ✓ MIGRACIÓN ✓ CICLO CELULAR
<u>ESTUDIO 3</u> Análisis de asociación - Ácido zoledrónico - Epigalo-3-catequingalato(EGCG)	Línea celular SAOS-2	✓ VIABILIDAD ✓ MIGRACIÓN, ✓ MINERALIZACIÓN ✓ DEPOSICIÓN DE COLÁGENO



3.2.2.1 ESTUDIO 1: POTENCIAL QUIMIOTERAPÉUTICO DEL ÁCIDO ZOLEDRÓNICO, DIOSGENINA Y EGCG SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER ORAL

En este bloque estudiaremos la acción del ZA, DG y EGCG sobre la línea de cáncer oral PE/CA-PJ15 midiendo distintos parámetros, como la viabilidad, apoptosis, migración y análisis del ciclo celular.

Tabla 6: Diseño del estudio 1

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	LÍNEA CELULAR	VARIABLES DEL ESTUDIO
ESTUDIO 1 Efecto quimioterapéutico de los agentes antirresortivos - Ácido zoledrónico, - Diosgenina - Epigalo-3-catequingalato(EGCG)	Línea PE/CA-PJ15	✓ VIABILIDAD CELULAR ✓ APOPTOSIS CELULAR ✓ MIGRACIÓN CELULAR ✓ CICLO CELULAR

Tabla 7: Ensayos realizados en el estudio 1

VIABILIDAD CELULAR	
Línea celular	PE/CA-PJ15
Dosis	EGCG, DG y ZA (5, 25, 50 y 100 μ M)
	Combinación: 25 μ M DG+ 50 μ M EGCG 25 μ M DG+ZA 50 μ M 50 μ M EGCG +ZA 50 μ M 25 μ M DG+ 50 μ M EGCG+50 μ M ZA
Tiempo	24, 48 y 72 horas
APOPTOSIS CELULAR	
Línea celular	PE/CA-PJ15
Dosis	EGCG y ZA (50 y 100 μ M) DG (25 y 50 μ M)
Tiempo	24, 48 y 72 horas
MIGRACION CELULAR	
Línea celular	PE/CA-PJ15
Dosis	EGCG y ZA (50 y 100 μ M) DG (25 y 50 μ M)
Tiempo	4 y 8 horas
CICLO CELULAR	
Línea celular	PE/CA-PJ15
Dosis	EGCG y ZA (25 y 50 μ M) DG (10 y 25 μ M)
Tiempo	24 y 48 horas

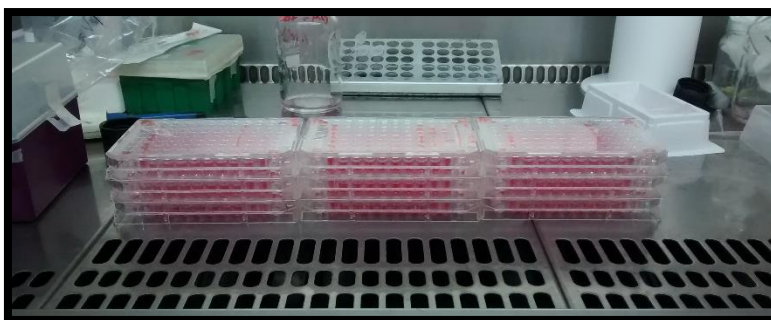


Estudio del efecto de ZA, DG y EGCG sobre la viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad celular hicimos el ensayo de MTT. Lo hacemos usando la técnica descrita por Carmichael y cols (173) adaptada a las condiciones de nuestro cultivo. Las células fueron cultivadas a una densidad de 5000 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Tras 24 horas, las células eran tratadas con distintas concentraciones de los agentes (5, 25, 50, 100 μ M). Por otro lado hicimos otro MTT en las mismas condiciones con la combinación de los agentes (DG+EGCG, DG+ZA, EGCG+ZA Y DG+EGCG+ZA) usando las siguientes dosis: DG 25 μ M, EGCG y ZA 50 μ M. Los experimentos fueron realizados con un mínimo de 6 réplicas

A las 24, 48 y 72 horas después, el medio era sustraído y las células incubadas con MTT (1mg/ml) durante 4 horas. Entonces el exceso de MTT era eliminado y se añadía 100 μ L de DMSO para disolver el formazano metabolizado. La densidad óptica fue medida usando un espectrofotómetro Multiskan MCC/340P (LabSystems, Helsinki, Finlandia) leyendo a una longitud de onda de 570 nm y a una longitud de referencia de 690 nm.

Fig. 30: Placas de 96 pocillos con células sembradas para realizar el MTT

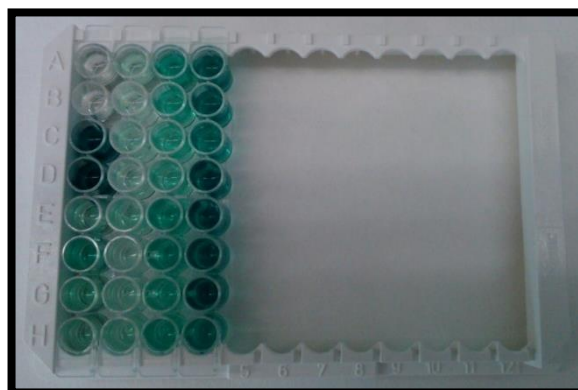


Estudio del efecto de ZA, DG y EGCG sobre la apoptosis celular

Cell Death Detection ELISA PLUS kit (Roche diagnostics GmbH; Alemania) fue utilizado para cuantificar la apoptosis en las células tratadas, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células fueron sembradas a una densidad de 5000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos por cuádruplicado. 24, 48 y 72h después del tratamiento (EGCG y ZA: 50 y 100 μ M; DG: 25 y 50 μ M), el extracto del citosol fue transferido a una placa de 96 pocillos cubierta con estreptavidina e incubado con el anticuerpo correspondiente para la detección apoptótica durante 2 horas a temperatura ambiente. La absorbancia fue medida usando el espectrofotómetro lector de placas Multiskan MCC/340P a una longitud de onda de 405 nm y otra de referencia a 490 nm.



Fig. 31 Placas de 96 pocillos con células para cuantificar la apoptosis



Estudio del efecto de ZA, DG y EGCG sobre la migración celular

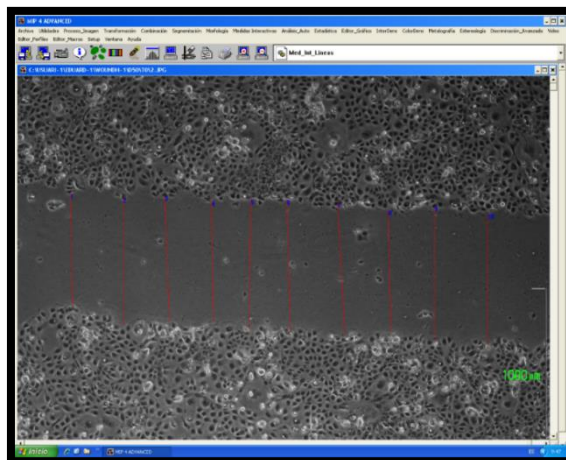
Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos hasta llegar a la confluencia adecuada en monocapa. Después se hizo una herida usando una punta de pipeta estéril de 200 μ l y el medio fue removido con las células en suspensión. Tras esto, añadimos el nuevo medio con el tratamiento (EGCG y ZA: 50 y 100 μ M; DG: 25 y 50 μ M). Las imágenes de la migración a la herida fueron tomadas con un microscopio con cámara digital acoplada (Nikon Eclipse TE2000-U, Nikon corp., Japan) en el momento de hacer la herida, a las 4 y 8 horas después. El test se hizo por triplicado en dos ensayos independientes.

Las distancias de los bordes de la herida se obtuvieron por conteo de píxeles con un mínimo de 10 zonas por herida y seleccionadas de forma aleatoria usando el software de imagen MIP-4 (CID, Barcelona, Spain) y aplicando la siguiente formula(174):

$$\text{distancia de migración} = \frac{\text{migración inicial} - \text{migración final}}{2}$$



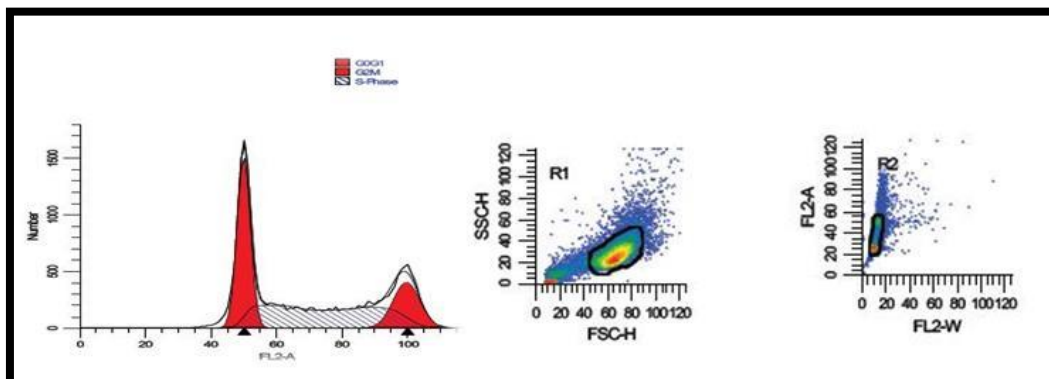
Fig. 32: Surco producido en la monocapa de células para medir la migración celular



Estudio del efecto de ZA, DG y EGCG sobre el ciclo celular

Para estudiar el ciclo celular, teñimos el ADN celular con yoduro de propidio para poder observarlas a través de un citómetro de flujo. Doscientas mil células fueron sembradas en frascos de 25 cm² y tratados con 25 y 50 μ M de ZA, 50 y 100 μ M de EGCG, 10 y 25 μ M de DG por 24 y 48 horas. Entonces, antes de alcanzar el 80% de confluencia, las células eran recolectadas con tripsina y centrifugadas a 200G durante 10 minutos. Posteriormente fueron fijadas en 70% etanol en PBS a 4° durante 30 minutos. Por último fueron incubadas y teñidas con RNasa (100 μ g/ml) y yoduro de propidio (40 μ g/ml). Las células teñidas fueron analizadas con un citómetro de flujo (BD FACSCalibur System, CA, USA) registrando más de 20 000 eventos. Los datos fueron procesados con el software CELLQUEST y analizados con MODFIT (Becton Dickinson). Las células fueron clasificadas en tres fases del ciclo celular, G0-G1, G2-M o S. Los experimentos se hicieron por duplicado y se obtuvieron los valores de la media.

Fig. 33: Análisis de las distintas fases celulares capturando más de 20.000 eventos





3.2.1.2 ESTUDIO 2: EVALUCIÓN DE LA COMBINACIÓN DE 5-FLUOROURACILO CON EGCG Y

RADIOTERAPIA EN LAS LÍNEAS DE CÁNCER ORAL PE/CA-PJ15 y H357

En este bloque estudiaremos los efectos de la combinación de 5-FU con EGCG y radioterapia sobre las líneas de cáncer oral PE/CA-PJ15 y H357.

Tabla 8: Diseño del estudio 2

OBJETIVO ESPECÍFICO	LÍNEA CELULAR	VARIABLES DEL ESTUDIO
ESTUDIO 2 Determinación combinación • 5-Fluorouracilo • Epigalo-3-catequingalato(EGCG) • Radioterapia	Líneas PE/CA-PJ15 y Línea H357.	✓ VIABILIDAD ✓ MIGRACIÓN ✓ CICLO CELULAR

Tabla 9: Ensayos realizados en el estudio 2

VIABILIDAD		
Línea celular	PE/CA-PJ15	H357
Dosis	5-FU: 3.12; 6.25; 12.5; 25; 50; 100 y 200 μ M EGCG: 100 μ M	5-FU: 3.12; 6.25; 12.5; 25; 50; 100 y 200 μ M EGCG: 100 μ M
Dosis de Irradiación	0Gy, 2.5Gy, 5Gy	0Gy, 2.5Gy, 5Gy
Tiempo	48 horas	48 horas
MIGRACIÓN		
Línea celular	PE/CA-PJ15	H357
Dosis	5-FU: 3.12; 6.25; 12.5; 25; 50; 100 y 200 μ M EGCG: 100 μ M	5-FU: 3.12; 6.25; 12.5; 25; 50; 100 y 200 μ M EGCG: 100 μ M
Dosis de Irradiación	0Gy, 2.5Gy, 5Gy	0Gy, 2.5Gy, 5Gy
Tiempo	5 y 10 horas	5 y 10 horas
CICLO CELULAR		
Línea celular	PE/CA-PJ15	H357
Dosis	5-FU: 3.12; 6.25; 12.5; 25; 50; 100 y 200 μ M EGCG: 100 μ M	5-FU: 3.12; 6.25; 12.5; 25; 50; 100 y 200 μ M EGCG: 100 μ M
Dosis de Irradiación	0Gy, 2.5Gy, 5Gy	0Gy, 2.5Gy, 5Gy
Tiempo	48 horas	48 horas



Ensayo de los Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG sobre la viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad celular hicimos el ensayo de MTT. Lo hacemos usando la técnica descrita por Carmichael y cols (173) adaptada a las condiciones de nuestro cultivo. 3,200 (H357) y 5000 (PE/CA-PJ15) células fueron sembradas por pocillo en placas de 96 pocillos. Tras 24 horas de incubación, irradiábamos las células con distintas dosis (0, 2.5 y 5 Gy) y 30 min después eran tratadas con distintas concentraciones (3.12; 6.25; 12.5; 25; 50; 100 y 200 μ M) de 5-FU sólo o en combinación con 100 μ M de EGCG. 48 horas después, el medio fue eliminado y las células incubadas con MTT (1mg/ml) durante 4 horas. A continuación se retiraba el MTT no metabolizado y se añadía 100 μ L de DMSO para disolver el formazano. Por último, procedíamos a la lectura de la placa usando el espectrofotómetro Multiskan MCC/340P, midiendo con una longitud de onda de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 690nm. El ensayo se hizo por triplicado con 4 réplicas de cada muestra.

Ensayo del efecto de la radiación, 5-FU y EGCG sobre la migración celular

Las células fueron sembradas hasta formar una monocapa en placas de 6 pocillos. Tras esto, procedíamos a irradiar las células (0, 2.5 y 5 Gy) y 30 min después, hacíamos una herida con una punta estéril de pipeta de 200 μ L, eliminando el medio con las células en suspensión y añadiendo nuevo medio con 25 y 50 μ M de 5-FU sólo o en combinación con 100 μ M de EGCG. La distancia entre los extremos de la herida fue medida a las 0, 5 y 10 horas tras la realización de la herida, usando una cámara digital adherida a un microscopio (Nikon Eclipse TE2000-U, Nikon corp., Japan). La distancia de migración de las células fue calculadas mediante el conteo de pixeles usando el software NIH Image J (National Institutes of Health, Bethesda, USA), usando la fórmula de Valster y cols (174). El ensayo fue realizado en dos experimentos independientes con tres repeticiones.

Ensayo del efecto de la radiación, 5-FU y EGCG sobre el ciclo celular

Para estudiar el ciclo celular, teñimos el ADN celular con yoduro de propidio para poder observarlas a través de un citómetro de flujo. Se sembraron 200 000 células en placas de 6 pocillos y tras 24 horas de incubación, se irradiaban las células (0, 2.5 y 5 Gy) y se añadía 25 y 50 μ M de 5-FU sólo o en combinación con 100 μ M de EGCG. 48 horas después, las células eran despegadas con tripsina y fijadas en etanol con PBS al 70%. Por último, eran incubadas con yoduro de propidio (40 μ g/ml) y RNAsa (100 μ g/ml). Las células teñidas fueron analizadas con un citómetro de flujo (BD FACSCalibur System, CA, USA), registrando más de 20.000 eventos. El procesamiento de los datos



se hizo mediante el software cellquest (BD Biosciences, San José, Ca, USA) y el análisis de las fases celulares mediante el software modfit (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Las células se clasificaron en tres fases del ciclo celular: G0-G1, G2-M o S. El ensayo fue realizado por duplicado.

3.2.1.3. ESTUDIO 3: EFECTOS DEL ÁCIDO ZÓLEDRÓNICO SÓLO O EN COMBINACIÓN CON EGCG SOBRE LAS CELULAS CON FENOTIPO DE OSTEOLASTO SAOS-2

En este bloque evaluaremos los efectos del ácido zoledrónico sólo y en combinación con EGCG sobre la línea de fenotipo de osteoblasto SAOS-2

Tabla 10: Diseño del estudio 3

OBJETIVO ESPECÍFICO	LÍNEA CELULAR	VARIABLES DEL ESTUDIO
<u>ESTUDIO 3</u> Análisis de asociación - Ácido zoledrónico - Epigalo-3-catequingalato(EGCG)	Línea celular SAOS-2	✓ VIABILIDAD ✓ MIGRACIÓN ✓ MINERALIZACIÓN ✓ DEPOSICIÓN DE COLÁGENO

Tabla 11: Ensayos realizados en el estudio 3

VIABILIDAD	
Línea celular	SAOS-2
Dosis	EGCG (0.01; 0.1; 1; 5 y 10 µM)
	ZA (0.01; 0.1; 1; 5 y 10 µM) ZA (0.01; 0.1; 1; 5 y 10 µM) + 10 µM EGCG
Tiempo	72 horas
MINERALIZACIÓN	
Línea celular	SAOS-2
Dosis	ZA (0.1; 1 y 5 µM)
	ZA (0.1; 1 y 5 µM) + 10 µM EGCG
Tiempo	7 y 14 días
COLÁGENO	
Línea celular	SAOS-2
Dosis	ZA (0.1; 1 y 5 µM)
	ZA (0.1; 1 y 5 µM) + 10 µM EGCG
Tiempo	7 y 14 días
MIGRACIÓN	
Línea celular	SAOS-2
Dosis	ZA (0.1; 1 y 5 µM)
	ZA (0.1; 1 y 5 µM) + 10 µM EGCG
Tiempo	6 y 24 horas



Estudio del efecto de ZA, EGCG y ZA+EGCG sobre la viabilidad celular

La viabilidad celular fue medida usando el ensayo de MTT, como fue descrito por Carmichael y cols (173) adaptado a las condiciones de nuestro cultivo de estudio. Se sembraron 5000 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Tras 24 horas de incubación, las células fueron tratadas con 0,01; 0,1; 1; 5 y 10 μM de ZA y EGCG y la combinación de ZA y 10 μM EGCG. 72 horas después, se eliminaba el medio y las células eran incubadas con MTT (1mg/ml) durante 4 horas. El formazano fue disuelto en 100 μL de DMSO y medido a una longitud de onda de 570 nm y a una longitud de referencia de 690 nm mediante el espectrofotómetro Multiskan MCC/340P. El experimento se hizo por triplicado.

Estudio del efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la mineralización

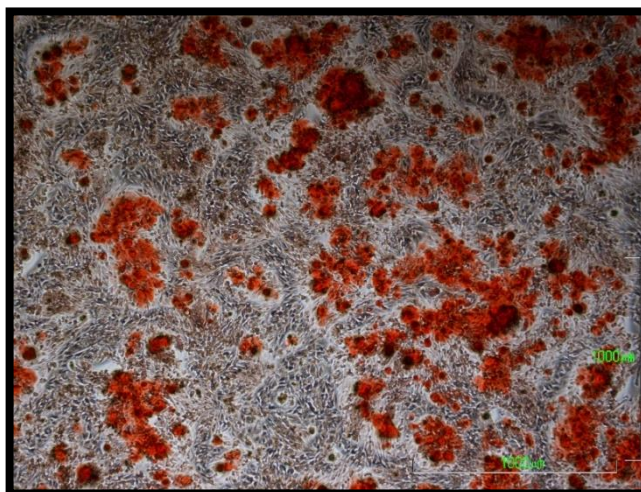
Las células fueron sembradas a una densidad de 25×10^3 células/cm² en placas de 24 pocillos con medio de crecimiento durante 3 días hasta alcanzar confluencia aproximada del 95%. Entonces cambiamos el medio de crecimiento por el medio osteogénico (OM), que consiste en suplementar el medio de crecimiento con 7,5 mM de β -glicerolfosfato y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido ascórbico para inducir la mineralización de las células (175). Simultáneamente, añadíamos distintas dosis de ZA en solitario y en combinación con EGCG disuelto en el medio osteogénico, mientras que el control era tratado con medio osteogénico únicamente. Las dosis usadas fueron 0,1, 1 y 5 μM de ZA y esas dosis de ZA en combinación con 10 μM de EGCG. Cada 3-4 días el medio era removido y se añadía medio osteogénico nuevo con los tratamientos.

7 y 14 días después, las células eran fijadas y teñidas con Alizarina roja. Para ello, eliminábamos el medio y lavábamos las células tres veces con PBS. Luego añadíamos formaldehído al 4% y lo dejábamos a temperatura ambiente durante 15 minutos para que se fijaran las células. Después de que estuvieran fijadas, lavábamos nuevamente las células 3 veces con agua destilada y añadíamos 1 ml de alizarina roja 40 mM con un pH entre 4.1-4.3, dejándolo incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Tras esto, eliminábamos la tinción que no había sido fijada y lavábamos las células 3 veces con agua destilada, tomábamos fotos y congelábamos la placa a -20°C hasta la cuantificación.

La cuantificación se hizo mediante la extracción con ácido acético como describió Gregory y cols (176) adaptado a nuestras condiciones. Añadimos 200 μL de 10% ácido acético e incubamos en agitación durante 30 min. Luego calentamos la solución durante 10 min a 85°C y dejamos enfriar en hielo, para posteriormente centrifugarlo a 20,000 g durante 15 min. El sobrenadante fue

transportado a otro tubo y se le añadió 10% de Hidróxido de amonio para ajustar el pH a 4.2. Luego se pasó 50 μ l/pocillo a una placa de 96 pocillos para leer la absorbancia a 405 nm en el lector de placas Multiskan MCC/340P. El experimento fue realizado por triplicado.

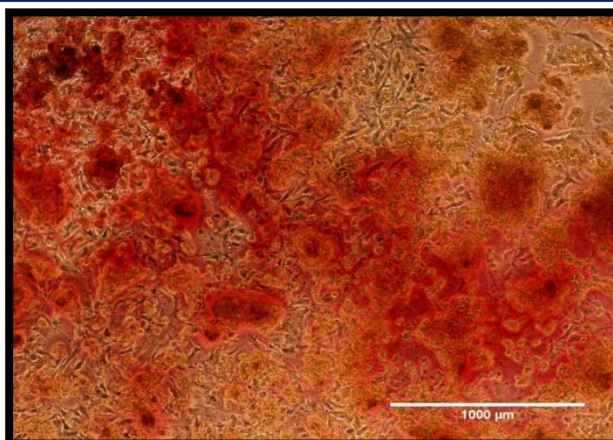
Fig. 34: Imagen 10X de las nódulos de calcio teñidos con Alizarina Roja



Estudio del efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la deposición de colágeno

El colágeno producido por los osteoblastos fue cuantificado usando la tinción de Sirius Red adaptada a nuestras condiciones de estudio (177). Las células fueron sembradas a una densidad de 25×10^3 células/cm² en placas de 96 pocillos con medio de crecimiento durante 3 días. Al tercer día añadíamos el medio osteogénico con los tratamientos (0.1, 1 y 5 μ M de ZA y esas mismas dosis de ZA en combinación con 10 μ M de EGCG). El medio era renovado junto con los tratamientos cada 3-4 días y el día 7 y 14, las células eran lavadas en PBS y puestas a secar durante la noche a 37°C. Al día siguiente añadíamos 100 μ L de la tinción de Sirius Red (Direct Red 80 disuelto al 0.1% en ácido pícrico saturado) y lo poníamos en agitación suave durante una hora a temperatura ambiente. Luego lavamos con 10 mM HCL tres veces para eliminar todo el resto de la tinción no fijada. Para cuantificarlo, disolvemos la tinción en 0.2 ml de 0.1N NaOH en agitación y medimos la absorbancia a 540 nM. El experimento fue realizado por triplicado.

Fig. 35: Imagen 10X de las tinción de Sirius Red sobre células SAOS-2



Estudio del efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la migración celular

Las células fueron sembradas en placas de seis pocillos hasta obtener una monocapa. Luego, se hicieron heridas con la punta estéril de una pipeta de 200 μ l y se eliminó el medio. Nuevo medio fue añadido con el tratamiento (0.1, 1 y 5 μ M de ZA y esas dosis de ZA en combinación con 10 μ M de EGCG). La migración de las células a la herida fue fotografiada a las 6 y 24 horas tras la herida, usando un microscopio invertido con cámara digital (Nikon Eclipse TE2000-U, Nikon corp., Japan). La distancia entre los bordes fue medido mediante conteo de pixeles con el software NIH Image J (National Institutes of Health, USA, Bethesda) y aplicando la fórmula de Valster y cols (174). El experimento fue realizado por triplicado.

3.2.1.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis fueron realizados mediante el software SPSS V.20 (SPSS Inc., Chicago, IL USA). Para el análisis comparativo de las variables se consideró que la hipótesis nula (existencia de una relación de independencia entre las variables) se debería rechazar (cuando esta se rechaza, se considera que la relación entre las variables es de dependencia) cuando la probabilidad mínima de rechazo (p-valor) no sea superior al nivel crítico estándar de 0.05. Para ello, se han realizado los siguientes contrastes para el estudio de las asociaciones entre las variables cuantitativas continuas:

-Test «t de Student»: Los datos cuantitativos fueron analizados con el test «t de Student» para comparar dos medias (de muestras independientes), cuando eran dos las variables que se comparaban.



-Test «ANOVA» de un factor: Para comparar tres o más medias (de muestras independientes), cuando eran tres o más las variables que se comparaban.

-Prueba de Levene: para evaluar la igualdad de las varianzas para una variable calculada para dos o más grupos.

Los resultados están expresados como media $\pm$ desviación estándar, con significancia estadística indicada cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS ESTUDIO 1: POTENCIAL QUIMIOTERAPÉUTICO DEL ÁCIDO ZOLEDRÓNICO, DIOSGENINA Y EGCG SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER ORAL.

4.1.1 Efecto de EGCG, DG y ZA en la viabilidad celular de PE/CA-PJ15

El tratamiento de la línea celular PE/CA-PJ15 con EGCG, DG y ZA con distintas dosis (5, 25, 50 y 100 μ M) durante 24, 48 y 72 horas provocó diferentes efectos sobre la viabilidad de las células estudiadas.

- **Ácido Zoledrónico**

La acción del ZA fue tiempo-dependiente, pero no dosis-dependiente hasta las 72 horas (Fig. 36). A las 24 horas se puede observar que hay una pequeña disminución de la proliferación celular, siendo la más pronunciada y significativa a 5 μ M ($p < 0.001$).

A las 48 horas podemos observar como empieza a hacerse visible con mayor efectividad los efectos citotóxicos del ZA. Aún sin actuar de forma dosis-dependiente, reduce de manera significativa la proliferación celular a 50 y 100 μ M ($p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente)

A las 72 horas los efectos del ZA causan una notable disminución de la viabilidad celular, de manera dosis-dependiente. La dosis más potente fue la de 100 μ M, reduciendo la viabilidad celular respecto al control en un 4.17% de manera significativa ($p < 0.001$) (tabla 12)

Fig. 36: Efectos de ZA a 24, 48 y 72 horas sobre la viabilidad celular de las células PE/CA-PJ15. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control**

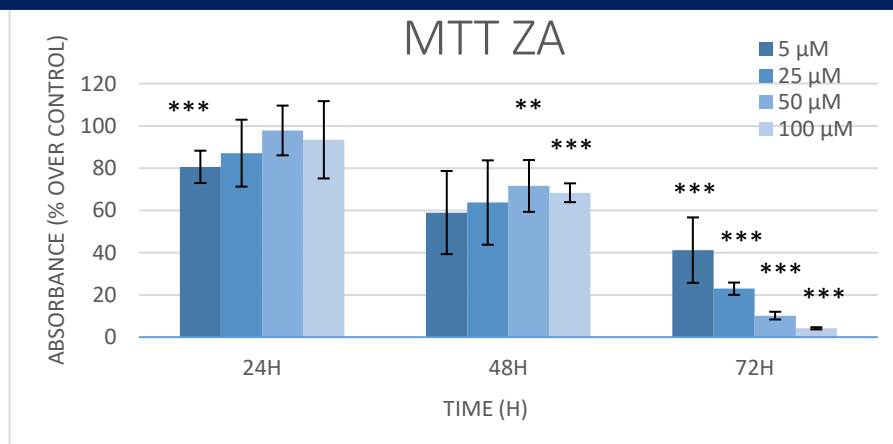




Tabla 12: Efectos de ZA a 24, 48 y 72 horas sobre la viabilidad celular de las células PE/CA-PJ15. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control**

	24 H	48 H	72 H
5 μM	80,59 $\pm$ 7,66***	58,96 $\pm$ 19,67	41,17 $\pm$ 15,49***
25 μM	87,08 $\pm$ 15,83	63,71 $\pm$ 19,97	22,92 $\pm$ 2,91***
50 μM	97,81 $\pm$ 11,78	71,56 $\pm$ 12,26**	10,19 $\pm$ 1,82***
100 μM	93,40 $\pm$ 18,30	68,33 $\pm$ 4,45***	4,17 $\pm$ 0,52***

- Diosgenina**

Diosgenina presenta una acción dosis-dependiente a todos los tiempos (Fig. 37). A las 24 horas, causa una gran y significativa reducción de la proliferación siendo 50 y 100 μ M las dosis más efectivas ($p < 0.001$). La concentración de 5 μ M, como observamos también en el resto de los tiempos, produce el efecto contrario, aumentando la proliferación de la línea celular y especialmente significativa a las 24 horas ($p < 0.01$)

A las 48 horas, vemos como la viabilidad disminuye de forma pronunciada y significativa a excepción de 25, 50 y 100 μ M ($p < 0.001$), siendo 100 μ M la más efectiva de las tres sustancias.

A las 72 horas, podemos observar de nuevo como la dosis de 25 μ M y superiores son capaces de reducir la proliferación de manera significativa ($p < 0.001$) y especialmente 100 μ M, reduciendo la proliferación y quedando solo un 1.70 % de células viables respecto al control ($p < 0.001$) (tabla 13).



Fig. 37: Efectos de DG a 24, 48 y 72 horas sobre la viabilidad celular de las células PE/CA-PJ15. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control**

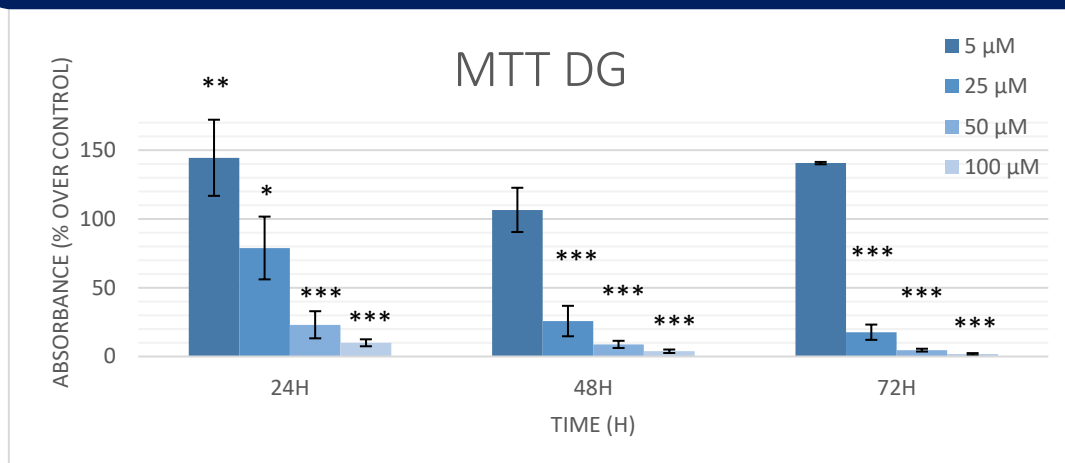


Tabla 13: Efectos de DG a 24, 48 y 72 horas sobre la viabilidad celular de las células PE/CA-PJ15. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control**

	24 H	48 H	72 H
5 μM	144,46±27,68**	106,59±16,08	140,59±0,86
25 μM	78,89±22,81*	25,77±11,07***	17,66±5,56***
50 μM	23,07±9,86***	8,80±2,61***	4,62±1,03***
100 μM	9,96±2,53***	3,82±1,26***	1,70±0,77***

• EGCG

Como se puede observar a primera vista, EGCG parece aumentar la proliferación a la mayoría de tiempos y dosis (Figura 38). A las 24 horas se da el mayor incremento respecto al control a 50 y 100 μM (p<0.001), siendo todas las dosis por encima del control.

A las 48 horas, la dosis de 5 μM reduce la proliferación celular pero sin ser estadísticamente significativo. El resto de dosis siguen aumentando la proliferación celular, siendo 50 μM la dosis que más la aumenta de forma significativa (p<0.001).



A las 72 horas, podemos observar como la proliferación es un poco más baja que al resto de tiempos pero aún con valores similares al control, siendo significativos a 50 y 100 μM ($p < 0.05$).

Fig.38: Efectos de EGCG a 24, 48 y 72 horas sobre la viabilidad celular de las células PE/CA-PJ15. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.001$ vs. Control**

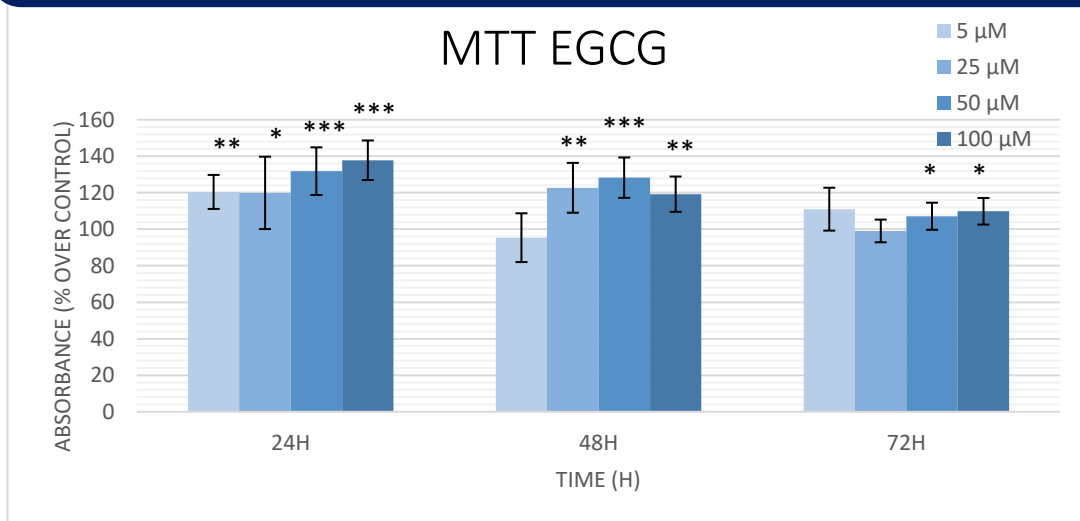


Tabla 14: Efectos de EGCG a 24, 48 y 72 horas sobre la viabilidad celular de las células PE/CA-PJ15. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.001$ vs. Control**

	24	48	72
5 μM	120,44±9,32**	95,37±13,37	110,99±11,75
25 μM	119,91±19,82*	122,69±13,66**	99,06±6,21
50 μM	131,81±13,05***	128,26±11,06***	107,12±7,42*
100 μM	137,79±10,83***	119,21±9,66**	109,83±7,29*

- Combinación de los agentes**

Se combinaron los distintos agentes (DG 25 μM , EGCG y ZA 50 μM) para observar el efecto sobre la proliferación celular a las 24, 48 y 72 horas de exposición (Fig. 39).



A las 24 horas, se puede observar como todas las sustancias reducen la viabilidad celular, siendo la combinación de DG+ZA la disminución más pronunciada y significativa ($p < 0.001$) seguida de cerca por la combinación de DG+EGCG+ZA ($p < 0.001$)

A las 48 horas, podemos observar como las combinaciones de DG+ZA y DG+EGCG+ZA siguen siendo las más efectivas ($p < 0.001$), obteniendo unos resultados muy parejos.

A las 72 horas, todas las combinaciones parecen reducir la viabilidad de manera significativa, siendo la combinación de DG+ZA la más potente de las cuatro ($p < 0.001$).

Fig.39: Efectos de la combinación de ZA, DG y EGCG (E) a 24, 48 y 72 horas sobre la viabilidad celular de las células PE/CA-PJ15. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control**

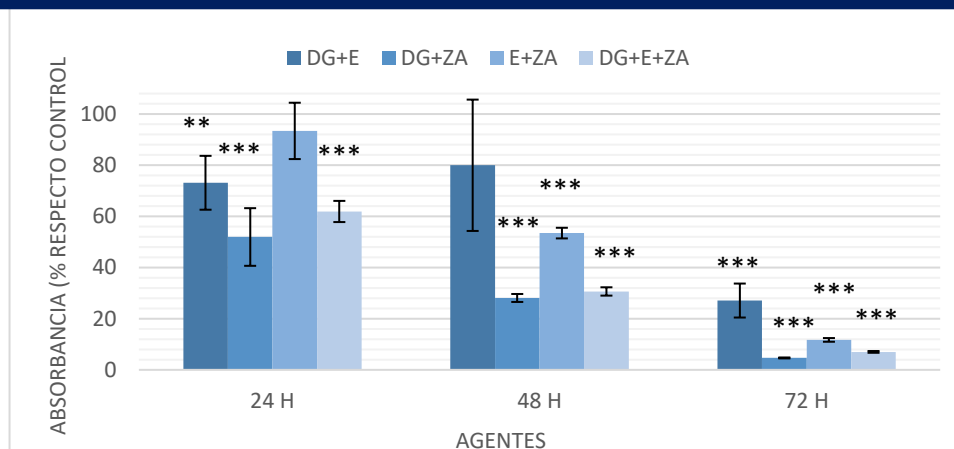


Tabla 15: Efectos de la combinación de ZA, DG y EGCG (E) a 24, 48 y 72 horas sobre la viabilidad celular de las células PE/CA-PJ15. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control**

	24 H	48 H	72 H
DG+E	73,13±10,53**	79,97±25,67	27,1±6,64***
DG+ZA	51,94±11,27***	28,10±1,56***	4,66±0,18***
E+ZA	93,41±11,01	53,46±2,08***	11,71±0,72***
DG+E+ZA	61,91±4,14***	30,65±1,63***	7,02±0,34***



4.1.2 Efectos de EGCG, DG y ZA en la apoptosis celular de PE/CA-PJ15

Los diferentes tratamientos tuvieron distintos efectos sobre la apoptosis celular de la línea de carcinoma oral PE/CA. Las dosis usadas fueron, DG (25 y 50 μ M), ZA (50 y 100 μ M) y EGCG (50 y 100 μ M) y fueron expuestas durante 24, 48 y 72 horas (Fig.40).

A las 24 horas podemos observar como las dosis que más aumentan la apoptosis son 25 y 50 μ M de Diosgenina ($p < 0.05$). 50 μ M de EGCG muestra un valor inferior al control, mientras que 100 μ M un valor ligeramente superior, aunque ninguno de ellos muestra significancia. Sin ser estadísticamente significativo, ZA muestra unos valores ligeramente superiores al control

A 48 horas podemos observar como la sustancia que produce mayor apoptosis celular es el ZA, siendo 100 μ M la que mayor valor da ($p < 0.01$). EGCG tiene unos valores por debajo del control y DG es superior al control, siendo significativa a 25 μ M ($p < 0.05$)

A las 72 horas, podemos ver como EGCG sigue siendo inferior al control y de manera significativa para ambas dosis ($p < 0.01$). DG es superior al control, siendo 50 μ M significativa respecto al control ($p < 0.05$). Con una gran diferencia, ZA es el mayor estimulador de apoptosis de las tres sustancias, siendo 100 μ M la dosis más efectiva ($p < 0.01$).

Fig.40: Efectos de las distintas concentraciones de ZA, DG y EGCG (E) sobre la apoptosis en la línea celular PE/CA-PJ15 tras 24, 48 y 72 horas de exposición. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control**

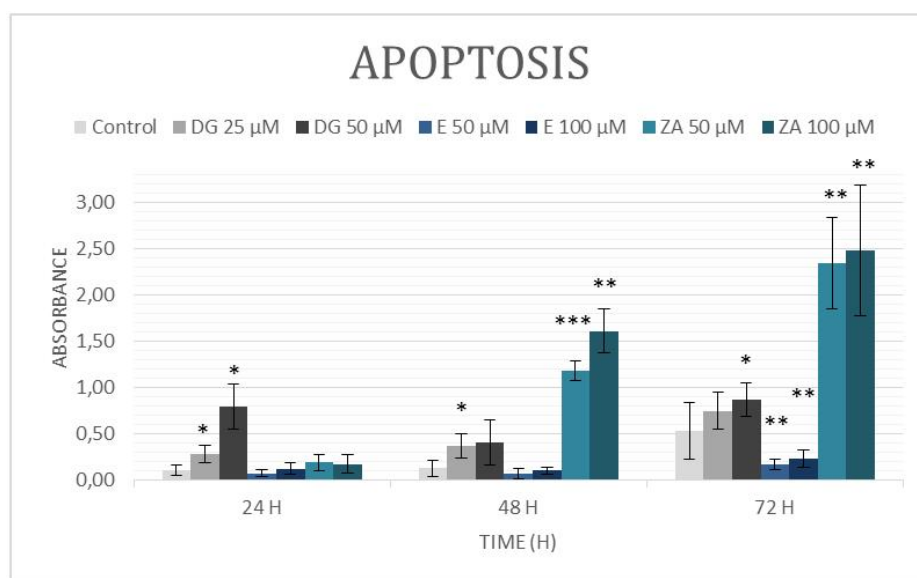




Tabla 16: Efectos de las distintas concentraciones de ZA, DG y EGCG (E) sobre la apoptosis en la línea celular PE/CA-PJ15 tras 24, 48 y 72 horas de exposición. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control**

	24 H	48 H	72 H
Control	0,1040±0,0580	0,1250±0,0891	0,5290±0,3090
E 50 µM	0,0743±0,0354	0,0676±0,0569	0,1710±0,0535**
E 100 µM	0,1233±0,0638	0,1005±0,0329	0,2303±0,0952**
DG 25 µM	0,2835±0,0911*	0,3675±0,1337*	0,7478±0,1963
DG 50 µM	0,7943±0,2442*	0,4075±0,2412	0,8685±0,1850*
ZA 50 µM	0,1888±0,0884	1,1750±0,1049***	2,3350±0,4944**
ZA 100 µM	0,1740±0,0948	1,6070±0,2356**	2,4825±0,7053**

4.1.3 Efectos de EGCG, DG y ZA sobre la migración celular de PE/CA-PJ15

Los tratamientos modificaron la migración celular de las células. Las dosis usadas fueron, DG (25 y 50 µM), ZA (50 y 100 µM) y EGCG (50 y 100 µM) y las medidas fueron tomadas a las 0, 4 y 8 horas después de la herida.

A las 4 horas de exposición al agente se puede observar como todas las dosis a excepción de EGCG 50 µM reducen la migración respecto al control, aunque no todas de forma significativa (Fig. 41). Las dosis que consiguen reducir de forma más efectiva la migración son 50 y 100 µM de ZA, siendo sólo la primera de éstas de manera significativa ($p < 0.01$) y 50 µM de DG ($p < 0.01$).

A las 8 horas de exposición podemos observar un patrón parecido al anterior. Vemos como 25 µM de DG es superior al control, mientras que 50 µM es inferior y de manera significativa ($p < 0.001$). Por otro lado, con EGCG ocurre algo parecido, mientras que el resultado de la dosis de 50 µM es parecido al control, a 100 µM consigue reducir la migración de forma significativa ($p < 0.05$). Tanto 50 µM como 100 µM ZA consiguen reducir la migración de forma significativa ($p < 0.01$). 25 µM DG fue la única dosis que migró una distancia total superior a la del control.



Fig.41: Efectos de EGCG (E), DG y ZA sobre la migración celular de PE/CA-PJ15 a las 4 y 8 horas. Los resultados están expresados como distancia migrada por las células en micrómetros. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control**

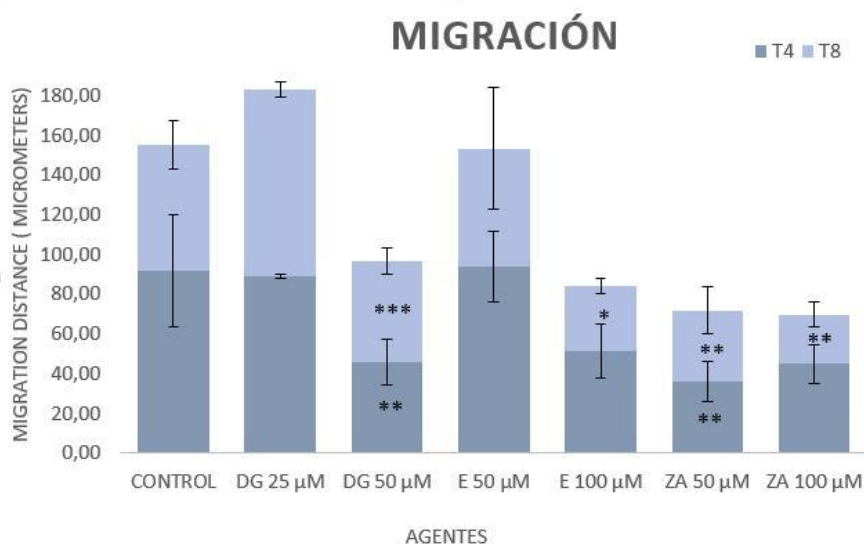
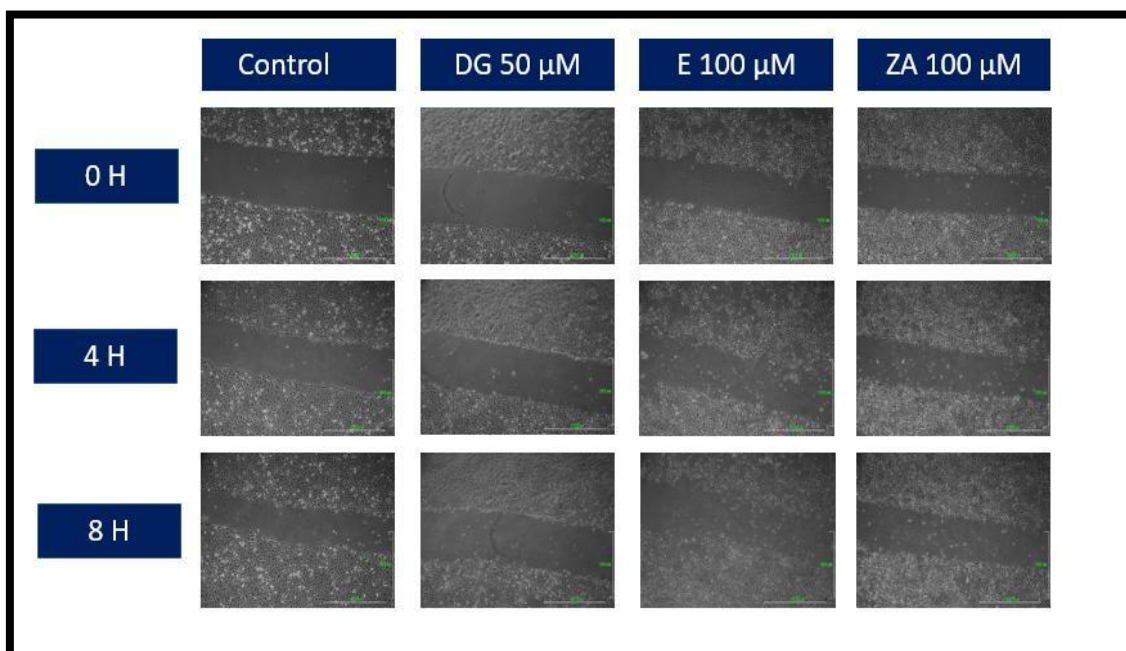


Tabla 17: Efectos de EGCG (E), DG y ZA sobre la migración celular de PE/CA-PJ15 a las 4 y 8 horas. Los resultados están expresados como distancia migrada por las células en micrómetros. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control**

	4 H	8 H
CONTROL	91,81±28,30	63,03±12,17
DG 25 µM	88,90±1	93,91±3,88
DG 50 µM	45,60±11,61**	51,18±6,62***
E 50 µM	93,91±17,81	59,44±30,57
E 100 µM	51,18±13,52	32,57±3,84**
ZA 50 µM	36,05±46,69*	35,77±48,30**
ZA 100 µM	44,75±10,02	24,86±6,15**

Fig.42: Imágenes de la migración celular de las células tratadas con EGCG (E), DG y ZA a las 4 y 8 horas.



4.1.4 Efectos de EGCG, DG y ZA sobre el ciclo celular de PE/CA-PJ15:

La exposición de las células a distintas concentraciones de los agentes durante 24 y 48 horas causó alteraciones del ciclo celular, produciendo distintos efectos dependiendo de los agentes. En cuanto al control, podemos observar cómo a las 24 horas, la fase G0/G1 y S tienen una distribución parecida, mientras que la fase G2/M es menor que ambas (Fig. 43). A las 48 horas vemos como se produce un aumento de la fase G0/G1 en detrimento de la fase S y G2/M. Las dosis usadas fueron DG 10 y 25 μ M, EGCG 50 y 100 μ M y ZA 25 y 50 μ M.

- **24 horas:**

Tras las primeras 24 horas de exposición, se puede observar como a 25 μ M de DG se puede observar un pequeño aumento de la fase G2/M ($p < 0.05$) y de la fase G0/G1 en detrimento de la fase S. En cuanto a EGCG, se puede observar cómo va aumentando ligeramente la fase G1/G0, en detrimento de la fase S, que a 50 μ M se ve significativamente reducida ($p < 0.05$). ZA produce una acumulación en la fase S a expensas de las otras fases, que se hace particularmente significativa a 100 μ M en todas las partes del ciclo ($p < 0.05$)



Fig.43: Efectos ZA, DG y EGCG (E) sobre el ciclo celular de PE/CA-PJ15 a las 24 horas. Las células fueron clasificadas en tres fases. G0/G1, G2/M y S. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control.**

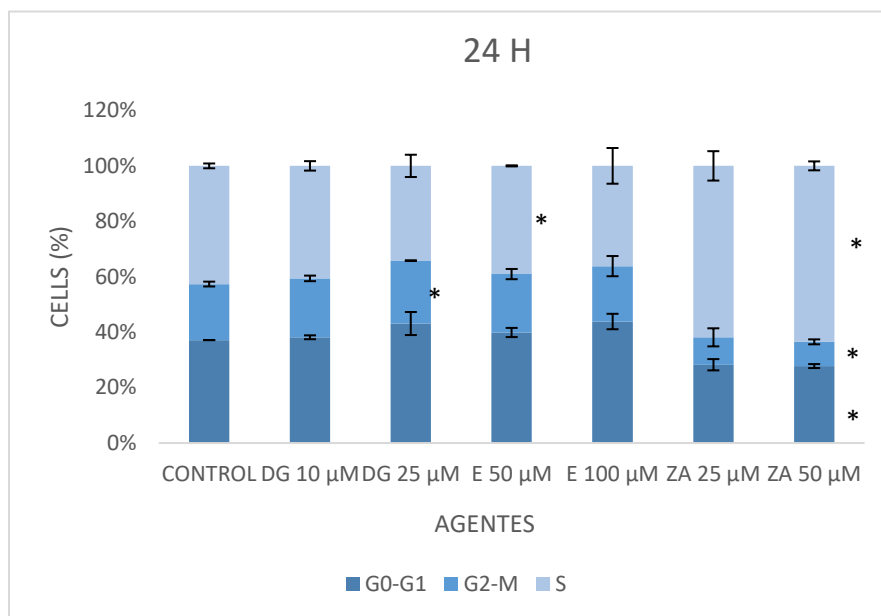


Tabla 18: Efectos ZA, DG y EGCG (E) sobre el ciclo celular de PE/CA-PJ15 a las 24 horas. Las células fueron clasificadas en tres fases. G0/G1, G2/M y S. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control.**

FASE	G0-G1	G2-M	S
CONTROL	37,15±0,01	20,22±0,87	42,64±0,86
DG 10 μM	38,16±0,69	21,24±1,00	40,60±1,70
DG 25 μM	43,12±4,16	22,69±0,13*	34,20±4,02
E 50 μM	39,89±1,65	21,07±1,85	39,05±0,19*
E 100 μM	43,85±2,79	19,98±3,65	36,18±6,44
ZA 25 μM	28,25±2,04	9,89±3,26	61,86±5,30
ZA 50 μM	27,78±0,71*	8,74±0,89*	63,49±1,61*

- **48 horas**

Tras 48 horas de exposición se puede observar cómo se acentúan los efectos vistos anteriormente. DG, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas, aumenta la fase G2/M respecto al control a expensas de la fase S. EGCG secuestra el ciclo celular en la fase G0/G1,



aumentándola de forma significativa a 100 μM ($p < 0.05$). ZA sigue prolongando el ciclo celular en fase S a expensas de las otras fases, siendo ésta diferencia significativa en todas las fases a 100 μM ($p < 0.05$)

Fig.44: Efectos ZA, DG y EGCG (E) sobre el ciclo celular de PE/CA-PJ15 a las 48 horas. Las células fueron clasificadas en tres fases. G0/G1, G2/M y S. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control.**

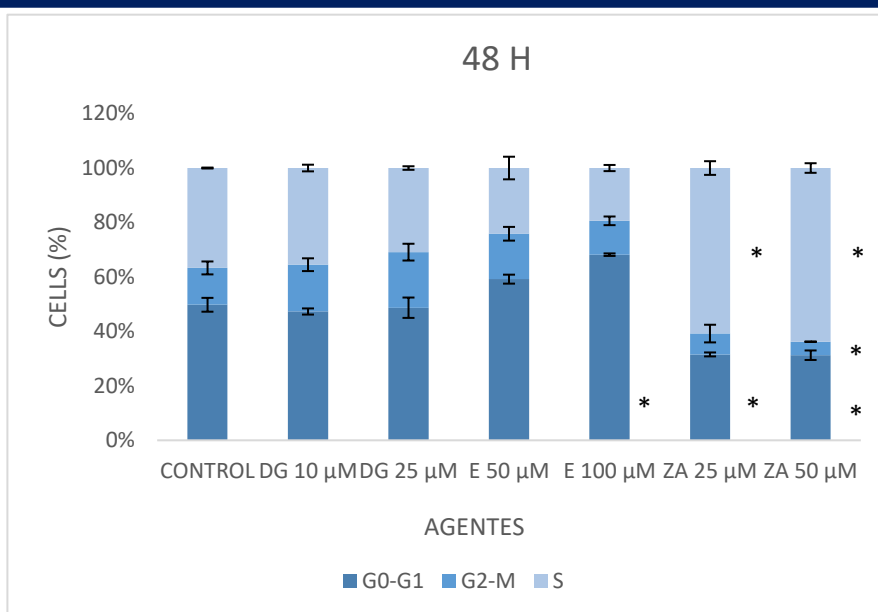


Tabla 19: Efectos ZA, DG y EGCG (E) sobre el ciclo celular de PE/CA-PJ15 a las 48 horas. Las células fueron clasificadas en tres fases. G0/G1, G2/M y S. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control.**

FASE	G0-G1	G2-M	S
CONTROL	49,78±2,54	13,54±2,38	36,69±0,17
DG 10 μM	47,31±1,12	17,18±2,35	35,51±1,22
DG 25 μM	48,70±3,73	20,41±3,08	30,89±0,65
E 50 μM	59,19±1,64	16,67±2,52	24,14±4,15
E 100 μM	68,19±0,46*	12,43±1,58	19,39±1,13
ZA 25 μM	31,55±0,73*	7,66±3,24	60,80±2,51
ZA 50 μM	31,26±1,75*	4,95±0,01*	63,79±1,76*



Tabla 20: Resumen de los resultados del estudio 1

ESTUDIO 1		
VIABILIDAD	ZA	Reduce la viabilidad, mostrando su mayor efecto a las 72 horas
	DG	Todas las dosis salvo 5 μ M reducen la viabilidad. Fue el más citotóxico
	EGCG	No reduce la viabilidad
	COMBINACIÓN	Todas las dosis reducen la viabilidad, siendo DG+ZA la combinación más efectiva
APOPTOSIS	ZA	Es el que más aumenta la apoptosis, mostrando su mayor efecto a las 72 horas
	DG	Aumenta la apoptosis
	EGCG	No aumenta la apoptosis
MIGRACIÓN	ZA	25 y 50 μ M reducen la migración celular
	DG	50 μ M reduce la migración celular
	EGCG	100 μ M reduce la migración celular
CICLO CELULAR	ZA	Prolonga el ciclo en la fase S
	DG	Aumenta la fase G2/M en detrimento de la fase S
	EGCG	Produce secuestro del ciclo celular en la fase G0/G1



4.2 RESULTADOS ESTUDIO 2: EVALUACIÓN DE LA COMBINACIÓN DE 5-FLUOROURACILO CON EGCG Y RADIOTERAPIA EN LAS LÍNEAS DE CÁNCER ORAL PE/CA-PJ15 y H357

4.2.1 Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG sobre la viabilidad celular

Las distintas dosis de 5-FU (3.12; 6.25; 12.5; 25; 50; 100 y 200 μ M) sólo o en combinación con 100 μ M EGCG junto con las dosis de radiación (0, 2.5 y 5 Gy) durante 48 horas modificaron la viabilidad celular de las dos líneas estudiadas

- **H357**

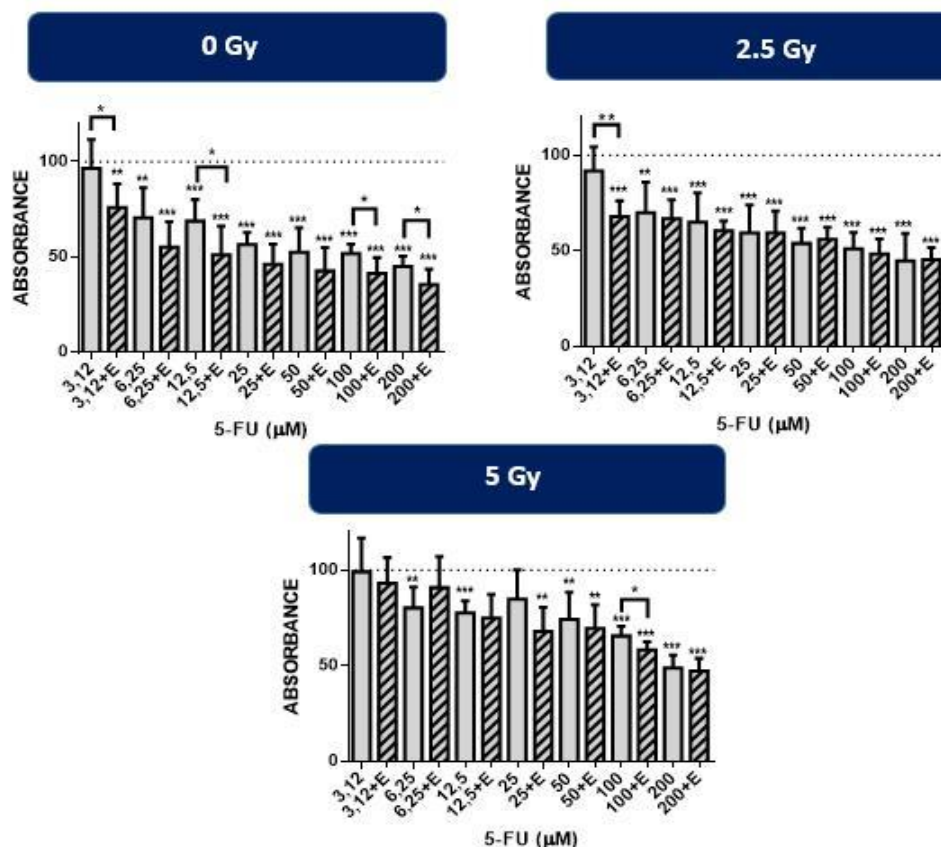
La mayoría de las dosis de 5-FU sólo y en combinación con 100 μ M EGCG consiguieron reducir la viabilidad celular respecto al control en ambas líneas celulares (Fig. 45). En cuanto a la línea H357, podemos observar como a mayor radiación, se produce un menor descenso de la viabilidad por parte del 5-FU y 5-FU+E, siendo 5 Gy donde menos se reduce la viabilidad respecto al control. A partir de 2.5 Gy, la adición de EGCG a 5-FU produce menor sinergia, por lo que la adición de EGCG no supone una diferencia significativa respecto a la no adición de la misma. Por el contrario, es a 0 Gy cuando se produce el mayor descenso de la viabilidad respecto al control, con la dosis de 200 μ M 5-FU+E ($p < 0.001$) y donde más contraste hay entre el 5-FU y 5-FU+E, en las dosis de 3.12, 12.5, 100 y 200 μ M ($p < 0.05$).

Tabla 21: Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG (E) sobre la viabilidad celular en la línea H357. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control**

	0 Gy	2.5 Gy	5 Gy
3,12 μM	96,49 $\pm$ 15,05	91,64 $\pm$ 12,77	99,10 $\pm$ 17,65
3,12+E μM	75,91 $\pm$ 12,50**	67,85 $\pm$ 8,28***	93,14 $\pm$ 13,34
6,25 μM	70,50 $\pm$ 15,90**	70,04 $\pm$ 15,94**	80,23 $\pm$ 10,98**
6,25+E μM	55,12 $\pm$ 13,98***	66,88 $\pm$ 9,86***	90,75 $\pm$ 16,36
12,5 μM	68,76 $\pm$ 11,32***	65,02 $\pm$ 15,22***	77,58 $\pm$ 6,40***
12,5+E μM	51,08 $\pm$ 15,18***	60,55 $\pm$ 5,18***	74,82 $\pm$ 12,35
25 μM	56,37 $\pm$ 6,32***	59,37 $\pm$ 14,65***	84,72 $\pm$ 15,26
25+E μM	45,97 $\pm$ 10,61***	59,43 $\pm$ 11,35***	67,88 $\pm$ 12,61**
50 μM	52,32 $\pm$ 12,91***	53,81 $\pm$ 8,06***	74,27 $\pm$ 14,04**
50+E μM	42,53 $\pm$ 12,43***	56,01 $\pm$ 6,27***	69,40 $\pm$ 12,36**
100 μM	51,86 $\pm$ 4,85***	51,10 $\pm$ 8,38***	65,53 $\pm$ 5,04***
100+E μM	41,36 $\pm$ 8,16***	48,25 $\pm$ 7,99***	58,24 $\pm$ 4,23***
200 μM	44,87 $\pm$ 5,38***	44,64 $\pm$ 14,47***	48,83 $\pm$ 6,76***
200+E μM	35,41 $\pm$ 8,05***	45,38 $\pm$ 6,36***	47,17 $\pm$ 6,63***



Fig.45: Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG (E) sobre la viabilidad celular a las 48 horas en la línea H357. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control**



• PE/CA

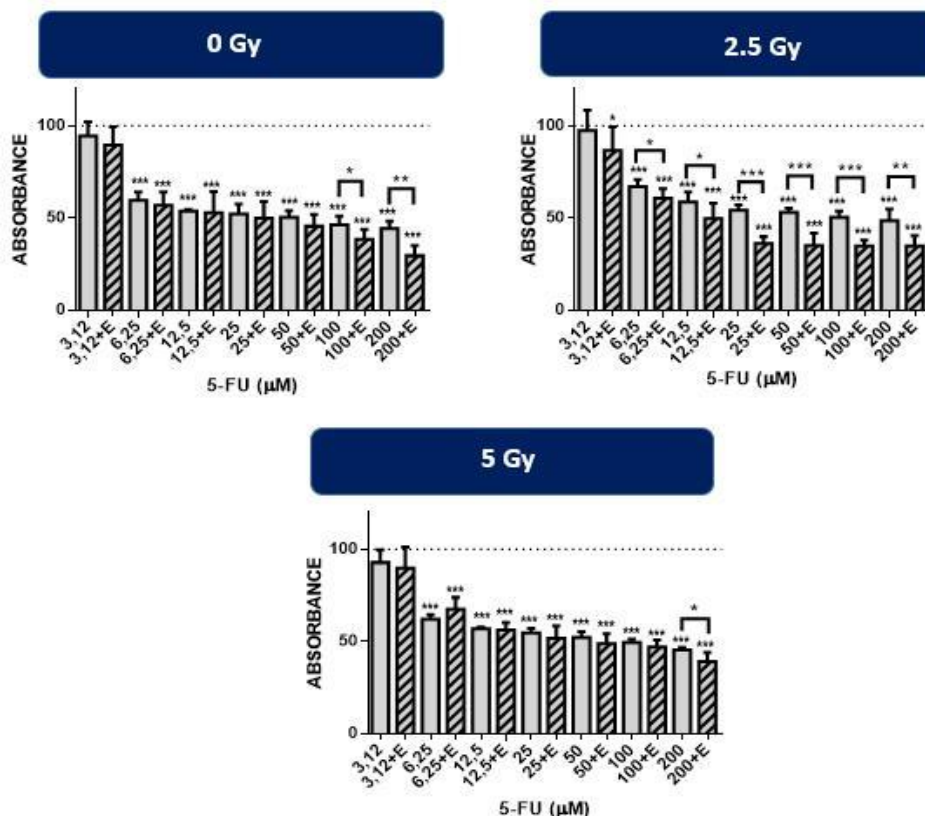
Respecto a la línea PE/CA (Fig. 46), es a 2.5 Gy cuando más diferencias hay entre 5-FU y 5-FU+E, en las dosis de 6.25 μ M ($p < 0.05$), 12.5 μ M ($p < 0.05$), 25 μ M ($p < 0.001$), 50 μ M ($p < 0.001$), 100 μ M ($p < 0.001$) y 200 μ M ($p < 0.01$). Sin embargo, A 5 Gy la adición de EGCG tiene menor efecto, habiendo diferencias significativas en las dosis de 25-200 μ M de 5-FU+E entre las 3 dosis de radiación ($p < 0.05$), incrementando los valores de la viabilidad con el aumento de la radiación. A 0 Gy es cuando los valores de la viabilidad celular están más bajos, pero salvo en las dos dosis más altas de 5-FU, no hay diferencia significativa entre la adición o no de EGCG. La dosis que más consiguió disminuir la viabilidad fue 200 μ M 5-FU+E ($p < 0.001$) a 0 Gy.



Tabla 22: Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG (E) sobre la viabilidad celular a las 48 horas en la línea PE/CA. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control**

	0 Gy	2.5 Gy	5 Gy
3,12 μ M	94,44 $\pm$ 7,63	97,46 $\pm$ 11,01	92,77 $\pm$ 6,90
3,12+E μ M	89,54 $\pm$ 10,00	86,64 $\pm$ 12,74*	89,79 $\pm$ 11,31
6,25 μ M	59,61 $\pm$ 4,51***	67,08 $\pm$ 3,76***	61,94 $\pm$ 2,65***
6,25+E μ M	56,80 $\pm$ 7,30***	60,77 $\pm$ 5,17***	67,43 $\pm$ 6,43***
12,5 μ M	53,70 $\pm$ 0,91***	58,77 $\pm$ 5,33**	56,94 $\pm$ 0,82***
12,5+E μ M	52,82 $\pm$ 11,50***	49,80 $\pm$ 8,26***	56,14 $\pm$ 4,10***
25 μ M	52,14 $\pm$ 5,49***	54,26 $\pm$ 2,86***	54,56 $\pm$ 2,58***
25+E μ M	49,9 $\pm$ 8,88***	36,14 $\pm$ 3,74**	51,63 $\pm$ 6,91***
50 μ M	50,35 $\pm$ 3,64***	53,00 $\pm$ 2,24***	52,11 $\pm$ 3,12***
50+E μ M	45,52 $\pm$ 6,45***	35,00 $\pm$ 6,83***	48,78 $\pm$ 5,49***
100 μ M	46,27 $\pm$ 4,72***	50,35 $\pm$ 3,42***	49,51 $\pm$ 1,78***
100+E μ M	38,52 $\pm$ 5,24***	34,82 $\pm$ 3,21***	46,9 $\pm$ 3,84***
200 μ M	44,18 $\pm$ 4,04***	48,68 $\pm$ 6,24***	45,27 $\pm$ 1,47***
200+E μ M	29,55 $\pm$ 5,63***	34,79 $\pm$ 5,60***	39,06 $\pm$ 5,06***

Fig.46: Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG (E) sobre la viabilidad celular a las 48 horas en la línea PE/CA. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control, teniendo el control el valor del 100%. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control**





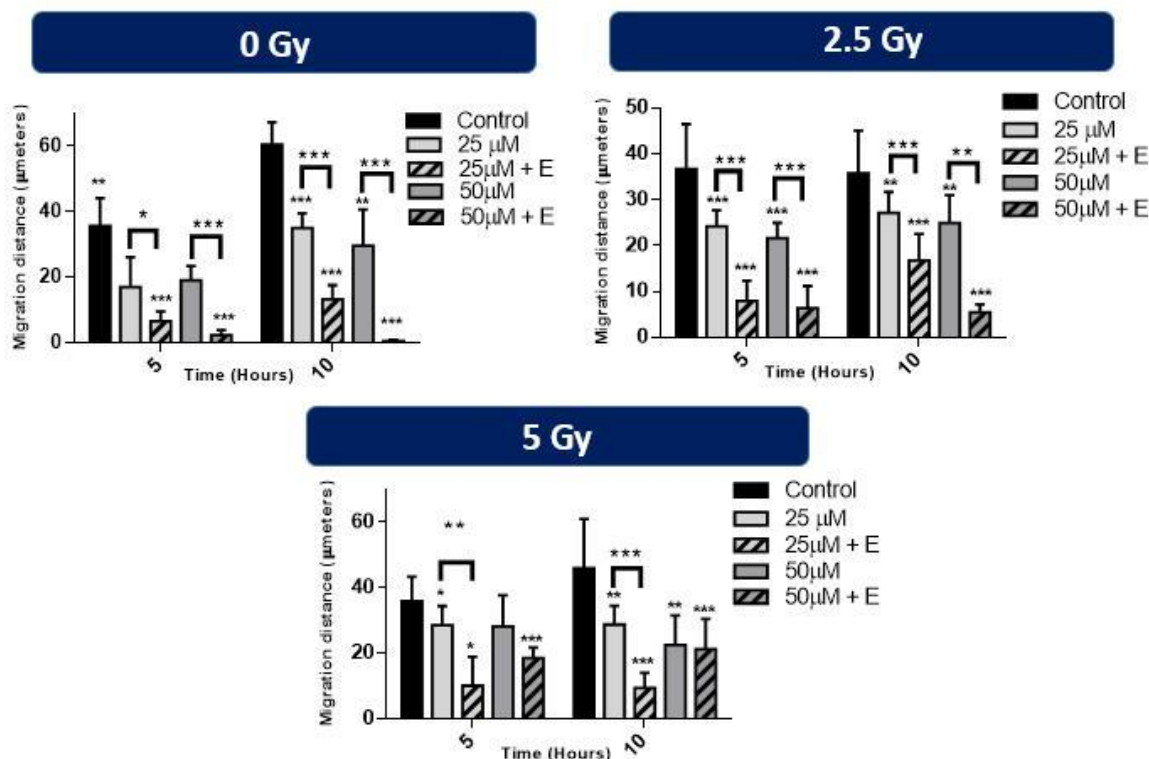
4.2.2. Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG sobre la migración celular

Las distintas dosis de 5-FU (3.12; 6.25; 12.5; 25; 50; 100 y 200 μ M) sólo o en combinación con 100 μ M EGCG junto con las dosis de radiación (0, 2.5 y 5 Gy) durante 48 horas redujeron la migración celular de las dos líneas celulares estudiadas.

• H357

En la línea celular H357, tanto el 5-FU como 5-FU+E consiguen reducir la migración celular respecto al control (Fig. 47). Podemos ver un patrón en el a que al añadir 5-FU se reduce la migración celular y la adición de EGCG aumenta el efecto del 5-FU. Las diferencias entre 5-FU y 5-FU+E son significativas a 0 y 2.5 Gy, por lo que al añadir 100 μ M EGCG hay una disminución significativa de la migración respecto a los grupos de 5-FU sólo. A 5 Gy, la eficacia del EGCG disminuye y las diferencias entre la misma dosis con y sin EGCG se reducen. Esto lo podemos observar viendo como las distancias de migración entre las mismas dosis de 5-FU+E son superiores con el aumento de la radiación, siendo significativo en 50 μ M 5-FU+E ($p < 0.001$). Las dosis que más reducen la migración están en 0 Gy, siendo 50 μ M 5-FU+E a las 10 horas en la línea H357 ($p < 0.001$).

Fig.47: Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG (E) sobre la migración celular a las 5 y 10 horas de la línea H357. Los resultados están expresados como distancia migrada por las células en micrómetros. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control**

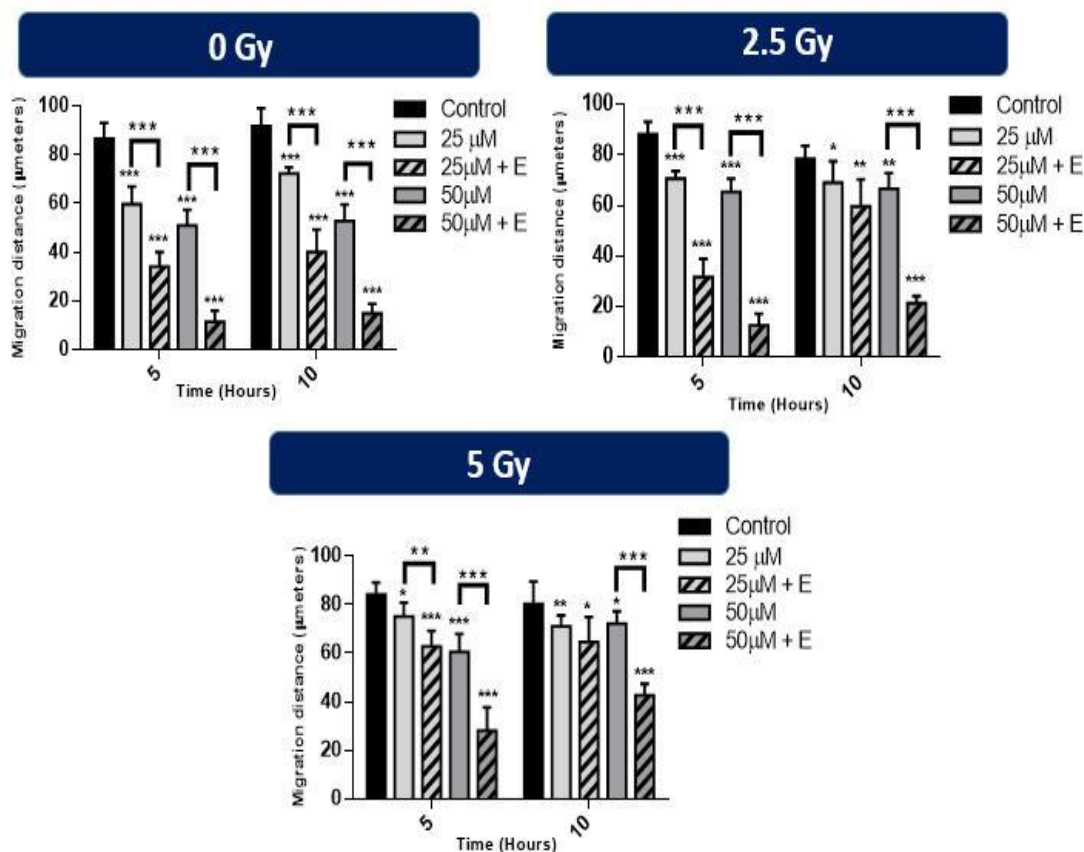




• PE/CA

En la línea PE/CA, ambos 5-FU y 5-FU+E consiguen reducir la migración celular respecto al control (Fig. 48). Los resultados son similares a la línea H357. El 5-FU reduce la migración celular y al añadir EGCG se ve aumentado este efecto. Las mayores diferencias respecto al control y a la misma dosis con EGCG se encuentran a 0 y 2.5 Gy. En 5 Gy se reduce la efectividad de EGCG. A esta dosis de radiación, siguen habiendo diferencias significativas entre la adición o no de EGCG, aunque menores que a dosis más bajas de radiación. Esto lo podemos observar viendo como las distancias de migración entre las mismas dosis de 5-FU+E varían con las distintas dosis de radiación, a ambos tiempos, en 25-FU+E y 50-FU+E ($p < 0.01$). Las dosis que más reducen la migración se encuentran en 0 Gy, siendo 50 μM 5-FU+E a las 5 horas en la línea PE/CA ($p < 0.001$).

Fig.48: Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG (E) sobre la migración celular a las 5 y 10 horas de la línea PE/CA. Los resultados están expresados como distancia migrada por las células en micrómetros. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.001$ vs. Control**





4.2.2. Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG sobre el ciclo celular

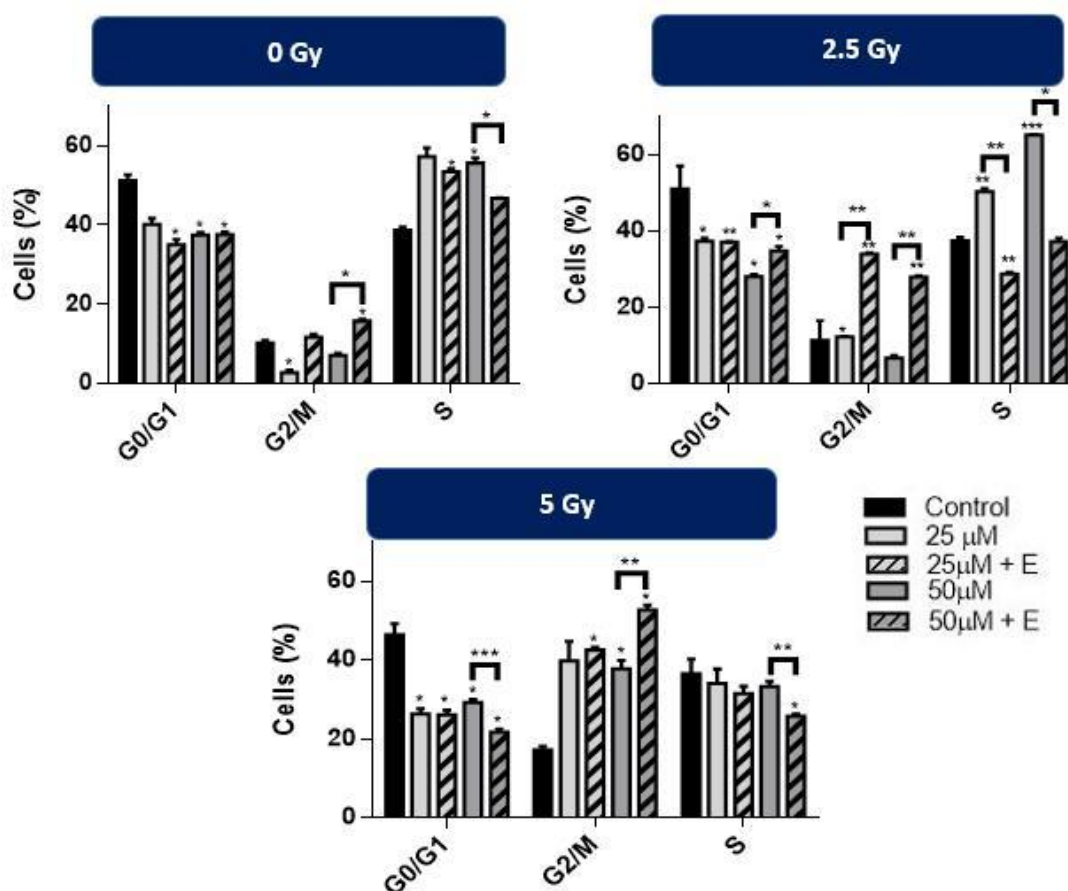
Las distintas dosis de 5-FU (3.12; 6.25; 12.5; 25; 50; 100 y 200 μ M) sólo o en combinación con 100 μ M EGCG junto con las dosis de radiación (0, 2.5 y 5 Gy) durante 48 modificaron el ciclo celular.

• H357

En la línea H357 (Fig. 49), la adición de 5-FU y 5-FU+E disminuyó la fase G0/G1 respecto al control en todas las radiaciones. La fase G2/M aumentó con la adición de EGCG y a su vez se incrementaba con el aumento de la radiación. Por último, el 5-FU incrementó el número de células en la fase S. La mayoría de células en todos los experimentos realizados se encuentran en esta fase. Los mayores contrastes entre 5-FU y 5-FU+E se vieron a 2.5 Gy, en las dosis de 25 μ M en las fases G2/M y S ($p < 0.01$) y 50 μ M en la fase G0/G1 y S ($p < 0.05$) y en la G2/M ($p < 0.01$)

Fig.49: Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG (E) sobre el ciclo celular tras 48 horas de exposición en la línea H357. Las células fueron clasificadas en tres fases. G0/G1, G2/M y S.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. Control





• PE/CA

En la Línea PE/CA (Fig. 50), mientras que 5-FU aumentaba la fase G0/G1, 5-FU+E disminuía el número de células en esta fase. En la fase G2/M ocurre algo similar, 5-FU disminuye la fase y 5-FU+E la aumenta respecto al control. Por último, ambas 5-FU y 5-FU+E aumentan el número de células en la fase S. La mayoría de contrastes entre 5-FU y 5-FU+E se vieron a 0 Gy, en las dosis de 25 μ M en las tres fases ($p < 0.05$) y 50 μ M en la G0/G1 y G2/M ($p < 0.05$) y también a 2.5 Gy en 25 y 50 μ M en G0/G1 y G2/M ($p < 0.05$)

Fig.50: Efectos de la radiación, 5-FU y EGCG (E) sobre el ciclo celular tras 48 horas de exposición en la línea PE/CA. Las células fueron clasificadas en tres fases. G0/G1, G2/M y S. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control**

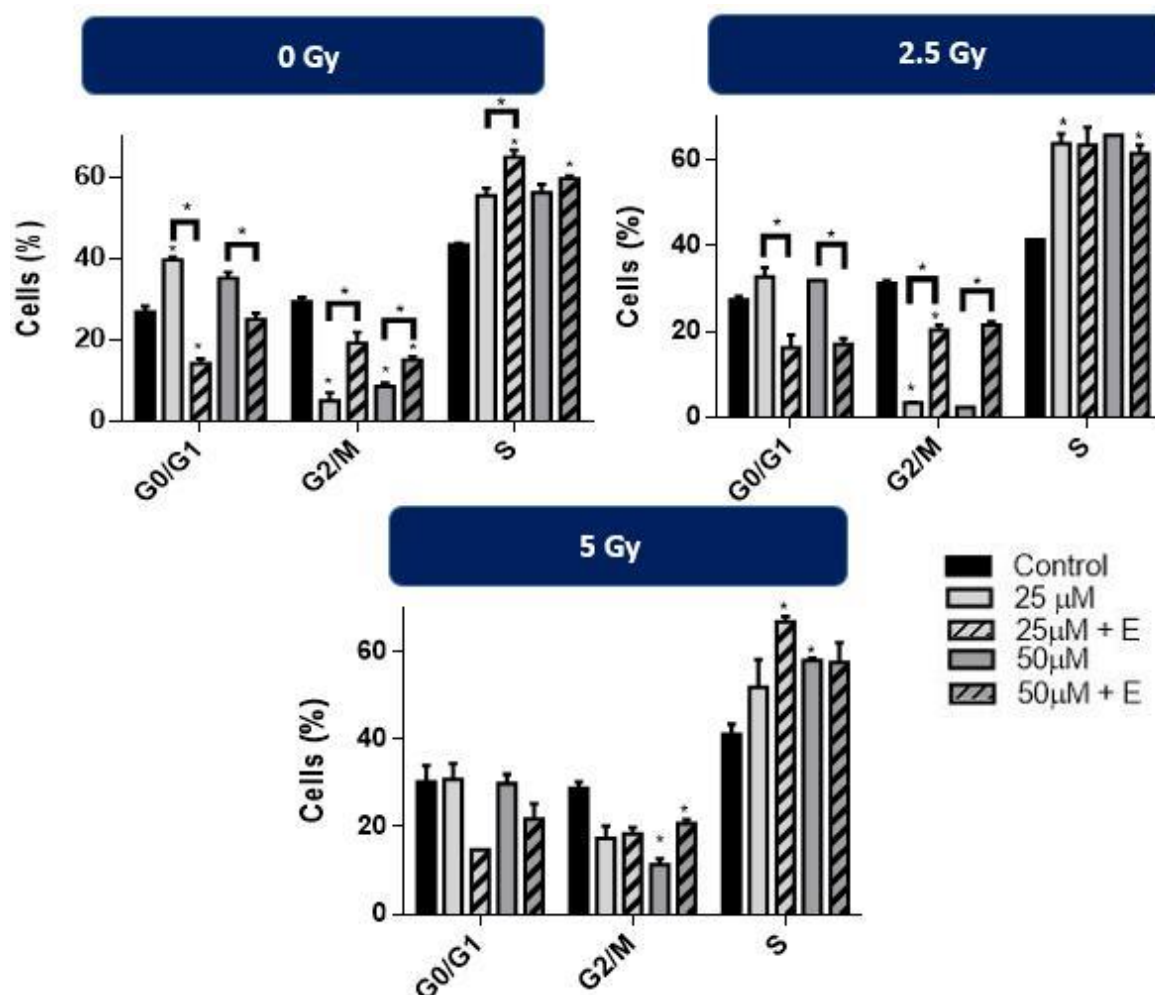



Tabla 23: Resumen de los resultados del estudio 2

ESTUDIO 2		
VIABILIDAD	H357	La combinación de 5-FU+EGCG reduce la viabilidad en mayor proporción que 5-FU sólo, aunque principalmente a 0 Gy. A dosis mayores, la adición de EGCG apenas tiene efecto
	PE/CA	La combinación de 5-FU+EGCG reduce la viabilidad en mayor proporción que 5-FU sólo, aunque principalmente a 2.5 Gy. Con 5 Gy la adición de EGCG apenas tiene efecto
MIGRACIÓN	H357	5-FU reduce la migración y la adición de EGCG produce sinergia, aumentando el efecto. Las diferencias entre 5-FU y 5-FU+E son significativas en las dos líneas a 0 y 2.5 Gy. A 5 Gy las diferencias disminuyen
	PE/CA	5-FU reduce la migración y la adición de EGCG produce sinergia, aumentando el efecto. Las diferencias entre 5-FU y 5-FU+E son significativas en las dos líneas a 0 y 2.5 Gy. A 5 Gy las diferencias disminuyen
CICLO CELULAR	H357	5-FU y 5-FU+E disminuyeron la fase G0/G1 respecto al control. EGCG aumentaba la fase G2/M. El número de células en esta fase crece con el aumento de radiación. La mayoría de las células se encuentran en la fase S. Las mayores diferencias se vieron a 2.5 Gy
	PE/CA	5-FU+E disminuyó la fase G0/G1 respecto al control. EGCG aumentaba la fase G2/M. 5-FU y 5-FU+E aumentan el número de células en la fase S. Las mayores diferencias se vieron a 0 Gy



4.3 RESULTADOS ESTUDIO 3: EFECTOS DEL ÁCIDO ZÓLEDRÓNICO SÓLO O EN COMBINACIÓN CON EGCG SOBRE LAS CELULAS CON FENOTIPO DE OSTEOLASTO SAOS-2

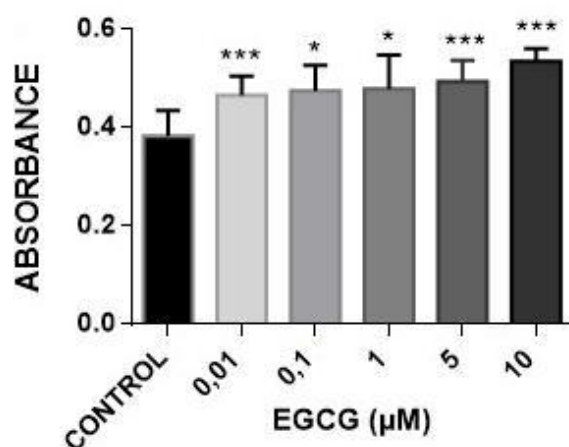
4.3.1 Efecto de ZA y EGCG sobre la viabilidad celular

Para determinar los efectos del ZA y EGCG sobre la viabilidad celular, usamos varias concentraciones (0.01, 0.1, 1, 5 y 10 μM) sobre las células durante 72 horas.

- **EGCG**

Primero medimos el efecto de EGCG sobre la viabilidad de las células. Todas las dosis producen una estimulación de la viabilidad de las células respecto al control, siendo 10 μM la que produce el máximo efecto ($p < 0.001$) (Fig. 51). Por ello, utilizaremos ésta en combinación con el ZA para los siguientes experimentos.

Fig.51: Efecto de EGCG sobre la viabilidad celular de las células SAOS-2 a las 72 horas. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control.**

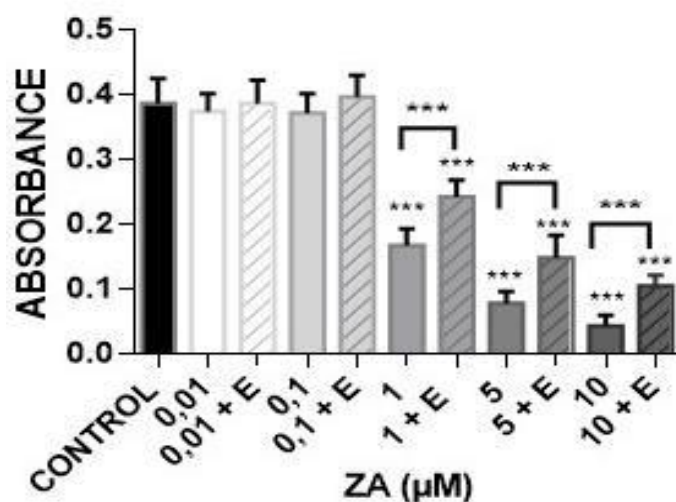


- **Ácido Zoledrónico (ZA)**

En cuanto al ZA, mientras que las dosis nanomolares (0.01-0.1 μM) parecen no producir efecto alguno sobre la viabilidad de las células, podemos observar como a partir de 1 μM , reducen la viabilidad celular de manera significativa y concentración dependiente ($p < 0.001$). Así podemos ver también como con esas dosis de ZA, al ser añadido 10 μM de EGCG, la viabilidad de las células aumenta comparadas con las que han sido tratadas únicamente con ZA ($p < 0.001$), mientras que en las dosis más bajas (nanomolar) no produce efecto alguno sobre la viabilidad.



Fig.52: Efecto de ZA sobre la viabilidad celular de la línea SAOS-2. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. Control.



4.3.2 Efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la mineralización

Para observar la mineralización por parte de las células usamos la tinción de alizarina roja. Las células fueron expuestas a dosis de 0.1, 1 y 5 μM de ZA y las mismas dosis de ZA + 10 μM de EGCG en medio inductor osteogénico durante 7 y 14 días.

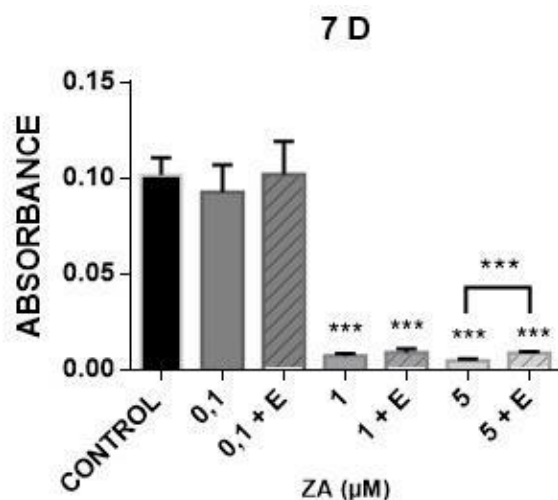
- **Siete días**

La adición de ZA alteró la mineralización de las células SAOS-2. Los depósitos de calcio podían ser vistos a simple vista después de la tinción como unos puntos rojos-anaranjados (Fig. 55). A los 7 días de la inducción de la mineralización, ésta fue inhibida de manera brusca en las dosis de 1 y 5 μM ($p < 0.001$), revirtiendo mínimamente la capacidad de mineralización con la adición de EGCG con 5 μM ($p < 0.001$). ZA 0.1 μM no produjo ninguna diferencia significativa respecto al control, como tampoco la adición de EGCG a ésta dosis, aunque podemos ver que el valor es ligeramente superior al grupo control (Fig.53).



Fig.53: Efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la mineralización de las células SAOS-2 a los 7 días.

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. Control.



- Catorce días**

A los 14 días podemos ver como las dosis de ZA 1 y 5 μM siguen reduciendo la formación de nódulos de calcio ($p < 0.001$), pero en este caso, al añadir EGCG a 1 μM ZA, consigue revertir parte de la inhibición producida por el ZA ($p < 0.001$). En cuanto a la dosis de 0.1 μM ZA, los valores son similares al control, y al añadir EGCG, aumenta la mineralización de manera significativa respecto al control ($p < 0.001$) y a la misma dosis sin EGCG ($p < 0.05$).

Fig.54: Efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la mineralización de las células SAOS-2 a los 14 días.

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. Control.

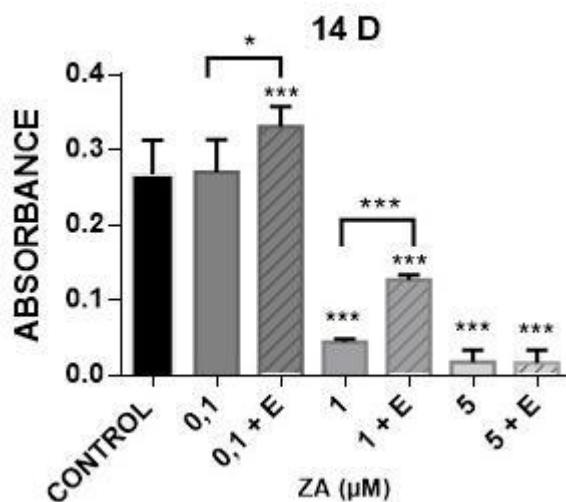
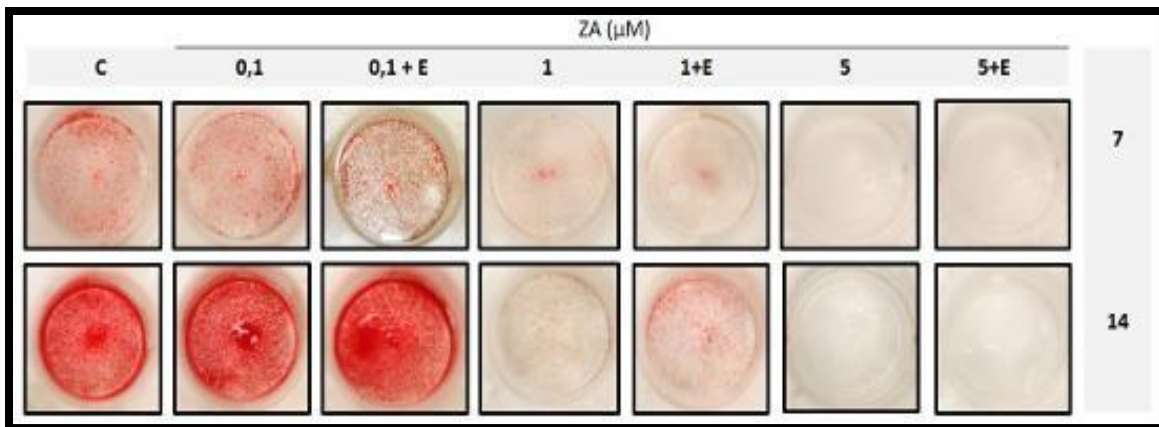


Fig.55: Efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la mineralización de las células SAOS-2 a los 7 y 14 días mediante la tinción de alizarina roja



4.3.3 Efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la deposición de colágeno

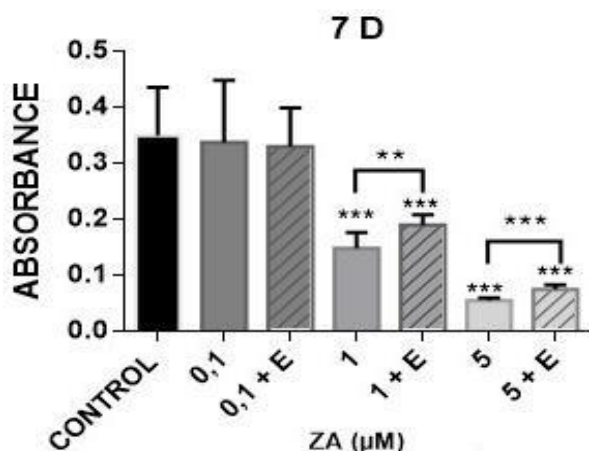
Para observar la deposición de colágeno por parte de las células usamos la tinción de Sirius Red. Las células fueron expuestas a dosis de 0.1, 1 y 5 μM de ZA y las mismas dosis de ZA + 10 μM de EGCG en medio inductor osteogénico durante 7 y 14 días.

- **Siete días**

Las dosis de 1 y 5 μM ZA disminuyeron la deposición de colágeno a los 7 días ($p < 0.001$), mientras que la dosis de 0.1 μM parece no tener ningún efecto respecto al control. Se puede observar como la adición de EGCG a las dosis de 1 y 5 μM consigue aumentar de manera significativa la deposición de colágeno en comparación con las no tratadas con EGCG ($p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente).



Fig.56 Efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la deposición de colágeno a los 7 días. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control.**



- Catorce días**

A los catorce días podemos observar unos resultados similares a los anteriores. Las dosis de 1 y 5 μM disminuyeron la deposición de colágeno ($p < 0.001$ y $p < 0.01$ respectivamente) de una manera más pronunciada que a los 7 días. La adición de EGCG a 1 μM pudo revertir mínimamente aunque de forma significativa los daños causados por ZA ($p < 0.001$). La dosis de ZA 0.1 μM aumentó ligeramente la expresión de colágeno ($p < 0.01$), mientras que la adición de EGCG a esa dosis no tuvo efecto alguno.

Fig.57 Efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la deposición de colágeno a los 14 días. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control.**

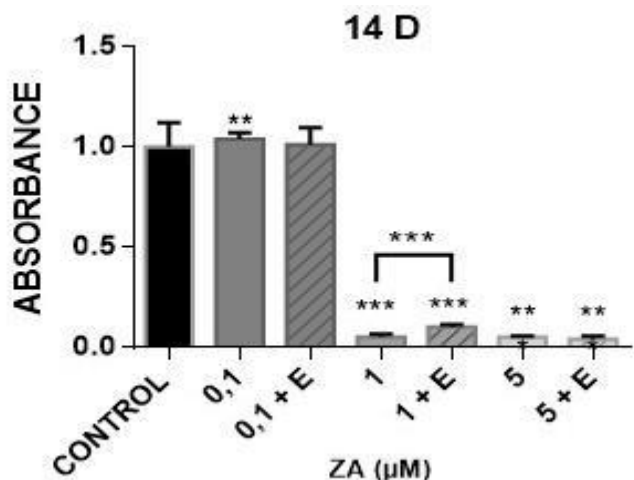
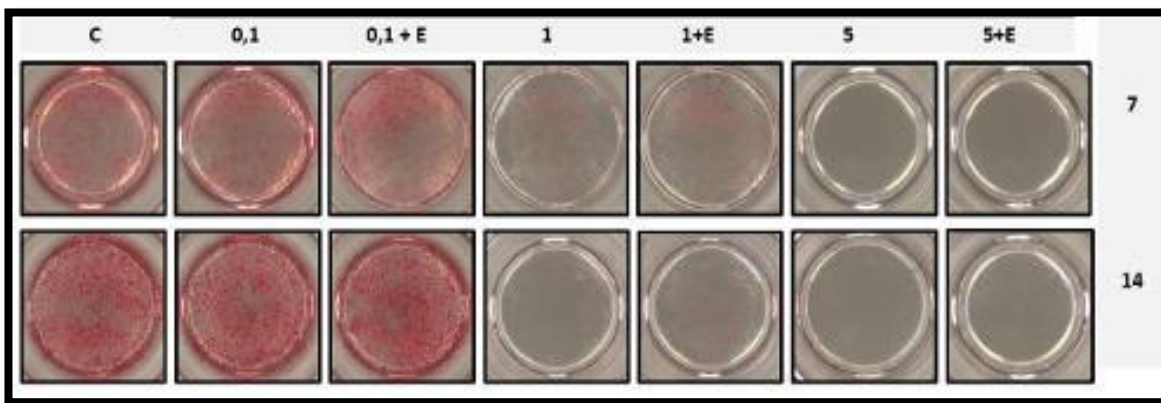


Fig.58: Efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la deposición de colágeno de las células SAOS-2 a los 7 y 14 días mediante la tinción de Sirius Red



4.3.4 Efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la migración celular

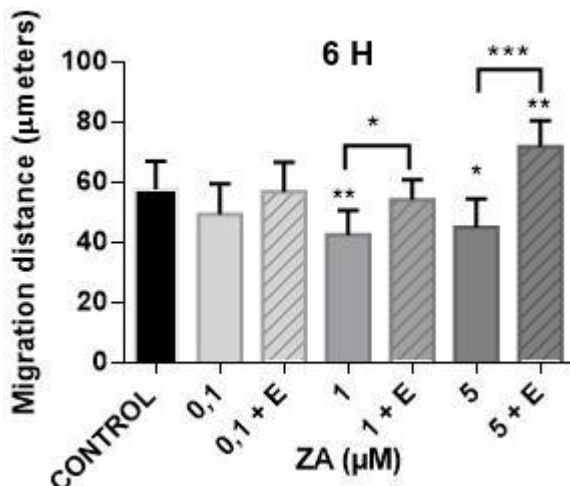
Las células fueron expuestas a dosis de 0.1, 1 y 5 μM de ZA y las mismas dosis de ZA + 10 μM de EGCG, tomando imágenes de la migración a las 0, 6 y 24 horas.

- **Seis horas**

El tratamiento de las células con ZA produjo un descenso de la migración respecto al control a todas las dosis testadas, siendo de forma significativa a 1 y 5 μM ($p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente). La adición de EGCG a 0.1 μM no produjo ningún cambio significativo, sin embargo, al añadirlo a las dosis de 1 y 5 μM conseguía recuperar la capacidad migratoria, incluso superando los valores del control en la dosis de 5+E ($p < 0.01$), siendo también superior a la misma dosis sin EGCG ($p < 0.001$).



Fig.59 Efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la migración celular a las 6 horas. Los resultados están expresados como distancia migrada por las células en micrómetros. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control.**



- Veinticuatro horas**

El tratamiento de las células con ZA redujo la migración de forma dosis dependiente a todas las dosis testadas tras 24 horas de exposición ($p < 0.001$). La adición de EGCG pudo revertir parte de la inhibición producida por ZA, a 0.1 μM ($p < 0.01$), 1 μM ($p < 0.001$) y de manera más pronunciada en 5 μM ($p < 0.001$)

Fig.60: Efecto de ZA y ZA+EGCG sobre la migración celular a las 24 horas. Los resultados están expresados como distancia migrada por las células en micrómetros. *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 vs. Control.**

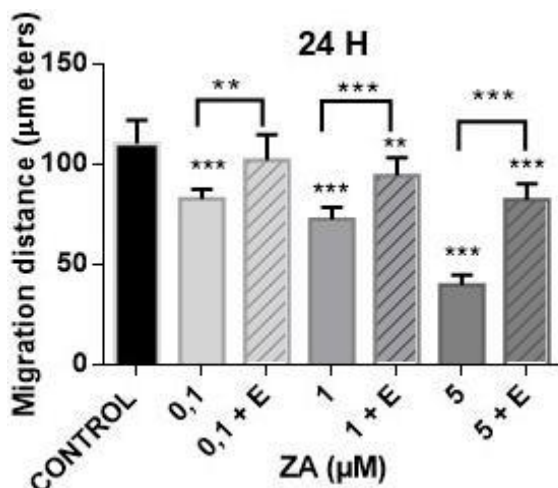




Tabla 24: Resumen de los resultados del estudio 3

ESTUDIO 3		
VIABILIDAD	EGCG	Aumenta la viabilidad de las células de manera dosis-dependiente, siendo 10 μ M la dosis más efectiva probada
	ZA	Las dosis de 1, 5 y 10 μ M disminuyen la viabilidad La dosis de 0,01 y 0,1 μ M no modifican la viabilidad
	ZA+EGCG	La adición de EGCG a las dosis de 1, 5 y 10 μ M consigue recuperar parte de la inhibición producida por EGCG. Su adición al resto no produce ningún efecto
MINERALIZACIÓN	ZA	Las dosis de 1 y 5 μ M reducen la mineralización. La dosis de 0.1 no produce efecto alguno
	ZA+EGCG	La adición de EGCG consigue recuperar parte de la inhibición y a 14 días con la dosis de ZA 0.1 μ M consigue aumentar la mineralización por encima de la misma dosis de ZA sólo y el control.
COLÁGENO	ZA	Las dosis de 1 y 5 μ M reducen la deposición de colágeno. La dosis de 0.1 apenas modifica la deposición de colágeno
	ZA+EGCG	La adición de EGCG apenas consigue recuperar parte de la inhibición
MIGRACIÓN	ZA	Todas las dosis disminuyen la migración celular
	ZA+EGCG	La adición de EGCG recupera parte de la inhibición producida por el ZA

DISCUSIÓN



5. DISCUSIÓN

5.1 DISCUSIÓN ESTUDIO 1: POTENCIAL QUIMIOTERAPÉUTICO DEL ÁCIDO ZOLEDRÓNICO, DIOSGENINA Y EGCG SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER ORAL.

Actualmente los sistemas de cultivo celular son ampliamente usados, ya que constituyen un modelo experimental económico, son relativamente fáciles de mantener, permiten aislar virus, preparar antígenos virales y realizar pruebas de neutralización. Además, incrementan la complejidad de los estudios o estrategias experimentales sobre la biología molecular de las respuestas celulares básicas.

ZA, EGCG y DG son tres sustancias que tienen actividad antirresortiva y han mostrado una potencial actividad antitumoral frente a distintos tipos de cáncer (61,109,142,156,157,178). Estudios recientes sugieren que El ZA, que ha sido usado anteriormente como coadyuvante en terapia de distintos cánceres para prevenir metástasis óseas, podría tener un potencial efecto frente al cáncer oral (111,112). Debido a estudios previos, en los que se ha observado un potencial efecto de las saponinas esteroideas y distintos extractos de *Camellia sinensis* en líneas celulares de cáncer oral (179,180), decidimos evaluar los efectos de ZA, DG y EGCG en el cáncer oral. El rango de dosis elegida de los compuestos está basada en estudios previos (111,157,178).

Tamura y cols (112) observaron que en distintas líneas celulares de COCE, el ZA conseguía reducir la proliferación de manera dosis-dependiente a las 72 horas, así como inducir la apoptosis mediante la actividad de las caspasas-3,-8 y -9. En nuestro estudio, obtenemos unos resultados similares, observando como la acción antiproliferativa del zoledrónico no empieza hasta pasadas las 72 horas de exposición, obteniendo resultados parecidos en otros estudios (181,182). Sin embargo, a las 24 y 48 horas las dosis más bajas reducen más la viabilidad celular que las dosis altas.

La apoptosis del ZA en nuestro estudio aumenta de manera significativa de forma dosis dependiente, llegando a su máximo a las 72 horas, siendo además la sustancia que más indujo la apoptosis de las 3 estudiadas. López Jornet y cols (111) pudieron observar como distintas dosis de ZA, independientemente de haber sido expuestas a la radiación, podían disminuir la capacidad migratoria de las células de COCE. En nuestro estudio, ZA fue capaz de reducir la migración de las células cancerígenas de manera dosis-dependiente, demostrando la capacidad de reducir la migración celular.



Para observar cómo afectan estas sustancias en los procesos celulares, evaluamos los cambios en el ciclo celular. Pudimos observar como a las 24 y 48 horas se producía un incremento en la fase S del ciclo celular en detrimento de la G0/G1 y G2/M, prolongando el ciclo celular en esta fase, por lo que podría explicar la acción retardada del ZA (112). También podemos observar cambios en los valores del control en la fase G0/G1 de las 24 a las 48 horas, que podrían ser explicados debido a que las células se encontraban en fase de crecimiento exponencial, a un ritmo muy elevado, lo cual es una característica distintiva de esta línea celular.

En anteriores estudios, DG había mostrado potencial anticancerígeno *in vitro* (168). Corbiere y cols (168) observaron cómo a 40 μ M la proliferación se veía reducida de manera abrupta a las 24 horas de exposición también produciendo un aumento en la apoptosis de células de melanoma y carcinoma de laringe. Das y cols (157) demostraron que DG tenía propiedades antiproliferativas y apoptóticas sobre distintas líneas *in vitro*, entre ellas una de carcinoma de células escamosas, regulado mediante la ruta de caspasas, JNK (c-jun N-terminal proteína quinasa) y PKB (proteína kinasa B). En nuestro estudio, hemos observado como a una dosis baja (5 μ M) aumentaba la proliferación celular, mientras que con 25 μ M y dosis superiores disminuía de manera significativa la proliferación en las primeras 24 horas, más que el resto de agentes, mostrando un rápido efecto citotóxico. También fue capaz de estimular la apoptosis de forma dosis dependiente, aunque pasada las 48 y 72 horas los valores no eran tan altos como el ZA, pese a reducir más la viabilidad celular que éste último. Esto puede ser debido a que las células murieron por necrosis, parámetros que no fueron evaluados en este experimento. Pudimos observar en nuestro estudio como DG era capaz de reducir la migración celular en la línea PE/CA-PJ15, aunque sólo a la dosis de 50 μ M, mientras que la dosis de 25 μ M no fue capaz de reducir la capacidad migratoria. Chen y cols (183) observaron en un estudio *in vitro* con células de cáncer de próstata, como DG inhibía la invasión y migración de las células. En nuestro estudio, DG fue capaz de secuestrar el ciclo celular en la fase G2/M, aunque la variación en la fase celular parece variar dependiendo del tipo de células (157,168). El uso de una única línea celular es una de las limitaciones del estudio.

La combinación de los agentes (DG 25 μ M, EGCG y ZA 50 μ M) consiguió reducir la viabilidad a todos los tiempos testados. La combinación de DG con ZA fue la más efectiva de todas, seguida de cerca por la combinación de las tres. Pese a esto, la combinación de los agentes no consigue reducir más la viabilidad que la DG sola, que es la sustancia que de mayor manera reduce la viabilidad. En un estudio, Luo y cols (184) observaron como la combinación de ZA metronómico con



extracto de *camelia sinensis*, la planta de donde se extrae EGCG, demostró efectos significativos antitumorales, antimetastáticos y antiosteolíticos en células de cáncer de mama de roedores.

EGCG en nuestro estudio no fue capaz de disminuir la proliferación celular ni de aumentar la apoptosis sobre la línea PE/CA-PJ15. Podemos observar como hay una tendencia tiempo-dependiente hacia la reducción de la viabilidad de las células tratadas con EGCG, por lo que puede que una mayor exposición tuviera efectos inhibitorios sobre las células. Sin embargo, esto no fue estudiado. En otros estudios *in vitro* de cáncer oral, también se han observado resultados parecidos, en el que no causaban efecto citotóxico a las células (145,146) mientras que en otros estudios sí que reducía la proliferación a dosis similares e inducía la apoptosis (143,148). Sin embargo, si fue capaz de reducir la migración celular y modificar el ciclo celular de manera dosis-dependiente, secuestrando el ciclo celular en la fase G0/G1. Ho y cols (146) determinaron que EGCG podría ser un potencial agente frente a la metástasis en su estudio debido a que EGCG reducía la migración e invasión celular sin causar toxicidad a la célula.

5.1.2 DISCUSIÓN ESTUDIO 2: EVALUACIÓN DE LA COMBINACIÓN DE 5-FLUOROURACILO CON EGCG Y RADIOTERAPIA EN LAS LÍNEAS DE CÁNCER ORAL PE/CA-PJ15 y H357

La cirugía, quimioterapia y radioterapia son el tratamiento de referencia para el COCE. Pese a los numerosos avances en las últimas décadas, los efectos secundarios del tratamiento suponen una grave complicación para la calidad de vida de los pacientes, por ello es necesario minimizar el impacto negativo de la terapia. Existen numerosos compuestos de origen vegetal que han probado tener acción quimioterapéutica (144,183,185) y que podrían combinarse con el tratamiento convencional, para reducir los efectos secundarios, disminuyendo las dosis, sin que el tratamiento pierda efectividad.

Seleccionamos dos líneas celulares de COCE para hacer un estudio *in vitro* de la combinación de la terapia de quimiorradiación con EGCG. El 5-FU ha sido ampliamente utilizado en este tipo de cáncer, así como las dosis de radiación usadas en el estudio (2.5 y 5 Gy) están en el rango de las usadas en la clínica para tratar el COCE (39,40). La dosis elegida de EGCG para la combinación (100 μ M) ha sido usada en otros estudios previamente (44)

En nuestros ensayos de viabilidad, la mayoría de las dosis testadas redujeron la viabilidad respecto al control. Pese a que hay diferencias entre ambas líneas celulares, hay patrones parecidos



en ambas. Sin radiación y expuestas a 2.5 Gy es cuando la acción de EGCG tiene más efecto, encontrando notables diferencias entre 5-FU y 5-FU+E, viéndose en algunos casos como la combinación de EGCG con 5-FU produce un mayor descenso de la viabilidad que el doble de la dosis de 5-FU sin EGCG. Estos resultados implican que reduciendo la dosis de 5-FU y añadiendo EGCG se obtiene un mayor efecto que aumentando la dosis de 5-FU solo. En un estudio previo de Yang y cols (149), concluyeron que EGCG sensibilizó a células de carcinoma hepático frente a la actividad antitumoral de 5-FU, coincidiendo con nuestros hallazgos, como también ocurrió en células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (150). En la dosis de 5 Gy, EGCG parece perder su efecto, como se ha podido observar en el resto de experimentos. La reducción de la efectividad de EGCG, puede ser debido a su efecto radioprotector. Kondo y cols (186) observaron como EGCG inhibió la apoptosis inducida por la radiación en queratinocitos humanos HaCaT vía inhibición de la cascada de caspasas. En otro estudio, EGCG mostró un efecto protector frente a la muerte celular en esplenocitos *in vitro* (187). Por ello, puede que EGCG actúe en condiciones de estrés oxidativo inducido por la radiación captando los electrones desapareados y modificando su estructura para producir un efecto protector sobre las células, así que en dosis altas, ésta pierde parte de su acción citotóxica. Llevado a la clínica podríamos pensar que EGCG debería ser aplicado tras la irradiación.

La migración de las células cancerosas conforma parte del proceso de extensión del tumor primario al resto de los órganos. Ambos 5-FU y EGCG habían reducido la migración celular en estudios previos (146,188). Por un lado, EGCG había reducido la invasión y la migración celular mediante la disminución de la producción de matrix metalloproteinasas, tipo 2 y tipo 9 en células de cáncer oral. Por otro lado, 5-FU aumento los niveles de la proteína sestrin2 mediante la ruta dependiente de p53, inhibiendo la migración celular en células de cáncer de colon. En nuestro estudio, 5-FU produce un descenso de la migración dosis-dependiente, mientras que la adición de EGCG produce un descenso aún mayor en la migración. Al igual que con el anterior experimento, es a dosis de 0 y 2.5 Gy cuando 5-FU+E tiene mayor acción.

La distribución del ciclo celular fue alterada respecto al control por la adición de 5-FU y 5-FU+E. Pese a las diferencias en las distintas líneas celulares, podemos observar dos tendencias claras. Primero, la incorporación de EGCG a 5-FU aumenta el número de células en la fase G2/M y segundo, como 5-FU (y 5-FU+E en la línea PE/CA) producen un secuestro del ciclo celular en la fase S, encontrándose la mayoría de las células en esa fase. En un estudio previo, 5-FU produjo un secuestro del ciclo celular en la fase S en células de cáncer de mama (189). Toden y cols (44)



observaron que EGCG inducía un secuestro en fase G2 de células de cáncer colorrectal, sin embargo, en combinación con 5-FU, predominaban los efectos del 5-FU, que modificaban el ciclo secuestrando la fase G0/G1. En nuestro estudio, sin embargo, predominan los efectos del EGCG sobre el ciclo celular. De nuevo, los contrastes entre 5-FU y 5-FU+E son mayores en células sin irradiar y en 2.5 Gy que en 5 Gy.

Pese a los datos obtenidos, nuestro estudio tiene diversas limitaciones: la variabilidad entre las líneas celulares y sobre todo la falta de estudios previos en los que se combinaran ambas sustancias junto a la radiación para poder hacer comparaciones.

5.1.3 DISCUSIÓN ESTUDIO 3: EFECTOS DEL ÁCIDO ZÓLEDRONICO SÓLO O EN COMBINACIÓN CON EGCG SOBRE LAS CELULAS CON FENOTIPO DE OSTEOLASTO SAOS-2

El ZA es un agente antirresortivo que disminuye el remodelado óseo por inhibición de los osteoclastos. Por ello ha sido ampliamente utilizado para tratar enfermedades óseas u otras enfermedades que cursan con procesos óseos, como la prevención de la metástasis de las células tumorales al hueso (61). Pese a que son efectivos en la prevención de metástasis, producen numerosos efectos adversos óseos, entre ellos hipocalcemia, fracturas atípicas y supresión excesiva del remodelado. Pese a que el papel de ZA sobre los osteoclastos ha sido extensamente estudiado, no ocurre igual con los osteoblastos (79–82,190). Por ello es importante seguir estudiando el rol del ZA en el metabolismo óseo y buscar diferentes alternativas para revertir la aparición de los eventos óseos.

En nuestro estudio, utilizamos la línea de osteosarcoma SAOS-2, que tiene un fenotipo de osteoblasto estable, por lo que es un buen modelo para estudiar las propiedades y funciones de los osteoblastos (139,191). En distintos experimentos se ha observado que dependiendo de la dosis, el ZA puede aumentar o disminuir la viabilidad de los osteoblastos (79–81,192). En nuestro estudio, las dosis a nivel nM (0.01 y 0.1 μ M), no producen ninguna diferencia en la viabilidad respecto al control, pero sí que lo producen al sobrepasar la barrera del nivel micromolar, reduciendo la viabilidad. Esta disminución en la viabilidad puede ser parcialmente revertida con la adición de EGCG. Resaltamos que la elección de la dosis de 10 μ M EGCG para la combinación se basa en tres motivos; estudios previos (139,140); por ser la concentración que más aumentó la viabilidad en nuestro experimento (Fig.50); por ser una dosis fisiológicamente alcanzable (124).


Tabla 25: Resumen de los efectos de ZA en distintas línea celulares de osteoblastos

Línea celular	Dosis usada	Resultados	Autor
Osteoblastos primarios humanos	0.001 nM – 1000 μ M	Inhibición la proliferación celular hasta 0.1 nM, donde aumenta ligeramente. De 0.01 nM a 0.01 μ M se produjo un aumento en la mineralización	Yang. y cols (79)
Células con fenotipo de osteoblasto MG-63 y G-292	5 – 25 μ M	Reducción de la proliferación celular, migración, mineralización y síntesis de colágeno	Huang y cols (81)
Osteoblastos primarios humanos	10-100 μ M	Reducción de la viabilidad. 10 μ M aumento la expresión de pro-colágeno I	Zara y cols (80)
Células con fenotipo de osteoblasto MC3T3-E1	0.01-100 μ M	Dosis >10 μ M disminuyeron viabilidad. Todas las dosis redujeron la mineralización	Huang y cols (82)
MC3T3-E1 y células madre mesenquimales	0.01-100 μ M	Dosis superiores a 1 μ M redujeron la viabilidad. La mineralización fue disminuida a todas las dosis	Patntirapong y cols (192)
Osteoblastos primarios humanos	1-50 μ M	Todas las dosis disminuyeron la migración. Mineralización y la proliferación fueron inhibidas a la dosis testada de 30 μ M.	Zafar y cols (193)

El proceso de mineralización es muy importante en la formación del hueso. Para poder observar la mineralización *in vitro*, usamos la tinción de Alizarina roja, un derivado antraquinónico. La Alizarina roja forma complejos con el calcio, produciendo una tinción de color roja brillante, utilizada para detectar la deposición de calcio en la mineralización de la matriz extracelular (139). En nuestros experimentos, pudimos observar que mientras la adición a nivel nanomolar no producía ninguna diferencia respecto al control, las dosis a nivel micromolar sí que producían una disminución en la mineralización. Yang y cols (79) encontraron resultados similares a los hallados en nuestra investigación, aunque en otros estudios se han observado que la adición de ZA a nivel nanomolar reducen la mineralización (192–194). Esta variabilidad de resultados puede ser debido a las diferencias en las condiciones experimentales, como el tiempo de exposición, líneas celulares, entre otras. Estos efectos inhibitorios eran parcialmente revertidos en la mayoría de los casos con la



adición de EGCG, llegando a superar incluso los valores del control a los 14 días y a la dosis de 0.1 μ M. EGCG ya había mostrado aumentar la mineralización *in vitro* en otros estudios (139,140)

El colágeno totaliza el 90% del material orgánico del hueso y es indispensable para la formación del mismo. Sirius Red es una tinción aniónica que se une a las moléculas de colágeno, predominantemente fibras tipo I y III (195). Los resultados que arrojan nuestro estudio indican que la producción de colágeno a nivel micromolar se ve dramáticamente comprometida, al igual que en otros estudios (80,81,196). Sin embargo, las dosis a nivel nanomolar no producen grandes cambios en la producción de colágeno respecto al control. La aplicación de EGCG a nivel micromolar consiguió revertir mínimamente los efectos del ZA y apenas tuvo efecto a nivel nanomolar. En un estudio previo, Qiu y cols (197) observaron que EGCG era capaz de estimular la expresión del propéptido de Procolágeno tipo I (PINP) en células mesenquimales de hueso.

El proceso de migración celular es indispensable a la hora de la reparación de tejidos dañados. La falta de la capacidad de reparación del hueso puede llevar a una exposición del hueso sin cicatrizar, culminando en un proceso de necrosis del hueso expuesto (198). En todas las dosis usadas, tanto a nivel μ M como nM, ZA produce un descenso de la capacidad de la migración de los osteoblastos, como ha sido observado por otros autores (81,193,199). Esto puede resultar en la falta de migración de osteoblastos y otras células para la reconstrucción del hueso, pudiendo conllevar a la aparición de eventos óseos. Sin embargo, la adición de EGCG fue capaz de restaurar parte de la capacidad migratoria de los osteoblastos, ejerciendo mayor acción en aquellas células que más dañadas estaban.

Las limitaciones deben ser consideradas. La principal limitación del estudio es el uso de una sola línea celular, ya que el uso de otras líneas celulares como osteoblastos diferenciados de células madre mesenquimales (hBMSCs) u osteoblastos primarios humanos (HOb) hubiera aumentado el valor de la investigación. Otra limitación es que no hemos podido comparar nuestros resultados con otras investigaciones debido a la falta de estudios similares, por lo que son necesario más investigaciones en este campo.

Resulta interesante resaltar que EGCG ha sido capaz de estimular la migración, mineralización, formación de colágeno y estimular la viabilidad celular de los osteoblastos. Sin embargo a dosis más altas ha mostrado efectos distintos en numerosos estudios, produciendo citotoxicidad y reduciendo la capacidad de migración, entre otros factores. Con el ZA ocurre algo similar, parecía no afectar a las células a dosis nanomolares, mientras que a dosis mayores afectaba



a las células de manera negativa. Por lo tanto, es de suma importancia un control de la dosis y farmacocinética de éstos compuestos para obtener el efecto deseado.

En las últimas décadas, la necesidad de desarrollar nuevos compuestos que permitan atender la alta demanda del cáncer y por otra parte disminuir los efectos adversos que se generan por los medicamentos empleados rutinariamente, han motivado la búsqueda de fuentes alternas para nuevos compuestos.

Los resultados mostrados en esta tesis abren distintas perspectivas de futuro en la investigación del tratamiento del cáncer oral. Sin embargo es necesario seguir avanzando en el estudio de los mecanismos por los que estas sustancias causan sus efectos, así como el uso de un mayor número de líneas celulares. El siguiente paso sería aplicar estos estudios a modelos *in vivo*, para ver si se plasman estos resultados.

CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

Los resultados aportados por este estudio nos muestran las siguientes conclusiones:

Conclusión 1

- DG y ZA fueron capaces de reducir la viabilidad, incrementar la apoptosis, modificar el ciclo y reducir la migración celular, mientras que EGCG fue capaz únicamente de modificar el ciclo celular y reducir la migración, por lo tanto, las tres sustancias testadas presentan un potencial efecto quimioterapéutico en el cáncer oral.

Conclusión 2

- La combinación de 5-FU con EGCG fue capaz de reducir la viabilidad, migración y alterar el ciclo celular en mayor medida que el 5-FU sólo, principalmente sin radiación o a 2.5 Gy, ya que el aumento de radiación desvanecía el efecto de EGCG

Conclusión 3

- El ZA produce efectos negativos sobre la viabilidad, mineralización, deposición colágeno y migración de los osteoblastos a nivel micromolar. Mientras, la adición de EGCG pudo revertir parte de los efectos inhibitorios del ZA.



6.1 CONCLUSIONS

The results obtained from our study has shown us the following conclusions:

Conclusion 1

- DG and ZA were able to decrease viability, boost apoptosis, modify the cell cycle and reduce migration, meanwhile EGCG only modified the cell cycle and decreased migration: therefore, these three drugs display potential chemotherapeutic effects on oral cancer

Conclusion 2

- The combination of EGCG and 5-FU reduced both cell viability and migration as well as altering the cell cycle to a greater extent compared to 5-FU alone, which mainly occurs without radiation or at 2.5 Gy, as an increase in radiation dose decreased EGCG's effect

Conclusion 3

- ZA at micromolar doses produced negative effects on osteoblast-like cells at all parameters measured, while at nanomolar levels, ZA only affected cell migration. The addition of EGCG partly reversed the effects produced by ZA

BIBLIOGRAFÍA



7. 1 BIBLIOGRAFÍA

1. Stewart BW, Wild CP. World cancer report 2014. World Heal Organ. 2014;1–2.
2. Gupta B, Johnson NW, Kumar N. Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. Oncology. 2016;91(1):13-23
3. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. Oral Oncol. 2009;45(4–5):309–16.
4. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós JR, Rojas D, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. Clin Transl Oncol. 2017;19(7):799–825.
5. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer. 2010;127(12):2893–917.
6. Scully C, Bagan J V. Oral squamous cell carcinoma: Overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. Oral Dis. 2009;15(6):388–99.
7. Warnakulasuriya S, Johnson NW, Van Der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. J Oral Pathol Med. 2007;36(10):575–80.
8. Petti S. Lifestyle risk factors for oral cancer. Oral Oncol. 2009;45(4–5):340–50.
9. Cancer IA for R on. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. Monograph [Internet]. 2004;83:Volume 83. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol83/index.php>
10. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Bernstein L, et al. Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. 1988;3282–7.
11. Bile KM, Shaikh J a, Afridi HUR, Khan Y. Smokeless tobacco use in Pakistan and its association with oropharyngeal cancer. East Mediterr Heal J. 2010;16 Suppl:S24–30.
12. Ali NS, Khuwaja AK, Ali T, Hameed R. Smokeless tobacco use among adult patients who visited family practice clinics in Karachi, Pakistan. J Oral Pathol Med. 2009;38(5):416–21.



13. Liao CT, Wallace CG, Lee LY, Hsueh C, Lin CY, Fan KH, et al. Clinical evidence of field cancerization in patients with oral cavity cancer in a betel quid chewing area. *Oral Oncol.* 2014;50(8):721–31.
14. Lin WJ, Jiang RS, Wu SH, Chen FJ, Liu SA. Smoking, alcohol, and betel quid and oral cancer: A prospective cohort study. *J Oncol.* 2011;2011.
15. Awang MN, Singapore Med J. Betel quid and oral carcinogenesis. *Singapore Med J.* 1988;29:589–93.
16. Hernandez BY, Zhu X, Goodman MT, Gatewood R, Mendiola P, Quinata K, et al. Betel nut chewing, oral premalignant lesions, and the oral microbiome. *PLoS One.* 2017;12(2):1–19.
17. Marron M, Boffetta P, Zhang Z-F, Zaridze D, Wunsch-Filho V, Winn DM, et al. Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *Int J Epidemiol.* 2010;39(1):182–96.
18. Hindle I, Downer MC, Moles DR, Speight PM. Is alcohol responsible for more intra-oral cancer? *Oral Oncol.* 2000;36(4):328–33.
19. Scully C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(3):306–11.
20. Seitz H.K. CCH (2009). Contribution of Alcohol and Tobacco Use in Gastrointestinal Cancer Development. In: Verma M. (eds) *Cancer Epidemiology. Methods in Molecular Biology*, vol 472. Humana Press;
21. Jané E. , Chimenos E. , López j RX. Modulacion Nutricional Y Quimioprevencion. *Med Oral.* 2003;8(1):260–8.
22. Suzuki T, Wakai K, Matsuo K, Hirose K, Ito H, Kuriki K, et al. Effect of dietary antioxidants and risk of oral, pharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma according to smoking and drinking habits. *Cancer Sci.* 2006;97(8):760–7.
23. Pavia M, Pileggi C, Nobile CG, Angelillo IF. Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(5):1126–34.



24. Meurman JH, Uittamo J. Oral micro-organisms in the etiology of cancer. *Acta Odontol Scand*. 2008;66(6):321–6.
25. Rampias T, Sasaki C, Psyrris A. Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. *Oral Oncol*. 2014;50(5):356–63.
26. Conway DI, Petticrew M, Marlborough H, Berthiller J, Hashibe M, Macpherson LMD. Socioeconomic inequalities and oral cancer risk: A systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Int J Cancer*. 2008;122(12):2811–9.
27. García-García V, Bascones Martínez A. Cáncer oral: Puesta al día. *Av Odontoestomatol*. 2009 Oct;25(5):239–48.
28. Prieto Prieto I, Prieto Fenech A, Bascones Martínez A. Cáncer oral. *Med Clin (Barc)*. 2006;127(7):258–64.
29. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: Clinical features. *Oral Oncol*. 2010;46(6):414–7.
30. Fives C, Nae A, Roche P, O’Leary G, Fitzgerald B, Feeley L, et al. Impact of mandibular invasion on prognosis in oral squamous cell carcinoma four centimeters or less in size. *Laryngoscope*. 2016;1–6.
31. Rao LP, Das SR, Mathews A, Naik BR, Chacko E, Pandey M. Mandibular invasion in oral squamous cell carcinoma: Investigation by clinical examination and orthopantomogram. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004;33(5):454–7.
32. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(6):1471–4.
33. De Júnior Araújo RF, Barboza CAG, Clebis NK, De Moura SAB, De Lisboa Lopes Costa A. Prognostic significance of the anatomical location and TNM clinical classification in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008;13(6):344–7.
34. Zini A, Czerninski R, Sgan-Cohen HD. Oral cancer over four decades: Epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. *J Oral Pathol Med*. 2010;39(4):299–305.
35. Geum D-H, Roh Y-C, Yoon S-Y, Kim H-G, Lee J-H, Song J-M, et al. The impact factors on 5-year survival rate in patients operated with oral cancer. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*.



2013;39(5):207–16.

36. Malik UU, Zarina S, Pennington SR. Oral squamous cell carcinoma: Key clinical questions, biomarker discovery, and the role of proteomics. *Arch Oral Biol* . 2016;63:53–65.
37. Pastor Gaitán P, Pineda Pineda MD, Abrio Odriozola MV, Núñez Aguilar J. Carcinomas de cabeza y cuello. *Medicine (Baltimore)*. 2005;9(24):1541–9.
38. Huang S, O Sullivan B. Oral cancer: Current role of radiotherapy and chemotherapy. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal*. 2013;18(2):e233–40.
39. Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2016;91(3):386–96.
40. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB et al. Postoperative Concurrent Radiotherapy and Chemotherapy for High-Risk Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2009;360(19):1933–11945.
41. Tolentino EDS, Centurion BS, Ferreira LHC, Souza AP De, Damante JH, Rubira-Bullen IRF. Oral adverse effects of head and neck radiotherapy: literature review and suggestion of a clinical oral care guideline for irradiated patients. *J Appl Oral Sci*. 2011;19(5):448–54.
42. Moreno-Jiménez M, Valero J, López-Picazo JM, Arbea L, Aristu J, Cambeiro M, et al. Concomitant Cisplatin, Paclitaxel, and Hyperfractionated Radiotherapy in Locally Advanced Head and Neck Cancer. *Am J Clin Oncol*. 2009 Sep;1.
43. Silvestre-Donat FJ, Puente Sandoval A. Efectos adversos del tratamiento del cáncer oral. *Av Odontoestomatol*. 2008;24(1):111–21.
44. Toden S, Tran H, Tovar-camargo OA, Okugawa Y. Epigallocatechin-3-gallate targets cancer stem-like cells and enhances 5-fluorouracil chemosensitivity in colorectal cancer. 2016;7(13).
45. da Silva SD, Hier M, Mlynarek A, Kowalski LP, Alaoui-Jamali MA. Recurrent oral cancer: Current and emerging therapeutic approaches. *Front Pharmacol*. 2012;3 JUL(July):1–7.
46. Pons-Fuster López E, Wang Q tong, Wei W, Lopez Jornet P. Potential chemotherapeutic effects of diosgenin, zoledronic acid and epigallocatechin-3-gallate on PE/CA-PJ15 oral squamous cancer cell line. *Arch Oral Biol*. 2017;82(April):141–6.



47. López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Gómez-García F. Effect of curcumin and irradiation in PE/CA-PJ15 oral squamous cell carcinoma. *Acta Odontol Scand*. 2011;69(5):269–73.
48. Vidal Spain. Fluorouracilo [Internet]. 2016 [cited 2017 Dec 22]. Available from: <https://www.vademecum.es/principios-activos-fluorouracilo-l01bc02>
49. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):330–8.
50. Malet-Martino M. Clinical Studies of Three Oral Prodrugs of 5-Fluorouracil (Capecitabine, UFT, S-1): A Review. *Oncologist*. 2002 Aug 16;7(4):288–323.
51. Epstein JB, Thariat J, Bensadoun R-J, Barasch A, Murphy B a., Kolnick L, et al. Oral Complications of Cancer and Cancer Therapy : From Cancer Treatment to Survivorship. *A Cancer J Clin*. 2012;62(6):400–22.
52. Fleisch H. Bisphosphonates : Mechanisms of Action. *Endocr Rev*. 1998;19(September):80–100.
53. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(9):1032–45.
54. Russell RGG. Bisphosphonates: From bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1068(1):367–401.
55. Leu CT, Luegmayr E, Freedman LP, Rodan GA, Reszka AA. Relative binding affinities of bisphosphonates for human bone and relationship to antiresorptive efficacy. *Bone*. 2006;38(5):628–36.
56. Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD, et al. Structure-Activity Relationships for Inhibition of Farnesyl Diphosphate Synthase in Vitro and Inhibition of Bone Resorption in Vivo by Nitrogen-Containing Bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;296(2):235–42.
57. Kavanagh KL, Guo K, Dunford JE, Wu X, Knapp S, Ebetino FH, et al. The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(20):7829–34.



58. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Russell RGG, Rogers MJ. Nitrogen-Containing Biphosphonates Inhibit the Mevalonate Pathway and Prevent Post-Translational Prenylation of GTP-Binding Proteins, Including Ras. *J Bone Miner Res.* 2005;20(7):1265–74.
59. Zhang D, Udagawa N, Nakamura I, Murakami H, Saito S, Yamasaki K, et al. The small GTP-binding protein, rho p21, is involved in bone resorption by regulating cytoskeletal organization in osteoclasts. *J Cell Sci.* 1995;108 (Pt 6):2285–92.
60. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 1992;70(3):401–10.
61. Nagaoka Y, Kajiya H, Ozeki S, Ikebe T, Okabe K. Mevalonates restore zoledronic acid-induced osteoclastogenesis inhibition. *J Dent Res.* 2015;94(4):594–601.
62. Augoulea A, Tsakonas E, Triantafyllopoulos I, Rizos D, Armeni E, Tsoltos N, et al. Comparative effects of denosumab or bisphosphonate treatment on bone mineral density and calcium metabolism in postmenopausal women. 2017;17(1):444–9.
63. Baykan EK, Saygılı LF, Erdogan M, Cetinkalp S, Ozgen AG, Yilmaz C. Efficacy of zoledronic acid treatment in Paget disease of bone. *Osteoporos Int.* 2014;25(9):2221–3.
64. Gavalda C, Bagan J V. Concept, diagnosis and classification of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. A review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2016;21(3):e260–70.
65. Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, et al. Once-Yearly Zoledronic Acid for Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. *N Engl J Med.* 2007 May 3;356(18):1809–22.
66. Lin JH. Bisphosphonates: A review of their pharmacokinetic properties. *Bone.* 1996;18(2):75–85.
67. Cremers SCLM, Pillai G, Papapoulos SE. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of bisphosphonates: Use for optimisation of intermittent therapy for osteoporosis. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(6):551–70.
68. Brown JP, Kendler DL, McClung MR, Emkey RD, Adachi JD, Bolognese MA, et al. The efficacy



- and tolerability of risedronate once a week for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2002;71(2):103–11.
69. Khan S a, Kanis J a, Vasikaran S, Kline WF, Matuszewski BK, McCloskey E V, et al. Elimination and Biochemical Responses to Intravenous Alendronate in Postmenopausal Osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1997 Oct 1;12(10):1700–7.
70. Kimmel DB. Mechanism of Action , Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile , and Clinical Applications of. *J Dent Res.* 2007;86(11):1022–33.
71. Hughes DE, MacDonald BR, Russell RGG, Gowen M. Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow. *J Clin Invest.* 1989;83(6):1930–5.
72. Vitté C, Fleisch H, Guenther HL. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology.* 1996 Jun;137(6):2324–33.
73. Pan B, Farrugia AN, To LB, Findlay DM, Green J, Lynch K, et al. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Bone Miner Res.* 2004;19(1):147–54.
74. Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch K-H, Blaschke S, Gründker C, et al. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;291(3):680–6.
75. Xu X-L, Gou W-L, Wang A-Y, Wang Y, Guo Q-Y, Lu Q, et al. Basic research and clinical applications of bisphosphonates in bone disease: what have we learned over the last 40 years? *J Transl Med.* 2013;11:303.
76. Ohe JY, Kwon YD, Lee HW. Bisphosphonates modulate the expression of OPG and M-CSF in hMSC-derived osteoblasts. *Clin Oral Investig.* 2012;16(4):1153–9.
77. Bellido T, Plotkin LI. Novel actions of bisphosphonates in bone: Preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone.* 2011;49(1):50–5.
78. Kim HK, Kim JH, Abbas AA, Yoon TR. Alendronate enhances osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells: A preliminary study. *Clin Orthop Relat Res.* 2009;467(12):3121–



- 8.
79. Yang X, Lu Y, Li Z, Wang Y, Zhao F, Han J. Low concentrations of zoledronic acid are better at regulating bone formation and repair. *Intractable Rare Dis Res* [Internet]. 2013;2(1):18–23.
80. Zara S, De Colli M, di Giacomo V, Zizzari VL, Di Nisio C, Di Tore U, et al. Zoledronic acid at subtoxic dose extends osteoblastic stage span of primary human osteoblasts. *Clin Oral Investig*. 2014;19(3):601–611.
81. Huang K-C, Cheng C-C, Chuang P-Y, Yang T-Y. The effects of zoledronate on the survival and function of human osteoblast-like cells. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015;16(1):355.
82. Huang X, Huang S, Guo F, Xu F, Cheng P, Ye Y, et al. Dose-dependent inhibitory effects of zoledronic acid on osteoblast viability and function in vitro. *Mol Med Rep*. 2016;13(1):613–22.
83. Reid IR, Brown JP, Burckhardt P, Horowitz Z, Richardson P, Trechsel U, et al. Intravenous zoledronic acid in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med*. 2002;346(9):653–61.
84. Body J-J. Treatment and Prevention of Bone Metastases and Myeloma Bone Disease. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Ames, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. p. 741–53.
85. Powles T, Paterson S, Kanis JA, McCloskey E, Ashley S, Tidy A, et al. Randomized, placebo-controlled trial of clodronate in patients with primary operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20(15):3219–24.
86. Berenson JR, Rosen LS, Howell A, Porter L, Coleman RE, Morley W, et al. Zoledronic acid reduces skeletal-related events in patients with osteolytic metastases: A double-blind, randomized dose-response study. *Cancer*. 2001;91(7):1191–200.
87. Rosen LS, Gordon D, Tchekmedyian NS, Yanagihara R, Hirsh V, Krzakowski M, et al. Long-term efficacy and safety of zoledronic acid in the treatment of skeletal metastases in patients with nonsmall cell lung carcinoma and other solid tumors: A randomized, phase III, double-blind, placebo-controlled trial. *Cancer*. 2004;100(12):2613–21.



88. Clemons MJ, Dranitsaris G, Ooi WS, Yogendran G, Sukovic T, Wong BYL, et al. Phase II trial evaluating the palliative benefit of second-line zoledronic acid in breast cancer patients with either a skeletal-related event or progressive bone metastases despite first-line bisphosphonate therapy. *J Clin Oncol*. 2006;24(30):4895–900.
89. Smith MR, McGovern FJ, Zietman AL, Fallon MA, Hayden DL, Schoenfeld DA, et al. Pamidronate to prevent bone loss during androgen-deprivation therapy for prostate cancer. *N Engl J Med*. 2001;345(13):948–55.
90. Gnant MFX, Mlineritsch B, Luschin-Ebengreuth G, Grampp S, Kaessmann H, Schmid M, et al. Zoledronic acid prevents cancer treatment-induced bone loss in premenopausal women receiving adjuvant endocrine therapy for hormone-responsive breast cancer: A report from the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 2007;25(7):820–8.
91. Clezardin P. Potential anticancer properties of bisphosphonates: insights from preclinical studies. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012;12(2):102–13.
92. Miller PD, Recker RR, Reginster JY, Riis BJ, Czerwinski E, Masanaukaite D, et al. Efficacy of monthly oral ibandronate is sustained over 5 years: The MOBILE long-term extension study. *Osteoporos Int*. 2012;23(6):1747–56.
93. Lamberg a L, Horvath-Puho E, Christensen S, Sørensen HT. Use of oral bisphosphonates and risk of venous thromboembolism: a population-based case-control study. *Osteoporos Int*. 2010 Nov 9;21(11):1911–7.
94. Chapurlat RD, Arlot M, Burt-Pichat B, Chavassieux P, Roux JP, Portero-Muzy N, et al. Microcrack Frequency and Bone Remodeling in Postmenopausal Osteoporotic Women on Long-Term Bisphosphonates: A Bone Biopsy Study. *J Bone Miner Res*. 2007;22(10):1502–9.
95. Armamento-Villareal R, Napoli N, Panwar V, Novack D. Suppressed Bone Turnover during Alendronate Therapy for High-Turnover Osteoporosis. *N Engl J Med*. 2006 Nov 9;355(19):2048–50.
96. Takeuchi K, Amagase K. Evaluation of gastric ulcerogenic and healing impairment effects of bisphosphonates: Adverse gastric reactions of bisphosphonate. *Curr Protoc Toxicol*. 2012;1(SUPPL.53):1–29.



97. Biswas PN, Wilton L V., Shakir SAW. Pharmacovigilance study of alendronate in England. *Osteoporos Int.* 2003;14(6):507–14.
98. Colella G, Campisi G, Fusco V. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper: Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws—2009 Update: The Need to Refine the BRONJ Definition. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Dec;67(12):2698–9.
99. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws-2009 Update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(5 SUPPL.):2–12.
100. Polymeri AA, Kodovazenitis GJ, Polymeris AD, Komboli M. Bisphosphonates: Clinical Applications and Adverse Events in Dentistry. *Oral Health Prev Dent.* 2015;13(4):289–99
101. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw—2014 Update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014 Oct;72(10):1938–56.
102. Migliorati CA, Siegel MA, Elting LS. Bisphosphonate-associated osteonecrosis: a long-term complication of bisphosphonate treatment. *Lancet Oncol.* 2006;7(6):508–14.
103. RE M. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of jaws: a growing epidemic. *Surg, J Oral Maxillofac.* 2003;1115–7.
104. Fliefel R, Tröltzsch M, Kühnisch J, Ehrenfeld M, Otto S. Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015 May;44(5):568–85.
105. Woo S, Hellstein JW, Kalmar JR. Annals of Internal Medicine Review Systematic Review : Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaws OF OF. *Ann Intern Med.* 2006;144(10):753–61.
106. Reid IR. Osteonecrosis of the jaw - Who gets it, and why? *Bone.* 2009;44(1):4–10.
107. Bilezikian JP. Osteonecrosis of the jaw--do bisphosphonates pose a risk? *N Engl J Med.* 2006;355(22):2278–81.
108. Xie F, Li P, Gong J, Zhang J, Ma J. The bisphosphonate zoledronic acid effectively targets lung



- cancer cells by inhibition of protein prenylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;467(4):664–9
109. Fragni M, Bonini SA, Stabile A, Bodei S, Cristinelli L, Simeone C, et al. Inhibition of Survivin Is Associated with Zoledronic Acid-induced Apoptosis of Prostate Cancer Cells. *Anticancer Res.* 2016;36(3):913–20.
 110. Wang I-T, Chou S-C, Lin Y-C. Zoledronic acid induces apoptosis and autophagy in cervical cancer cells. *Tumour Biol.* 2014;35(12):11913–20.
 111. Lopez Jornet P, Susana SC, Rosario TM, Alvaro P-F. Zoledronic acid and irradiation in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2015;44(2):103–8.
 112. Tamura T, Shomori K, Nakabayashi M, Fujii N, Ryoke K, Ito H. Zoledronic acid, a third-generation bisphosphonate, inhibits cellular growth and induces apoptosis in oral carcinoma cell lines. *Oncol Rep.* 2011;25(4):1139–43.
 113. Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer.* 1992 Jan;18(1):1–29.
 114. Tiwari BK, Brunton NP, Brennan CS. *Handbook of Plant Food Phytochemicals*. Tiwari BK, Brunton NP, Brennan CS, editors. Oxford: John Wiley & Sons Ltd; 2013. 518 p.
 115. Andrs-Lacueva C, Medina-Remon A, Llorach R, Urpi-Sarda M, Khan N, Chiva-Blanch G, et al. Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables. In: *Fruit and Vegetable Phytochemicals*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2009. p. 53–88.
 116. Manach C, Scalbert A, Morand C et al. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:727–47.
 117. D'Archivio M, Filesì C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita.* 2007;43(4):348–61.
 118. Pandey KB, Rizvi SI. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2(5):270–8.
 119. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45(4):287–306.



120. Krupkova O, Ferguson SJ, Wuertz-Kozak K. Stability of (-)-epigallocatechin gallate and its activity in liquid formulations and delivery systems. *J Nutr Biochem*. 2016;37:1–12.
121. Barras A, Mezzetti A, Richard A, Lazzaroni S, Roux S, Melnyk P, et al. Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules. *Int J Pharm*. 2009;379(2):270–7.
122. Higdon J V., Frei B. Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects, Metabolism, and Antioxidant Functions. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2003;43(1):89–143.
123. Chen Z, Zhu QY, Tsang D, Huang Y. Degradation of Green Tea Catechins in Tea Drinks. *J Agric Food Chem*. 2001 Jan;49(1):477–82.
124. Ullmann U, Haller J, Decourt J, Girault N, Girault J, Richard-Caudron A, et al. A Single Ascending Dose Study of Epigallocatechin Gallate in Healthy Volunteers. *J Int Med Res*. 2003;31:88–101.
125. Dube A, Nicolazzo JA, Larson I. Chitosan nanoparticles enhance the plasma exposure of (-)-epigallocatechin gallate in mice through an enhancement in intestinal stability. *Eur J Pharm Sci*. 2011;44(3):422–6.
126. Yang CS, Lee MJ, Chen L. Human salivary tea catechin levels and catechin esterase activities: Implication in human cancer prevention studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999;8(1):83–9.
127. Chow H-HS, Hakim IA. Pharmacokinetic and chemoprevention studies on tea in humans. *Pharmacol Res*. 2011 May;27(3):320–31.
128. Rietveld A WS. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. *J Nutr*. 2003;133(10):3244S–3246S.
129. Unno T, Sugimoto A, Kakuda T. Scavenging effect of tea catechins and their epimers on superoxide anion radicals generated by a hypoxanthine and xanthine oxidase system. *J Sci Food Agric*. 2000;80(5):601–6.
130. Pirker KF, Severino JF, Reichenauer TG, Goodman BA. Free radical processes in green tea polyphenols (GTP) investigated by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Biotechnol Annu Rev*. 2008;14(8):349–401.



131. Meng Q, Velalar CN, Ruan R. Regulating the Age-Related Oxidative Damage, Mitochondrial Integrity, and Antioxidative Enzyme Activity in Fischer 344 Rats by Supplementation of the Antioxidant Epigallocatechin-3-Gallate. *Rejuvenation Res.* 2008;11(3):649–60.
132. Chu C, Deng J, Man Y, Qu Y. Green Tea Extracts Epigallocatechin-3-gallate for Different Treatments. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1–9.
133. Li GX, Chen YK, Hou Z, Xiao H, Jin H, Lu G, et al. Pro-oxidative activities and dose-response relationship of (-)-epigallocatechin-3-gallate in the inhibition of lung cancer cell growth: a comparative study in vivo and in vitro. *Carcinogenesis.* 2010;31(5):902–10.
134. Elbling L, Herbacek I, Weiss R-M, Jantschitsch C, Micksche M, Gerner C, et al. Hydrogen peroxide mediates EGCG-induced antioxidant protection in human keratinocytes. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(9):1444–52.
135. Tedeschi E, Menegazzi M, Yao Y, Suzuki H, Förstermann U, Kleinert H. Green tea inhibits human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1alpha activation. *Mol Pharmacol.* 2004;65(1):111–20.
136. Kim I-B, Kim D-Y, Lee S-J, Sun M-J, Lee M-S, Li H, et al. Inhibition of IL-8 production by green tea polyphenols in human nasal fibroblasts and A549 epithelial cells. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(6):1120–5.
137. Devine A, Hodgson JM, Dick IM, Prince RL. Tea drinking is associated with benefits on bone density in older women. *Am J Clin Nutr.* 2007;86(4):1243–7.
138. Nakagawa H, Wachi M, Woo J-T, Kato M, Kasai S, Takahashi F, et al. Fenton Reaction Is Primarily Involved in a Mechanism of (-)-Epigallocatechin-3-gallate to Induce Osteoclastic Cell Death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;292(1):94–101.
139. Vali B, Rao LG, El-Sohemy A. Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. *J Nutr Biochem.* 2007;18(5):341–7.
140. Mah Y-J, Song JS, Kim S-O, Lee J-H, Jeon M, Jung U-W, et al. The effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on human alveolar bone cells both in vitro and in vivo. *Arch Oral Biol.* 2014;59(5):539–49.



141. Corcoran MP, McKay DL, Blumberg JB. Flavonoid Basics: Chemistry, Sources, Mechanisms of Action, and Safety. *J Nutr Gerontol Geriatr*. 2012;31(3):176–89.
142. Ohga N, Hida K, Hida Y, Muraki C, Tsuchiya K, Matsuda K, et al. Inhibitory effects of epigallocatechin-3 gallate, a polyphenol in green tea, on tumor-associated endothelial cells and endothelial progenitor cells. *Cancer Sci*. 2009;100(10):1963–70.
143. Lee MH, Han D-W, Hyon S-H, Park J-C. Apoptosis of human fibrosarcoma HT-1080 cells by epigallocatechin-3-O-gallate via induction of p53 and caspases as well as suppression of Bcl-2 and phosphorylated nuclear factor- κ B. *Apoptosis*. 2011;16(1):75–85.
144. Hwang YS, Park KK, Chung WY. Epigallocatechin-3 gallate inhibits cancer invasion by repressing functional invadopodia formation in oral squamous cell carcinoma. *Eur J Pharmacol*. 2013;715(1–3):286–95.
145. Chen PN, Chu SC, Kuo WH, Chou MY, Lin JK, Hsieh YS. Epigallocatechin-3 gallate inhibits invasion, epithelial-mesenchymal transition, and tumor growth in oral cancer cells. *J Agric Food Chem*. 2011;59(8):3836–44.
146. Ho YC, Yang SF, Peng CY, Chou MY, Chang YC. Epigallocatechin-3-gallate inhibits the invasion of human oral cancer cells and decreases the productions of matrix metalloproteinases and urokinase-plasminogen activator. *J Oral Pathol Med*. 2007;36(10):588–93.
147. Lee JC, Chung LC, Chen YJ, Feng TH, Chen WT, Juang HH. Upregulation of B-cell translocation gene 2 by epigallocatechin-3-gallate via p38 and ERK signaling blocks cell proliferation in human oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2015;360(2):310–8.
148. Irimie AI, Braicu C, Zanoaga O, Pileczki V, Gherman C, Berindan-Neagoe I, et al. Epigallocatechin-3-gallate suppresses cell proliferation and promotes apoptosis and autophagy in oral cancer SSC-4 cells. *Onco Targets Ther*. 2015;8:461–70.
149. Yang X, Wang X, Cao L, Jiang X, Peng H, Lin S, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate enhances 5-fluorouracil-induced cell growth inhibition of hepatocellular carcinoma cells. 2012;494–501.
150. Masuda M, Suzui M, Weinstein IB. Effects of epigallocatechin-3-gallate on growth, epidermal growth factor receptor signaling pathways, gene expression, and chemosensitivity in human



- head and neck squamous cell carcinoma cell lines. Clin Cancer Res. 2001;7(12):4220–9.
151. Schwartz JL, Baker V, Larios E, Chung F-L. Molecular and cellular effects of green tea on oral cells of smokers: A pilot study. Mol Nutr Food Res. 2005 Jan;49(1):43–51.
 152. Tsao A, Liu D, Martin J, Tang X, Lee J, El-Naggar A, et al. Phase II Randomized, Placebo-controlled Trial of Green Tea Extract in Patients with High-risk Oral Premalignant Lesions. Cancer Prev Res. 2009;2(11):931–41.
 153. Djerassi C, Rosenkranz G, Pataki J, Kauffman S. Steroids, XXVII. Synthesis of allopregnane-3beta, 11beta, 17alpha-, 20beta, 21-pentol from cortisone and diosgenin. J Biol Chem. 1952;194(1):115–8.
 154. Shibata S. Saponins with biological and pharmacological activity. Dtsch Apotheker Zeitung. 1976;116(39):1435–9.
 155. Jung DH, Park HJ, Byun HE, Park YM, Kim TW, Kim BO, et al. Diosgenin inhibits macrophage-derived inflammatory mediators through downregulation of CK2, JNK, NF- κ B and AP-1 activation. Int Immunopharmacol. 2010;10(9):1047–54.
 156. Shishodia S, Aggarwal BB. Diosgenin inhibits osteoclastogenesis, invasion, and proliferation through the downregulation of Akt, I kappa B kinase activation and NF-kappa B-regulated gene expression. Oncogene. 2006;25(10):1463–73.
 157. Das S, Dey KK, Dey G, Pal I, Majumder A, MaitiChoudhury S, et al. Antineoplastic and Apoptotic Potential of Traditional Medicines Thymoquinone and Diosgenin in Squamous Cell Carcinoma. PLoS One. 2012;7(10):e46641.
 158. Vincken J-P, Heng L, de Groot A, Gruppen H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochemistry. 2007 Feb;68(3):275–97.
 159. Ur Rahman S, Ismail M, Khurram M, Ullah I, Rabbi F, Iriti M. Bioactive Steroids and Saponins of the Genus Trillium. Molecules. 2017;22(12):2156.
 160. Chen Y, Tang Y-M, Yu S-L, Han Y-W, Kou J-P, Liu B-L, et al. Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenin. Chin J Nat Med. 2015;13(8):578–87.
 161. Huang CH, Liu DZ, Jan TR. Diosgenin, a plant-derived sapogenin, enhances regulatory T-Cell



- immunity in the intestine of mice with food allergy. *J Nat Prod.* 2010;73(6):1033–7.
162. Huang C-H, Ku C-Y, Jan T-R. Diosgenin attenuates allergen-induced intestinal inflammation and IgE production in a murine model of food allergy. *Planta Med.* 2009;75(12):1300–5.
163. Khan H, Saeed M, Rauf A, Khan MA, Muhammad N. Antimicrobial and inhibition on heat-induced protein denaturation of constituents isolated from *Polygonatum verticillatum* rhizomes. *Nat Prod Res.* 2015;29(22):2160–3.
164. Gong G, Qin Y, Huang W. Anti-thrombosis effect of diosgenin extract from *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright in vitro and in vivo. *Phytomedicine.* 2011;18(6):458–63.
165. Qu X, Zhai Z, Liu X, Li H, Ouyang Z, Wu C, et al. Dioscin inhibits osteoclast differentiation and bone resorption through down-regulating the Akt signaling cascades. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;443(2):658–65.
166. Chiang SS, Chang SP, Pan TM. Osteoprotective effect of monascus-fermented *dioscorea* in ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Agric Food Chem.* 2011;59(17):9150–7.
167. Chang HY, Kao MC, Way T Der, Ho CT, Fu E. Diosgenin suppresses hepatocyte growth factor (HGF)-induced epithelial-mesenchymal transition by down-regulation of Mdm2 and vimentin. *J Agric Food Chem.* 2011;59(10):5357–63.
168. Corbiere C, Liagre B, Terro F, Beneytout J-L. Induction of antiproliferative effect by diosgenin through activation of p53, release of apoptosis-inducing factor (AIF) and modulation of caspase-3 activity in different human cancer cells. *Cell Res.* 2004;14(3):188–96.
169. Li Y, Wang X, Cheng S, Du J, Deng Z, Zhang Y, et al. Diosgenin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2015;33(2):693–8.
170. J.Cassidy, D. Bissett RSO. Cancer of the oral cavity. *Oxford Handb Oncol.* 2015;24(3):448–446.
171. Nagler RM. Saliva as a tool for oral cancer diagnosis and prognosis. *Oral Oncol* [Internet]. 2009;45(12):1006–10.
172. Minhas S, Kashif M, Altaf W, Afzal N, Nagi AH. Concomitant-chemoradiotherapy-associated oral lesions in patients with oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Biol Med.* 2017;14(2):176.



173. Carmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay : Assessment of Chemosensitivity Testing Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay : Assessment. Am Assoc Cancer Res. 1987;47:936–42.
174. Valster A, Tran NL, Nakada M, Berens ME, Chan AY, Symons M. Cell migration and invasion assays. Methods. 2005;37(2):208–15.
175. Cmoch A, Podsiwylow-Bartnicka P, Palczewska M, Piwocka K, Groves P, Pikula S. Stimulators of mineralization limit the invasive phenotype of human osteosarcoma cells by a mechanism involving impaired invadopodia formation. PLoS One. 2014;9(10).
176. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: Comparison with cetylpyridinium chloride extraction. Anal Biochem. 2004;329(1):77–84.
177. Ciapetti G, Verri E, Granchi D, Cenni E, Gamberini S, Benetti D, et al. In vitro assessment of phagocytosis of bovine collagen by human monocytes/macrophages using a spectrophotometric method. 1996;17(17).
178. Lee JH, Jin H, Shim HE, Kim HN, Ha H, Lee ZH. Epigallocatechin-3-gallate inhibits osteoclastogenesis by down-regulating c-Fos expression and suppressing the nuclear factor-kappaB signal. Mol Pharmacol. 2010;77(1):17–25.
179. Chang YC, Chen PN, Chu SC, Lin CY, Kuo WH, Hsieh YS. Black tea polyphenols reverse epithelial-to-mesenchymal transition and suppress cancer invasion and proteases in human oral cancer cells. J Agric Food Chem. 2012;60(34):8395–403.
180. Wang XU, Chongkui Sun, Shiliang He, Xiurong Guo, Hao Xu XZ et al. Apoptotic Effects of Diosgeninlactoside on Oral Squamous Carcinoma Cells in Vitro and in Vivo. Biol Pharm Bull. 2014;37(9):1450–9.
181. Ge X-Y, Yang L-Q, Jiang Y, Yang W-W, Fu J, Li S-L. Reactive Oxygen Species and Autophagy Associated Apoptosis and Limitation of Clonogenic Survival Induced by Zoledronic Acid in Salivary Adenoid Cystic Carcinoma Cell Line SACC-83. PLoS One. 2014;9(6):e101207
182. Inoue S, Arai N, Tomihara K, Takashina M, Hattori Y, Noguchi M. Extracellular Ca-dependent



- enhancement of cytocidal potency of zoledronic acid in human oral cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 2015;761:44–54.
183. Chen PS, Shih YW, Huang HC, Cheng HW. Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits migration and invasion of human prostate cancer pc-3 cells by reducing matrix metalloproteinases expression. *PLoS One.* 2011;6(5):1–10.
184. Luo KW, Yue GGL, Ko CH, Gao S, Lee JKM, Li G, et al. The combined use of *Camellia sinensis* and metronomic zoledronate in 4T1 mouse carcinoma against tumor growth and metastasis. *Oncol Rep.* 2015;34(1):477–87.
185. Jee HG, Lee KE, Kim J Bin, Shin HK, Youn YK. Sulforaphane Inhibits Oral Carcinoma Cell Migration and Invasion In Vitro. 2011;1628(May 2010):1623–8.
186. Kondo H, Park S-H, Watanabe K, Yamamoto Y, Akashi M. Polyphenol (-)-epigallocatechin gallate inhibits apoptosis induced by irradiation in human HaCaT keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;316(1):59–64.
187. Richi B, Kale RK, Tikku AB. Radio-modulatory effects of Green Tea Catechin EGCG on pBR322 plasmid DNA and murine splenocytes against gamma-radiation induced damage. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2012;747(1):62–70.
188. Seo K, Ki SH, Park EY, Shin SM. 5-Fluorouracil inhibits cell migration by induction of Sestrin2 in colon cancer cells. *Arch Pharm Res.* 2017;40(2):231–9.
189. Grem JL, Nguyen D, Monahan BP, Kao V, Geoffroy FJ. Sequence-dependent antagonism between fluorouracil and paclitaxel in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 1999;58(3):477–86.
190. Olejnik C, Falgayrac G, During A, Cortet B, Penel G. Doses effects of zoledronic acid on mineral apatite and collagen quality of newly-formed bone in the rat's calvaria defect. *Bone.* 2016;89:32–9.
191. Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, et al. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res.* 1987;47(18):4961–6.



192. Patntirapong S, Singhatanadgit W, Chanruangvanit C, Lavanrattanukul K, Satravaha Y. Zoledronic acid suppresses mineralization through direct cytotoxicity and osteoblast differentiation inhibition. *J Oral Pathol Med*. 2012;41(9):713–20.
193. Zafar S, Coates DE, Cullinan MP, Drummond BK, Milne T, Seymour GJ. Effects of zoledronic acid and geranylgeraniol on the cellular behaviour and gene expression of primary human alveolar osteoblasts. *Clin Oral Investig*. 2016 Nov 22;20(8):2023–35.
194. Basso FG, Silveira Turrioni AP, Hebling J, De Souza Costa CA. Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. *Gerontology*. 2013;59(6):534–41.
195. Siddiqui S, Arshad M. Osteogenic potential of punica granatum through matrix mineralization, cell cycle progression and runx2 gene expression in primary rat osteoblasts. *Daru*. 2014;22:72.
196. Ebert R, Zeck S, Krug R, Meissner-Weigl J, Schneider D, Seefried L, et al. Pulse treatment with zoledronic acid causes sustained commitment of bone marrow derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation. *Bone* 2009;44(5):858–64.
197. Qiu Y, Chen Y, Zeng T, Guo W, Zhou W, Yang X. EGCG ameliorates the hypoxia-induced apoptosis and osteogenic differentiation reduction of mesenchymal stem cells via upregulating miR-210. *Mol Biol Rep*. 2016;43(3):183–93.
198. Ravosa MJ, Ning J, Liu Y, Stack MS. Bisphosphonate effects on the behaviour of oral epithelial cells and oral fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 2011;56(5):491–8.
199. Hagelauer N, Ziebart T, Pabst AM, Walter C. Bisphosphonates inhibit cell functions of HUVECs, fibroblasts and osteogenic cells via inhibition of protein geranylgeranylation. *Clin Oral Investig*. 2014;19(5):1079–91.

ANEXOS



8. ANEXOS

8.1 TRABAJOS EN RELACIÓN CON LA TESIS DOCTORAL

Referencia Estudio	Pons-Fuster López E, Wang Q, Wei W, López Jornet P. Potential chemotherapeutic effects of diosgenin, zoledronic acid and epigallocatechin-3-gallate on PE/CA-PJ15 oral squamous cancer cell line. Arch Oral Biol. 2017;82(April):141–6
Indicio de calidad	Categorías: Dentistry, Cell Biology, Otorhinolaryngology Factor de impacto: 1.748 Clasificación: 32/90 (Q2)
Archives of Oral Biology 82 (2017) 141–146 Contents lists available at ScienceDirect Archives of Oral Biology journal homepage: www.elsevier.com/locate/archoralbio Research paper Potential chemotherapeutic effects of diosgenin, zoledronic acid and epigallocatechin-3-gallate on PE/CA-PJ15 oral squamous cancer cell line Eduardo Pons-Fuster López^{a,*}, Qin-tong Wang^b, Wei Wei^b, Pia López Jornet^a ^a Department of Oral Medicine, University of Murcia, Murcia, Spain ^b Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Antiinflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Anti-Inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032, China  	

8.2 COMUNICACIONES EN RELACIÓN CON LA TESIS DOCTORAL

- Comunicación 1. Título: “ Potenciales efectos quimiopreventivos del ácido zoledrónico, diosgenina y epigalo-3-catequingalato”
Autores: **Pons-Fuster López E, Wang Q, Wei W, López Jornet P**
Lugar: III Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia
Fecha: 01/06/2017
- Comunicación 2. Título: “ Suplementación con epigalo-3-catequingalato reduce los daños producidos en osteoblastos tratados con ácido zoledrónico”
Autores: **Pons-Fuster López E, Gómez Garcia F, Mora Montoya D, Cortes Lillo O, Alcaina Lorente A, López Jornet P.**
Lugar: I Jornada Interdisciplinares de Jóvenes Investigadores
Fecha: 31/10/17

