

**UNIVERSIDAD DE BURGOS**



**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS  
ALIMENTOS**

**EFECTO DE LA QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA  
EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL  
SOBRE BIOMARCADORES DEL ESTRÉS  
OXIDATIVO Y DEL ESTADO REDOX PLASMÁTICO**

**REYES DE SANTIAGO ARTECHE  
BURGOS 2010**





Universidad de Burgos



## Universidad de Burgos

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Dña. Pilar Muñiz Rodríguez, profesora titular de la Universidad de Burgos y D. Carlos García Girón, Jefe del Servicio de Oncología Médica del Hospital General Yagüe, en su calidad de directores de la tesis doctoral

### **Certifican**

Que la memoria titulada “*Efecto de la quimioterapia antineoplásica en pacientes con cáncer colorrectal sobre biomarcadores del estrés oxidativo y del estado redox plasmático*” que presenta Dña. Reyes de Santiago Arteche, licenciada en Farmacia, ha sido realizada bajo nuestra dirección y autorizamos su presentación para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Burgos.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Burgos, a 8 de Marzo de 2010.

Fdo. Dra. Pilar Muñiz Rodríguez

Fdo. Dr. Carlos García Girón





**Universidad de Burgos**  
**DEPARTAMENTO BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

SAGRARIO BELTRAN CALVO, CATEDRÁTICA DE LA UNIVERSIDAD DE BURGOS, EN SU CALIDAD DE DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS.

### **CERTIFICA**

Que la memoria titulada “*Efecto de la quimioterapia antineoplásica en pacientes con cancer colorrectal sobre biomarcadores del estrés oxidativo y del estado redox plasmático*” que presenta Dña. Reyes de Santiago Arteche, Licenciada en Farmacia, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Pilar Muñiz Rodriguez, Profesora Titular de Universidad de Burgos y el Dr. Carlos García Giron Jefe del Servicio de Oncología Médica del Hospital General Yague y en representación del Consejo de Departamento, autoriza su presentación para ser defendida como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Burgos, a 8 de Marzo de 2010.

Fdo. Sagario Beltran Calvo



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero transmitir mi más sincero agradecimiento a quienes de una u otra forma han colaborado en la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Pilar Muñiz, por su tiempo, su paciencia y su dedicación. Porque es infatigable y una gran científica e investigadora.

Al Dr. Carlos García Girón, por su apoyo y amabilidad, por sus conocimientos y consejos que tan útiles han sido para la consecución de este trabajo.

Sin ellos, este trabajo, que es tan suyo como mío, no hubiera salido adelante.

A la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Coma, Jefa de la Unidad de Investigación del Hospital General Yagüe, donde se ha realizado la parte experimental de este trabajo.

A Mónica Cavia, de la Unidad de Investigación del Hospital General Yagüe, por su ayuda inestimable en la realización de la parte experimental de este trabajo.

A mis compañeras de la Unidad de Investigación, Marta, Yolanda, Carolina, Charo, Silvia y Celia, por su apoyo, su escucha y los buenos ratos que hemos compartido.

A los médicos, enfermeras y todo el personal del Servicio de Oncología Médica del Hospital General Yagüe, por su colaboración desinteresada en la realización de este estudio, tanto en la selección de pacientes y extracción de muestras como en los temas administrativos que me han facilitado en todo momento.

A los pacientes y donantes de sangre que han participado voluntariamente y que han confiado en nosotros, porque sin ellos este estudio no hubiera sido posible.

Este trabajo ha sido realizado en la Unidad de Investigación del Hospital General Yagüe de Burgos, y ha sido financiado por el proyecto del SACYL (GRS220/A/08) y por Caja Burgos a través de las ayudas a la investigación clínica en las convocatorias del 2007 y 2008.

*A Eduardo y a Bruno*

*A mi familia*

*Gracias por formar parte de mi vida*



# INDICE GENERAL

<b>1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>1</b>
1.1. ESTRÉS OXIDATIVO.....	1
1.1.1. Estrategias celulares contra los radicales libres. Sistemas antioxidantes.....	11
1.1.1.1. Antioxidantes enzimáticos.....	14
1.1.1.2. Antioxidantes no enzimáticos.....	21
1.1.1.2.1. Endógenos.....	21
1.1.1.2.2. Antioxidantes presentes en el plasma.....	25
1.1.1.2.3. Exógenos. Antioxidantes presentes en la dieta.....	27
1.2. CÁNCER COLORRECTAL.....	33
1.2.1. Factores de riesgo en cáncer colorrectal. Causalidad.....	39
1.2.2. Marcadores tumorales.....	42
1.2.3. Tratamiento quimioterápico en cáncer colorrectal.....	46
1.3. ESTRÉS OXIDATIVO Y CÁNCER.....	55
1.3.1. Mecanismos de carcinogénesis.....	55
1.3.2. Señalización celular y cáncer.....	58
1.3.3. Cáncer colorrectal y daño oxidativo a biomoléculas.....	61
1.4. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO.....	67
1.4.1. Capacidad antioxidante total.....	67
1.4.2. Evaluación de los biomarcadores de estrés oxidativo.....	68
1.4.3. Evaluación del estado redox.....	70
<b>2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....</b>	<b>73</b>
2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	73
2.2. OBJETIVOS.....	73
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>75</b>
3.1. MATERIAL.....	75
3.1.1. Aparatos.....	75
3.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	76
3.2.1. Selección de pacientes.....	76
3.2.2. Tamaño de la muestra.....	77
3.2.3. Obtención de muestras y procesamiento.....	79

3.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	80
3.3.1. Capacidad antioxidante total del plasma.....	80
3.3.1.1. Determinación mediante el método FRAP.....	80
3.3.1.2. Determinación mediante el método ABTS.....	81
3.3.1.3. Determinación de polifenoles totales.....	82
3.3.2. Determinación de nitrato y nitrito.....	83
3.3.3. Determinación de biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas.....	85
3.3.3.1. Daño oxidativo a lípidos.....	85
3.3.3.1.1. Determinación de Hidroperóxidos.....	85
3.3.3.1.2. Determinación de malondialdehído (MDA).....	86
3.3.3.2. Daño oxidativo a proteínas. Determinación grupos carbonilo...	88
3.3.4. Determinación del estado redox.....	89
3.3.4.1. Determinación de glutatión reducido (GSH).....	89
3.3.4.2. Determinación de la actividad tiorredoxina reductasa (TrxR)...	90
3.3.4.3. Determinación de los niveles de tiorredoxina (Trx).....	91
3.3.5. Otras determinaciones.....	92
3.3.5.1. Determinación de proteínas en plasma y en linfocitos.....	92
3.3.5.2. Determinaciones del laboratorio clínico de referencia.....	93
3.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	94
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>95</b>
4.1. ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS INICIALES DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES Y SUJETOS CONTROL.....	95
4.2. ESTUDIO COMPARATIVO DEL ESTADO OXIDATIVO SEGÚN EL TIPO DE CÁNCER.....	101
4.2.1. Capacidad antioxidante total del plasma.....	101
4.2.2. Biomarcadores de óxido nítrico en plasma.....	102
4.2.3. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas.....	103
4.2.4. Estado Redox.....	107
4.3. ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL.....	109
4.3.1. Estudio del estrés oxidativo asociado al cáncer colorrectal.....	109
4.3.1.1. Capacidad antioxidante total del plasma.....	110
4.3.1.2. Biomarcadores de óxido nítrico en plasma.....	111
4.3.1.3. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas.....	112

4.3.1.4. Estado Redox.....	114
4.3.2. Estudio del estrés oxidativo asociado al tratamiento quimioterápico en pacientes con cáncer colorrectal.....	116
4.3.2.1. Estudio del estrés oxidativo en pacientes con cáncer colorrectal asociado al tratamiento quimioterápico.....	117
4.3.2.1.1. Capacidad antioxidante total del plasma.....	117
4.3.2.1.2. Biomarcadores de óxido nítrico en plasma.....	118
4.3.2.1.3. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas.....	119
4.3.2.1.4. Estado Redox.....	121
4.3.2.2. Estudio del estrés oxidativo en pacientes con cáncer colorrectal asociado al tipo de tratamiento quimioterápico.....	124
4.3.2.2.1. Capacidad antioxidante total del plasma.....	125
4.3.2.2.2. Biomarcadores de óxido nítrico en plasma.....	126
4.3.2.2.3. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas.....	126
4.3.2.2.4. Estado Redox.....	129
4.3.3. Estudio del estrés oxidativo asociado a metástasis en pacientes con cáncer colorrectal.....	132
4.3.3.1. Estudio del estrés oxidativo en cáncer colorrectal asociado a metástasis en un grupo de pacientes sin tratamiento quimioterápico.....	132
4.3.3.1.1. Capacidad antioxidante total del plasma.....	132
4.3.3.1.2. Biomarcadores de óxido nítrico en plasma.....	133
4.3.3.1.3. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas.....	134
4.3.3.1.4. Estado Redox.....	137
4.3.3.2. Estudio del estrés oxidativo en cáncer colorrectal asociado a metástasis en un grupo de pacientes en tratamiento quimioterápico.....	139
4.3.3.2.1. Capacidad antioxidante total del plasma.....	139
4.3.3.2.2. Biomarcadores de óxido nítrico en plasma.....	140
4.3.3.2.3. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas.....	141
4.3.3.2.4. Estado Redox.....	144
4.3.3.3. Estudio del estrés oxidativo en cáncer colorrectal asociado al tipo de metástasis en un grupo de pacientes en tratamiento quimioterápico.....	146
4.3.3.3.1. Capacidad antioxidante total del plasma.....	146
4.3.3.3.2. Biomarcadores de óxido nítrico en plasma.....	147
4.3.3.3.3. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas.....	148
4.3.3.3.4. Estado Redox.....	151

4.3.4. Estudio del estrés oxidativo asociado a concentración de los marcadores tumorales CEA y Ca 19.9 en pacientes con cáncer colorrectal.....	153
4.3.4.1. Estudio del estrés oxidativo en cáncer colorrectal asociado a concentración de CEA en un grupo de pacientes en tratamiento quimioterápico.....	153
4.3.4.1.1. Capacidad antioxidante total del plasma.....	154
4.3.4.1.2. Biomarcadores de óxido nítrico en plasma.....	155
4.3.4.1.3. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas.....	155
4.3.4.1.4. Estado Redox.....	158
4.3.4.2. Estudio del estrés oxidativo en cáncer colorrectal asociado a concentración de Ca 19.9 en un grupo de pacientes en tratamiento quimioterápico.....	160
4.3.4.2.1. Capacidad antioxidante total del plasma.....	160
4.3.4.2.2. Biomarcadores de óxido nítrico en plasma.....	161
4.3.4.2.3. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas.....	162
4.3.4.2.4. Estado Redox.....	165
4.3.5. Estudio del estrés oxidativo asociado a otras patologías en pacientes con cáncer colorrectal.....	166
4.3.6. Estudio de las correlaciones entre marcadores de estrés oxidativo en pacientes con cáncer colorrectal.....	167
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>171</b>
5.1. ESTUDIO COMPARATIVO DEL ESTADO OXIDATIVO SEGÚN EL TIPO DE CÁNCER.....	174
5.2. ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL.....	178
5.2.1. Estudio del estrés oxidativo asociado al cáncer colorrectal.....	179
5.2.2. Estudio del estrés oxidativo asociado al tratamiento quimioterápico en pacientes con cáncer colorrectal.....	181
5.2.3. Estudio del estrés oxidativo asociado a metástasis en pacientes con cáncer colorrectal.....	188
5.2.4. Estudio del estrés oxidativo asociado a concentración de los marcadores tumorales CEA y Ca 19.9 en pacientes con cáncer colorrectal.....	195
5.2.5. Estudio del estrés oxidativo asociado a otras patologías en pacientes con cáncer colorrectal.....	198
5.2.6. Estudio de las correlaciones entre los diferentes marcadores de estrés oxidativo en pacientes con cáncer colorrectal.....	199
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>203</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>205</b>

## ***REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA***



## **1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1. ESTRÉS OXIDATIVO**

El estrés oxidativo está implicado en varios procesos patológicos tales como alteraciones cardiovasculares, desordenes neurológicos, diabetes, isquemias, cáncer e incluso el propio envejecimiento (Dalle-Donne et al., 2006; Heistad et al., 2009; Visconti and Grieco, 2009; Wells et al., 2009).

Estas alteraciones se pueden clasificar en dos grupos, por una parte estarían las caracterizadas por variaciones en el estado redox y cambios en la tolerancia de la glucosa, también denominado estrés oxidativo mitocondrial, relacionado con enfermedades como el cáncer y la diabetes mellitus y por otra parte, estarían implicados los desordenes caracterizados por condiciones inflamatorias oxidativas y un aumento de la actividad de la NADPH oxidasa y/o xantina oxidasa inducido por especies oxigénicas reactivas (ROS). Estas últimas estarían relacionadas con procesos inflamatorios crónicos, arterioesclerosis e isquemias y reperfusiones.

El estrés oxidativo (EO) es el desequilibrio entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes a favor de los primeros (Sies, 1991). Así pues, el estrés oxidativo puede originarse por un exceso de sustancias prooxidantes o radicales libres, una deficiencia de agentes antioxidantes o por ambos factores a la vez.

Los radicales libres son moléculas o fragmentos de moléculas que contienen uno o más electrones desapareados en un nivel energético superior (Halliwell, 1996). Este desapareamiento electrónico proporciona propiedades paramagnéticas y les confiere una alta e indiscriminada reactividad.

En los sistemas biológicos, además de los radicales libres se generan otras especies químicas que por sí mismas no son reactivas pero en presencia de metales de transición (hierro y cobre) u otros radicales generan radicales libres altamente reactivos. Todos ellos se agrupan con el nombre de especies reactivas del oxígeno (ROS) o del nitrógeno (RNS) (Bergendi et al., 1999; Miller et al., 1990).

Existen muchas clases de radicales libres, y como ya se ha mencionado, destacan fundamentalmente los compuestos por oxígeno o nitrógeno (ERONs), viniendo determinada la capacidad de cada especie por cuatro características básicas como son: reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad. Entre los más importantes, cabe destacar:

- Anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Se trata de una especie relativamente poco reactiva, pero potencialmente tóxica, ya que puede iniciar reacciones que den lugar a otros ROS que a su vez sí son muy reactivos (Fujita et al., 2009).
- Radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). Es la especie más reactiva, con una vida media estimada de alrededor de  $10^{-9}$  segundos (Liochev and Fridovich, 1994; Nguyen et al., 2008). Su alta reactividad hace que su acción química quede reducida a la estricta vecindad del lugar de producción.
- Radical peroxilo ( $ROO\cdot$ ). Son probablemente los radicales más abundantes en los sistemas biológicos, no siendo tan reactivos como otros ROS. Se originan a partir de la adición del oxígeno a prácticamente cualquier radical hidrocarbonado. Este radical tiene una vida media relativamente larga (del orden de segundos).
- Óxido nítrico ( $NO\cdot$ ). Desde hace años se ha comenzado a prestar particular atención a esta especie reactiva del nitrógeno, debido a su importante papel en la señalización molecular de determinados procesos biológicos (Koshland, 1992; Li et al., 2009). Juega un papel fundamental en la regulación del flujo sanguíneo local, inhibe la agregación plaquetaria, es un neurotransmisor y es producido por los macrófagos activados contribuyendo a la defensa inmunitaria primaria.  $NO\cdot$  se sintetiza en los tejidos a partir de arginina mediante una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (Moncada and Palmer, 1991). En ambientes acuosos, este radical tiene una semivida de pocos segundos, incrementando su estabilidad hasta más de 15 segundos en ambientes con bajas concentraciones de oxígeno. Además, es soluble en medios acuosos y lipídicos, lo que le confiere una elevada difusibilidad tanto a través del citoplasma como de las membranas plasmáticas. En el medio extracelular reacciona con oxígeno y agua formando los aniones nitrito y nitrato.

- Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Aunque no es un radical libre como tal y su capacidad oxidante es débil, en presencia de trazas de catalizadores metálicos como el hierro o el cobre o de otros radicales libres puede dar lugar a la formación del radical  $\cdot\text{OH}$ . Cabe destacar el papel que juega como molécula señalizadora (Du et al., 2006) gracias a sus propiedades bioquímicas, tales como su relativa elevada vida media, su facilidad para difundir a través de las membranas y su solubilidad, tanto en medios hidrófobos como en medios acuosos (Droge, 2002b).
- Oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ). Es una forma excitada del oxígeno molecular. Su vida media es muy corta, alrededor  $10^{-6}$  segundos, aunque depende de la naturaleza de la matriz circundante.
- Peroxinitrito ( $\text{NOO}^-$ ). Está en equilibrio con su ácido conjugado. En soluciones neutras es un potente agente oxidante.

Las especies no radicales son de baja reactividad, pero en presencia de metales de transición (hierro y cobre) pasan a radical hidroxilo, que es la especie oxigénica más reactiva y tóxica, dada su elevada capacidad para reaccionar con las distintas biomoléculas (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos).

El anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) es el mayor reductor, la simple adición de un protón da lugar a la formación del radical hidropéroxido ( $\text{HO}_2\cdot$ ) convirtiéndose en un agente oxidante muy activo, selectivo y específico. El  $\text{O}_2^{\cdot-}$  no es particularmente reactivo a lípidos, glúcidos o ácidos nucleicos y exhibe reactividad limitada con determinadas proteínas. Esta evidencia constata que el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  reacciona con proteínas que contienen metales en su grupo prostético. El radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), sin embargo, reacciona con cualquier molécula que tenga cerca, sin especificidad alguna.

Los tres componentes con mayor capacidad de difusión son el radical superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, capaces de reaccionar con moléculas que se encuentran alejadas del lugar de origen incluso con capacidad de atravesar membranas celulares.



**Figura 1.** Especies oxigénicas reactivas.

Junto a estos radicales existen otros derivados o centrados en átomos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, azufre, cloro, etc., que indiscutiblemente contribuyen a la propagación y mantenimiento de nuevas reacciones que conducen a la formación de radicales.

Los radicales libres pueden producirse a través de diversos procesos químicos, tanto dentro como fuera del organismo. Atendiendo al origen de su producción, se pueden clasificar las fuentes en exógenas y endógenas (Cadenas, 1989; Inoue et al., 2003).

- Fuentes exógenas:

- Factores nutricionales y ambientales, como contaminantes aéreos fotoquímicos, radiaciones ultravioleta (Zastrow et al., 2009), hiperoxia, pesticidas, humo del tabaco (Carnevali et al., 2003), solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos.
- La irradiación de los organismos debido a las radiaciones electromagnéticas o radiaciones de partículas.
- Muchos agentes antineoplásicos, tales como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina, el oxaliplatino y algunos antibióticos (Kopetz et al., 2009; Meynard et al., 2007). Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.

Además, la producción de radicales libres se puede ver aumentada bajo ciertas condiciones fisiopatológicas como la inflamación, la hiperoxia, el metabolismo de algunas drogas, alteraciones renales, la exposición a radiaciones y el cáncer (Il'yasova et al., 2008; Swaminathan and Shah, 2008).

- Fuentes endógenas:

Cabe destacar que una misma célula tiene potencialmente más de una fuente de producción de radicales libres.

- Cadena de transporte electrónico mitocondrial. En los tejidos sanos una de las principales fuentes de radicales libres son las mitocondrias, descrito hace ya más de tres décadas por Loschen (Loschen et al., 1971) y constituyendo por tanto, la principal fuente fisiológica de ROS (Le Bras et al., 2005). Esto se debe a que estos orgánulos son responsables de más del 90% del consumo de oxígeno celular y a que los radicales libres en los sistemas biológicos proceden siempre, en último término, del metabolismo monovalente de la molécula de oxígeno. Por otra parte, son muchas las patologías en las que se ha descrito que la mitocondria genera radicales libres, siendo la causa del estrés oxidativo que sufre la célula.
- Cadena de transporte electrónico del retículo endoplasmático y membrana nuclear. Ambos sistemas de membranas contienen citocromos P<sub>450</sub> que pueden oxidar ácidos grasos insaturados y xenobióticos (Dostalek et al., 2008). De hecho, los citocromos P<sub>450</sub> son los más poderosos oxidantes *in vivo*, aunque también pueden actuar como agentes reductores.
- Las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos y eosinófilos) poseen diversas enzimas (sistema de la NADPH oxidasa y óxido nítrico sintasa) como mecanismo de defensa frente a los microorganismos, generando directamente radical superóxido y óxido nítrico (Kirkham, 2007).
- Enzimas solubles y proteínas. Enzimas como xantina oxidoreductasa, aldehído oxidasa, dihidroorotato deshidrogenasa, flavinproteín deshidrogenasa y triptófano dioxigenasa, generan radicales libres durante su ciclo catalítico (George and Struthers, 2009).
- Autooxidación de pequeñas moléculas. Existen en la célula una gran variedad de componentes solubles, capaces de producir reacciones de oxidación-

reducción, tales como los tioles, hidroquinonas, catecolaminas, flavinas y tetrahidropterinas.

- Reacción de Fenton-Haber-Weiss. Consistente en la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por iones de metales de transición, sobre todo el ión ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y el cuproso ( $\text{Cu}^+$ ) y otros iones, para generar radicales hidroxilo (Leonard et al., 2004). También a partir del peróxido de hidrógeno y en presencia del radical superóxido puede formarse el radical hidroxilo, por la reacción de Haber-Weiss (Liochev and Fridovich, 2002).

Cada célula está caracterizada por una concentración de electrones o también denominado estado redox, cuya oscilación determina un gran número de funciones fisiológicas controladas por vías de señalización respondedoras a este nivel de oxidorreducción (Trachootham et al., 2008). Este estado se mantiene con un estrecho margen de variación, similar a la forma en que se regulan los niveles de pH.

De esta forma, los radicales libres son por tanto necesarios para el buen funcionamiento celular, pudiendo actuar en transducción de señales, activación enzimática, síntesis de DNA y RNA, proliferación celular, modificaciones proteicas post-transduccionales, diferenciación y apoptosis (England and Cotter, 2005; Poli et al., 2004).

Sin embargo, no es importante sólo la existencia o no de estos radicales libres como un aspecto meramente cualitativo, sino que es de especial importancia la cantidad de éstos. Por ello, conviene destacar que una cantidad excesiva de alguna especie concreta de radicales puede ser perjudicial para un determinado sistema biológico, mientras que, por otra parte, hay situaciones en las que una cantidad insuficiente de radicales libres es también indeseable, como puede ser el caso de procesos de apoptosis celular (Wang and Yi, 2008).

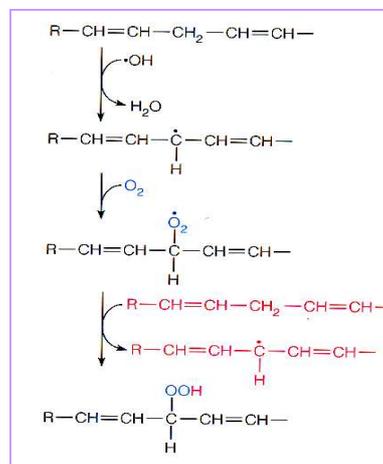
No obstante, en la mayoría de los casos, niveles elevados de radicales libres producen estrés oxidativo, induciendo un daño causado por la interacción de los radicales libres con distintas macromoléculas biológicas, como lípidos, proteínas,

ácidos nucleicos y carbohidratos y generando reacciones en cadena de radicales libres (Valko et al., 2004; Valko et al., 2006).

Se ha estimado que una célula humana está expuesta aproximadamente a  $1,5 \times 10^5$  oxidaciones/día como consecuencia de la acción de los distintos tipos de radicales libres (Beckman and Ames, 1997). La capacidad de cada radical o especie oxigénica reactiva viene determinada, desde el punto de vista químico, por cuatro características básicas como son: reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad.

El proceso de ataque oxidativo a los lípidos se denomina peroxidación lipídica y tiene lugar fundamentalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados (Cross et al., 1987), provocando en las membranas de las que forman parte, una pérdida de flexibilidad y de las funciones secretoras, así como la ruptura de los gradientes iónicos transmembrana, asociándose principalmente con el daño vascular.

Esta es una reacción en cadena, teniendo lugar en tres fases, iniciación, propagación y terminación (Figura 2) (Esterbauer et al., 1991; Girotti, 1998).



**Figura 2.** Esquema de la peroxidación lipídica.

Así, esta peroxidación lipídica puede iniciarla el radical hidroxilo, el radical hidroperóxido y quizá el oxígeno singlete, pero no el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno, que son menos reactivos. El radical libre extrae un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metileno de la cadena del ácido graso, dejando un electrón no apareado, con lo cual se genera un radical lipídico. Este radical lipídico rápidamente sufre un reordenamiento molecular para producir un dieno conjugado

que reacciona con el oxígeno molecular produciendo un radical hidroperoxilo. Este radical puede a su vez extraer un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado para formar un nuevo radical lipídico y un hidroperóxido lipídico. El radical lipídico entonces se combina con otra molécula de oxígeno y continúa la reacción en cadena.

Los productos finales de este proceso de peroxidación lipídica son aldehidos, gases hidrocarbonatos y varios residuos químicos, incluyendo el malondialdehido (MDA) y el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE). La peroxidación lipídica puede tener efectos profundos sobre las funciones celulares, pues afecta a las membranas, produciendo cambios en la fluidez, aumento de la permeabilidad, disminución del potencial de membrana y finalmente su rotura.

Además, los productos de degradación pueden difundir lejos de su lugar de producción y provocar edema celular, además de influir sobre la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis. Asimismo, pueden alterar la actividad de fosfolipasas e inducir la liberación de ácido araquidónico, con la subsiguiente formación de prostaglandinas y endoperóxidos.

El malondialdehido, a su vez, puede reaccionar con lípidos y proteínas durante la peroxidación lipídica para formar bases de Schiff conjugadas, productos fluorescentes insolubles que se acumulan en el interior de lisosomas, formando el pigmento de envejecimiento conocido con el nombre de lipofucsina, reconocido marcador morfológico de envejecimiento ya que se acumula en los tejidos con la edad (Hutter et al., 2007).

Por otra parte, mientras que las moléculas de MDA reaccionan con el DNA, provocando diversas mutaciones genéticas, las de HNE son capaces de reaccionar con proteínas provocando alteraciones importantes que afectan directamente a diversas vías de señalización así como con proteínas implicadas directamente en mecanismos de muerte celular (Awasthi et al., 2003).

La acción de los radicales libres sobre las proteínas puede ser reversible o irreversible, dependiendo del objetivo y de la forma del daño oxidativo, ejerciéndose fundamentalmente sobre los enlaces insaturados, los anillos aromáticos y los grupos

tiol (-SH). De esta forma, proteínas ricas en determinados aminoácidos (triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína) pueden sufrir modificaciones estructurales y funcionales. El triptófano, tirosina, histidina y cisteína son particularmente sensibles a los ROS (Stadtman, 2004). Los grupos sulfhidrilo pueden ser transformados en puentes disulfuro (S=S), produciéndose la inactivación enzimática (si la proteína es un enzima). En otros casos, en los que las proteínas son estructurales, como el colágeno, las fibrillas se pueden romper por el radical superóxido e hidroperóxido, proceso que puede constituir el punto de partida para la acción de proteasas y facilitar la pérdida de estructura de la triple hélice del colágeno.

Como resultado de estas interacciones se produce un incremento de grupos carbonilo de las cadenas laterales de los aminoácidos y un descenso de grupos tiol en el entrecruzamiento entre cadenas peptídicas o en la fragmentación de enlaces peptídicos. Esta oxidación puede dar lugar a una pérdida o modificación de la actividad biológica de las proteínas y alterar su recambio, estando asociado con un número de enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Belonogov et al., 2009; Bulteau et al., 2006; Danielson and Andersen, 2008; Davies, 1987; Stadtman, 1992, 2004).

Los radicales libres interaccionan con los glúcidos de forma variable. La glucosa constituye un captador del radical superóxido y la manosa y el manitol son eliminadores del radical hidroxilo. Sin embargo, los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres (Monboisse et al., 1988), como el ácido hialurónico y los proteinglicanos. Este daño oxidativo a los polisacáridos de función estructural da lugar a procesos degenerativos como la artritis reumatoidea.

Por otra parte, se ha observado una relación directa entre los radicales libres y el estrés oxidativo con la diabetes mellitus. Se postula que una anormal regulación en el metabolismo de los peróxidos y los metales de transición colabora con el establecimiento de la enfermedad, así como en las complicaciones que aparecen a largo plazo (Oberley, 1988; Wei et al., 2009; Wolff, 1993).

Los radicales libres pueden reaccionar con todos los componentes del DNA. En presencia de oxígeno, se forman radicales peroxilo por adición de oxígeno a las

bases o al azúcar del DNA. Las reacciones posteriores de los radicales formados en el DNA dan lugar a un gran número de efectos, que incluyen rotura de cadenas, sitios abásicos y modificación de bases. También se forman puentes cruzados DNA-proteína (Cooke et al., 2003). Muchos de estos productos encontrados *in vitro*, también aparecen en el DNA de tejidos animales tras el tratamiento con sustancias que estimulan la generación de radicales libres. Según estudios realizados existe una fuerte correlación entre daño al DNA producido por oxidación y cáncer, así como la evolución de los diferentes estadios del proceso de carcinogénesis (Tsuzuki et al., 2007).

El aumento de daño oxidativo es un proceso natural que en condiciones fisiológicas normales produce una modificación en las bases siendo su relación de 1/130.000 bases en el DNA nuclear y 1/8.000 en el DNA mitocondrial (Inoue et al., 2003; Richter et al., 1988). Esto se debe, sobretodo, a la cercanía que el DNA mitocondrial tiene al lugar principal de generación de radicales libres en la célula sana, la cadena de transporte mitocondrial. También se debe a que este DNA carece de histonas y poliaminas que puedan protegerlo, y su capacidad de reparación es mínima en relación con la del DNA nuclear. Como consecuencia de todo esto, las deleciones y mutaciones del DNA mitocondrial también son mayores que en el DNA nuclear.

Cuando un radical libre ataca una desoxirribosa del DNA se produce una ruptura de la hebra. El número de productos del resultado de la oxidación de las bases nitrogenadas del DNA por radicales libres supera la veintena. Entre ellas la 8-hidroxi-desoxiguanina (8-OH-dG) (Figura 3) es la alteración que se observa con más frecuencia ( $10^5$  residuos de guanina en una célula normal), y es utilizado como biomarcador de estrés oxidativo por ser capaz de reflejar pequeños cambios oxidativos del daño al DNA (Floyd, 1990; Haghdost et al., 2005). Además, su importancia reside en su alto efecto mutagénico, ya que la 8-OH-dG durante la replicación del DNA, se empareja con adenina en vez de hacerlo con citosina (Cheng et al., 1992).

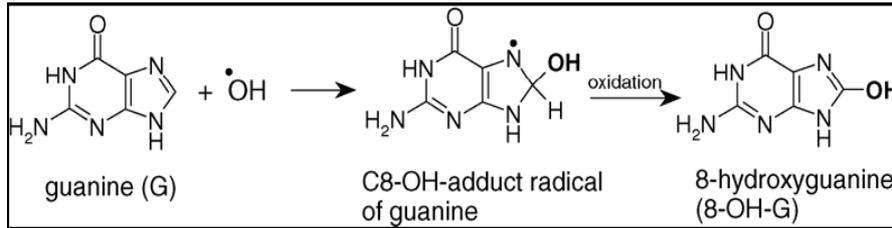


Figura 3. Formación de la base modificada 8-hidroxi guanina.

Un daño moderado al DNA puede detener el ciclo celular o bien disparar mecanismos de reparación para conservar la integridad del mismo, no obstante, si este daño es excesivo, se pueden poner en marcha procesos que inducen apoptosis y muerte celular (David et al., 2007).

Por todo lo señalado, el estrés oxidativo es considerado un factor etiológico importante en muchos procesos patológicos del ser humano (Figura 4).

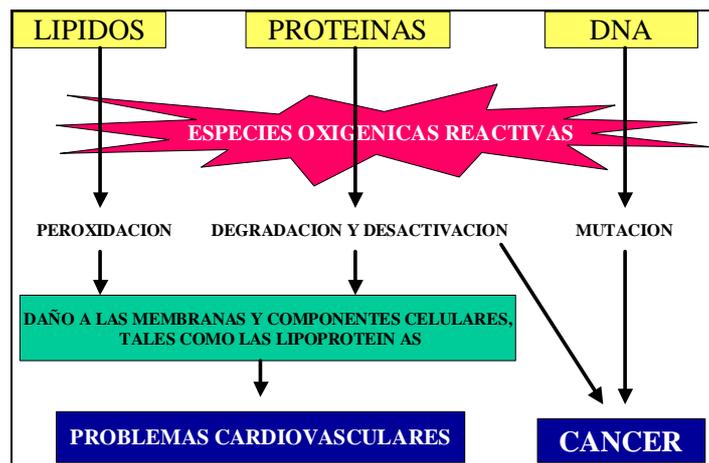


Figura 4. Esquema del estrés oxidativo.

Así, se le ha relacionado con la insuficiencia renal crónica y algunas enfermedades renales agudas, carcinogénesis, la arterioesclerosis, la hipertensión arterial y enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, el desarrollo del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, las complicaciones a largo plazo de la diabetes, etc. (Valko et al., 2007).

### 1.1.1. Estrategias celulares contra los radicales libres. Sistemas antioxidantes

Los organismos aeróbicos frente a la oxidación de las células y los tejidos han desarrollado evolutivamente una serie de complejos antioxidantes que limitan la

actividad y la producción de ROS y RNS y mantienen el sistema bajo control (Cadenas, 1997).

Una sustancia antioxidante es aquella que, a concentraciones relativamente bajas, es capaz de competir con otros sustratos oxidables y, por tanto, retrasar o inhibir la oxidación de dichos sustratos (Gutteridge and Halliwell, 1989). En esta definición se engloban tanto los antioxidantes enzimáticos como los no enzimáticos. No obstante, también hay que decir que existen sustancias que tienen poca actividad específica antioxidante, pero que, a altas concentraciones, contribuyen significativamente al potencial antioxidante de una célula o sistema. Ejemplos de este último caso son los aminoácidos, péptidos y proteínas.

Un buen antioxidante debe tener capacidad para unirse específicamente a los radicales libres, quelarse con los metales redox, interactuar con otros antioxidantes para su regeneración (Sies et al., 2005), tener un efecto positivo sobre la expresión génica, estar en una concentración adecuada y suficiente en los tejidos y fluidos biológicos y trabajar en medios acuosos y/o en dominios membranosos.

Esta serie de características se pueden resumir en que deben tener una elevada efectividad, variabilidad operativa y versatilidad para poder combinarse con una importante variedad de especies de radicales libres.

Los mecanismos de defensa que han desarrollado los organismos vivos implican mecanismos preventivos que evitan la formación de los radicales libres, mecanismos reparadores que son aquellos que reconocen el daño oxidativo y lo reparan, defensas fisiológicas y defensas antioxidantes.

Las defensas antioxidantes se pueden clasificar en función de su naturaleza como antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos y en función de su procedencia como antioxidantes endógenos y exógenos (Figura 5).

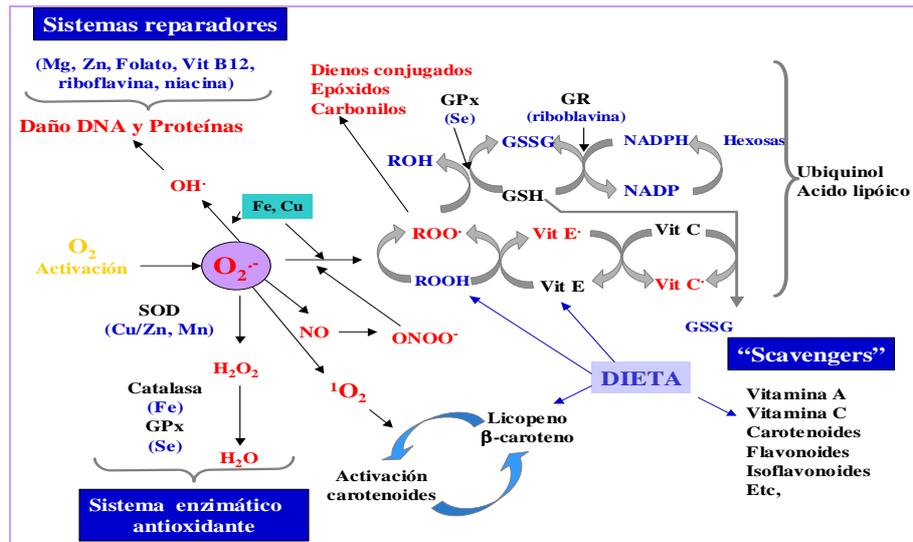


Figura 5. Esquema de la producción de ROS y mecanismos de defensa antioxidante.

Las estrategias de los antioxidantes incluyen tres niveles de actuación: prevención, intercepción (secuestradores) y eliminación (Figura 6) (Sies, 1993).



Figura 6. Esquema del mecanismo de acción de los antioxidantes.

En el ámbito preventivo, evitan la formación de radicales libres como el radical  $\cdot\text{OH}$ , son de naturaleza enzimática y constituyen la primera defensa del organismo frente a ROS.

Los secuestradores, estabilizan los radicales libres, pueden ser endógenos (glutacion) o exógenos (vitaminas y polifenoles).

Por último, en la fase de eliminación y/o reparación actúan cuando las biomoléculas ya han sufrido el daño, eliminándolas o reparándolas (glicosilasas de ADN, fosfolipasas y proteasas).

Cuando se produce estrés oxidativo las células son capaces de inducir una respuesta adaptativa por parte del organismo. Por una parte, habrá una activación de la defensa antioxidante mediante la activación de factores de transcripción o bien por la inducción inmediata de genes, dando lugar a la producción de las enzimas antioxidantes. Por otra parte, habrá una represión del sistema productor de ROS, mediante fundamentalmente la inhibición de la actividad mitocondrial.

Pero si finalmente se produce el desequilibrio entre ROS y los sistemas antioxidantes, se puede condicionar la aparición de alteraciones funcionales y estructurales a cualquier nivel del organismo. Hay que tener en cuenta que las membranas biológicas son permeables a los oxidantes y sus metabolitos, lo que hace que el lugar del “ataque “ oxidante pueda estar lejos del lugar donde se originan los ROS, y el lugar de la acción antioxidante pueda estar lejos de ambos (Ichikawa et al., 1993).

#### **1.1.1.1. Antioxidantes enzimáticos**

Las células disponen de enzimas específicas para la neutralización de diversas especies reactivas, como son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx). No obstante, las oxidorreductasas de grupos tioles y disulfuros, como el sistema tiorredoxina y la glutarredoxina, también han adquirido importancia en la prevención del estrés oxidativo celular.

##### **Superóxido dismutasa (SOD)**

De los antioxidantes enzimáticos la superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) fue la primera enzima en descubrirse por McCord y Fridovich en 1969. Está presente en todas las células que utilizan en su metabolismo el oxígeno y está ausente en las células anaerobias obligadas.

Constituye la primera defensa contra el radical superóxido, la cual lo transforma en peróxido de hidrógeno. Esto es así porque la función fisiológica de la SOD es la eliminación de los radicales superóxido producidos en las reacciones del metabolismo aerobio (McCord and Fridovich, 1969).



En el ser humano y otros mamíferos existen tres isoenzimas, pertenecientes a la familia de las metaloproteínas (Landis and Tower, 2005), la CuZn-SOD, la Mn-SOD y la ecSOD. La primera se localiza en el citosol, mientras que la segunda se ubica en la matriz mitocondrial, y la tercera, que también es una CuZn-SOD, es extracelular (Saitoh et al., 1994; Stralin et al., 1995).

La CuZn-SOD es una enzima homodimérica con un peso molecular de aproximadamente 32 kDa (Desideri and Falconi, 2003). Cada subunidad contiene un sitio activo en el que lleva unido los iones cobre y zinc.

La Mn-SOD, mitocondrial, es un homotetrámero con un peso de 88 KDa, que contiene un átomo de manganeso por subunidad y durante la reacción tiene lugar la oxidorreducción del manganeso.

La ecSOD es una glicoproteína tetramérica que contiene cobre y zinc en el centro activo. Presenta alta afinidad por ciertos glicosaminoglicanos como la heparina. Su regulación es principalmente en respuesta a la acción de las citoquinas más que a una respuesta individual de los oxidantes celulares.

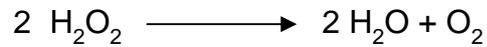
La concentración intracelular de la SOD citosólica es de 4-10  $\mu\text{M}$ , mientras que la intramitocondrial es de 20  $\mu\text{M}$ , aunque varía según los tejidos.

### Catalasa (CAT)

La enzima catalasa (EC. 1.11.1.6) se encuentra en las células aeróbicas localizada en los peroxisomas. Es un tetrámero de un peso molecular de 240 KDa con un cofactor férrico que debe estar unido al sitio activo de la enzima.

Presenta dos tipos de actividad (Aebi, 1984), actividad catalasa, facilitando la descomposición del peróxido de hidrógeno para dar agua y oxígeno, y actividad

peroxidasa, que supone oxidación de dadores de hidrogeniones como el metanol, etanol, ácido fórmico o fenoles, con el consiguiente consumo de peróxido.



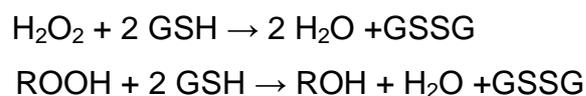
Aunque realiza la misma función que la glutathion peroxidasa (GPx), ésta última tiene mayor afinidad por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , es decir, a bajas concentraciones, la GPx juega un papel más importante que la catalasa.

Fisiológicamente la catalasa cumple un papel fundamental en la detoxificación del agua oxigenada producida por algunas enzimas localizadas en los peroxisomas, como la amino-oxidasa. La actividad catalasa varía enormemente en función del tejido. Es muy alta en hígado y riñón y muy baja en el tejido conectivo. Intracelularmente se localiza en los peroxisomas y en las mitocondrias, aunque en el eritrocito se encuentra en la fracción soluble del citoplasma.

#### Glutathion peroxidada (GPx)

Existen dos tipos de glutathion peroxidasa, una independiente de selenio (glutathion-S-transferasa; GST EC 2.5.1.18) (Sheehan et al., 2001) y otra que es selenio dependiente (GPx, EC 1.11.1.19). En humanos existen cinco glutathion peroxidadas dependientes de selenio (Brigelius-Flohe, 2006) (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 y GPx6).

Todas las enzimas añaden dos electrones a los peróxidos reducidos para formar selenoles (Se-OH). Las propiedades antioxidantes de las seleno enzimas permiten la eliminación de peróxidos como potenciales sustratos para la reacción de Fenton. Por tanto, esta enzima reduce el agua oxigenada o el hidroperóxido orgánico a agua y alcohol respectivamente, y para ello utiliza en ambos casos el glutathion reducido (GSH) como donante de electrones, el cual está presente en las células en altas concentraciones:



El selenio es fundamental para su actividad, de forma que el déficit de este elemento en la dieta produce una drástica disminución de la glutathion peroxidasa en

todos los tejidos. Es responsable de la eliminación del peróxido de hidrógeno en lugares con baja concentración de catalasa o sin ella, encontrándose por tanto en el citosol, en la matriz mitocondrial así como en la membrana celular, mientras que la catalasa es más abundante en microsomas, peroxisomas y núcleo celular. En este sentido, la GPx1, ampliamente expresada y distribuida, es el mayor “secuestrador” de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de hidroperóxidos lipídicos. Por otra parte, la GPx2 está altamente expresada en el tracto gastrointestinal, mientras que la GPx6, recién descubierta, está localizada fundamentalmente en la mucosa olfatoria y en tejidos embrionarios. La GPx3 está localizada a nivel extracelular, y la GPx4, presente a nivel citosólico, nuclear y mitocondrial es la mayor responsable de prevenir la oxidación de los fosfolípidos de la membrana celular.

Esto hace ser a las GPx un importante mecanismo de protección celular contra el daño oxidativo producido a lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos (Ji et al., 1995).

La GPx necesita GSH para poder realizar su función, oxidándolo a glutathion oxidado (GSSG). Por ello, las células disponen de una vía capaz de regenerar este GSH, catalizada por la enzima glutathion reductasa (GR), la cual consume NADPH para regenerar el glutathion en su forma reducida (Figura 7). La GPx3, además puede emplear otros sustratos (tioredoxina o glutarredoxina) como dadores de electrones.

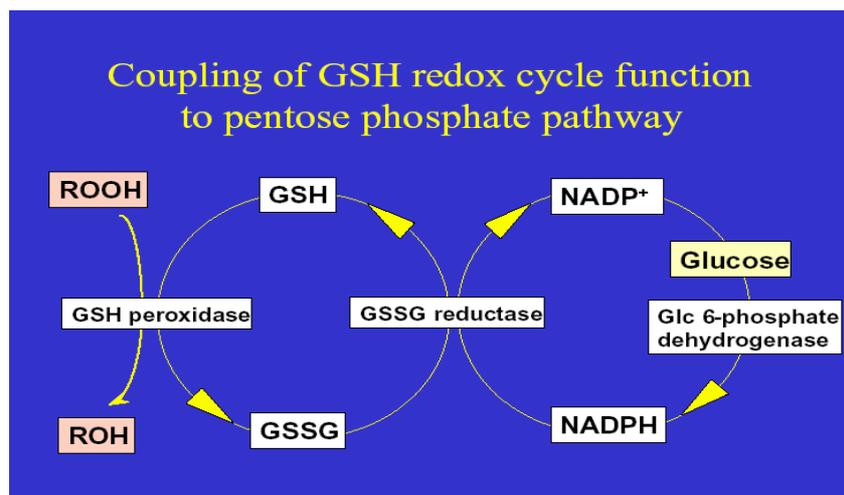


Figura 7. Ciclo de oxidación-reducción del glutathion.

La glutatión reductasa tiene una distribución celular similar a la de la GPx. Por tanto, aunque la GR no se considera una enzima antioxidante, hay que reconocer que su función es esencial para el buen funcionamiento de la GPx.

Eficacia de la triada enzimática: SOD, Catalasa y GPx

La eficacia de esta triada enzimática reside en una triple acción defensiva que disminuye la producción de estas especies oxigénicas, impide la interacción de éstas entre sí, evitando dar lugar a especies de mayor reactividad, e impide la peroxidación de las macromoléculas (Figura 8).

La SOD es la responsable de la reacción de dismutación del  $O_2^{\cdot -}$  a  $H_2O_2$ , que en una reacción posterior catalizada por la catalasa o la glutatión peroxidasa (GPx) detoxificará formando  $H_2O$  y  $O_2$ . La catalasa se encuentra principalmente en los peroxisomas, y su principal función es eliminar el  $H_2O_2$  generado en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, mientras que la glutatión peroxidasa degradará el  $H_2O_2$  citoplasmático (Trachootham et al., 2008).

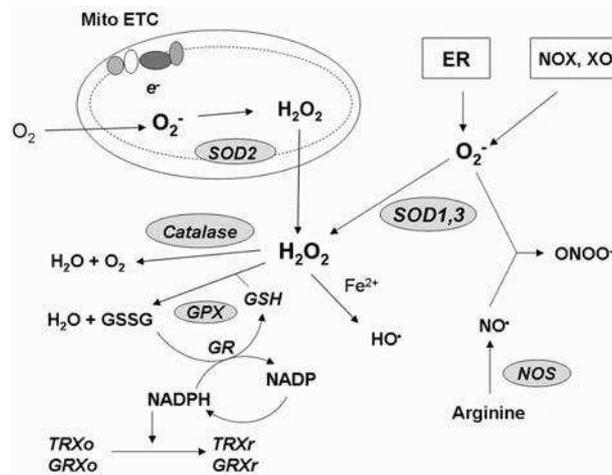


Figura 8. Mecanismo de acción de la triada enzimática.

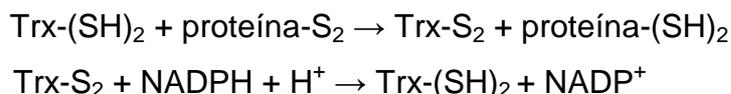
Sistema Tiorredoxina

El sistema antioxidante tiorredoxina es uno de los mayores sistemas de control redox que existe tanto a nivel de citoplasma celular como a nivel mitocondrial, siendo su estructura y funcionalidad en ambas localizaciones muy similar.

Este sistema está compuesto por tres proteínas: la tiorredoxina, la tiorredoxina reductasa y la tiorredoxina peroxidasa (Holmgren and Bjornstedt, 1995).

La tiorredoxina (Trx) es una oxidorreductasa que cataliza la reducción de puentes disulfuro, con lo que juega un papel importante en la regulación del estado redox de los tioles de las proteínas (Nakamura et al., 1997; Sen, 1998).

La tiorredoxina citoplasmática (Trx-1) posee una secuencia de aminoácidos en el sitio catalítico que incluye dos residuos de cisteína en las posiciones 32 y 35. Éstos pueden ser oxidados reversiblemente formando un puente disulfuro, el cual puede ser a su vez reducido por la tiorredoxina reductasa citoplasmática (TrxR-1) en presencia de NADPH (Zhong et al., 2000; Zhong and Holmgren, 2000). De esta forma, la tiorredoxina interviene en la reparación de proteínas con grupos sulfhidrilo (Holmgren, 1989; Starke et al., 1997), tal y como se describe en el esquema de reacción:



En concreto, el sistema de la tiorredoxina está implicado en la prevención de la oxidación y/o reparación de algunas enzimas metabólicas como la glucosa-6 fosfato deshidrogenasa, la fosfofructo quinasa, la fosfoglicerato quinasa y la piruvato quinasa (Starke et al., 1997), así como enzimas que forman parte de la familia de las peroxirredoxinas y que son oxidadas por los radicales peróxido (Rhee et al., 2005).

La tiorredoxina reductasa es capaz además de regenerar el ascorbato, el cual es un antioxidante no enzimático de gran importancia.

Por su parte, la tiorredoxina peroxidasa es una enzima citosólica capaz de transformar el peróxido de hidrógeno y los alquilhidroperóxidos en agua y alcohol (Netto and Stadtman, 1996), así como de limpiar los radicales tiilo de las células.

La tiorredoxina citoplasmática (Trx-1) además posee tres residuos adicionales de cisteína en posiciones 62, 69 y 73. Estas cisteínas han sido relacionadas con funciones estructurales, pero además ciertas modificaciones post-transduccionales

contribuyen a atribuirles funciones relativas a procesos de regulación celular (Haendeler, 2006).

De esta forma, la tiorredoxina, a través de mecanismos de regulación redox posee control sobre factores de transcripción que intervienen en la proliferación y muerte celular (Arner and Holmgren, 2000; Powis and Montfort, 2001; Tonissen and Di Trapani, 2009). Así, la tiorredoxina es capaz de alcanzar el núcleo celular y regular la actividad de varios factores de transcripción, incluyendo el NF-κB, mediante reducción de un residuo de cisteína requerido para su unión al DNA. Este factor controla la expresión de numerosos genes de estrés entre los que se encuentran alguno con funciones antiapoptóticas (Shishodia and Aggarwal, 2002).

Otro factor de transcripción regulado por tiorredoxina es p53, el cual controla la expresión de genes apoptóticos. Por tanto, cuando p53 es requerido para inducir apoptosis en respuesta a un estímulo específico, se requiere la intervención de la tiorredoxina. Este papel proapoptótico es directamente opuesto a otras funciones ya descritas, y por lo tanto, para que en las células cancerígenas tome ventaja la función antiapoptóticas de la tiorredoxina, el gen p53 suele estar inactivado (Arner and Holmgren, 2006; Roos and Kaina, 2006).

Asimismo, la tiorredoxina es excretada al exterior celular (Soderberg et al., 2000) donde interactúa con otros factores que estimulan el crecimiento celular e intervienen en funciones de regulación de la inmunidad (Angelini et al., 2002) (Figura 9).

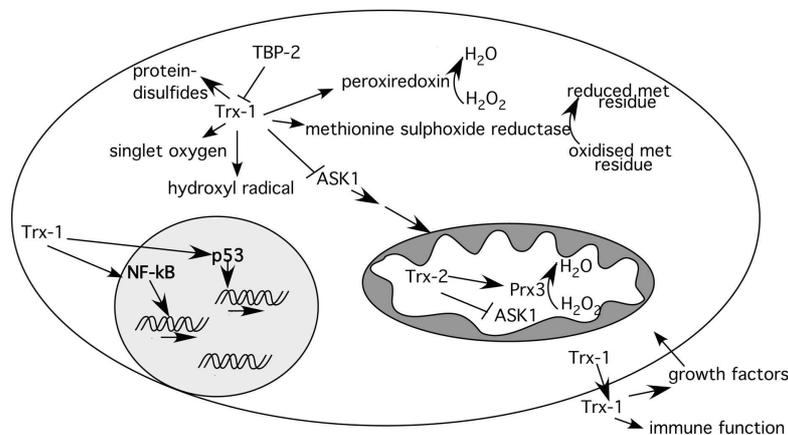


Figura 9. Mecanismo de acción del sistema tiorredoxina.

Por tanto, el sistema tioredoxina, en un delicado equilibrio, puede dirigir a las células hacia la apoptosis o bien protegerlas de la muerte celular. Esto es particularmente relevante en el cáncer, donde el uso de las funciones antiapoptóticas de este sistema puede proporcionar a las células cancerígenas una importante ventaja protectora y funcional. Asimismo, en base a esto se han diseñado y se plantean posibles estrategias terapéuticas cuyo objetivo es la alteración de los niveles y funcionamiento de este sistema y en consecuencia promover la apoptosis celular (Powis and Kirkpatrick, 2007; Sun and Rigas, 2008).

### **1.1.1.2. Antioxidantes no enzimáticos**

#### **1.1.1.2.1. Endógenos**

Se agrupan en diversos tipos de moléculas, cuya acción defensiva dependerá, en algunos casos, de una interacción directa sobre la especie reactiva para rendir complejos estables o de menor reactividad, siendo por tanto, componentes que reaccionan directamente con agentes oxidantes y los inutilizan. A tales antioxidantes se les conoce como “scavengers”, y su papel es suicida. En otras ocasiones, los antioxidantes actúan como moléculas coenzimáticas en la acción catalítica de algunas enzimas.

#### **Glutation**

El glutatión reducido (GSH) es la fuente más abundante de tioles no proteicos en las células (más del 90%) (Masella et al., 2005; Meister and Anderson, 1983), siendo el antioxidante celular no enzimático más importante. El GSH es el tripéptido gamma-glutamil-cisteinilglicina.

Esta molécula tiene dos características estructurales fundamentales, las cuales le proporcionan muchas de las propiedades biológicas. Por una parte, la presencia del enlace peptídico en posición gamma lo hace resistente a las peptidasas presentes en la célula, las cuales sólo actúan sobre los enlaces amino-acilo. Este enlace gamma-glutamilo entre el glutamato y la cisteína sólo es hidrolizable por el enzima gamma-glutamil transpeptidasa (GGT), presente en la membrana plasmática. Por otra parte, la segunda característica estructural importante es la

presencia del grupo tilo de la cisteína, el cual se puede oxidar con otra molécula de GSH dando lugar al glutathion disulfuro u oxidado (GSSG), o con otros grupos tiólicos como los residuos de cisteína de las proteínas (Pastore et al., 2003).

El contenido de GSH en los distintos tejidos varía dependiendo de la función del tejido. Dado que es un tripéptido, tras su ingesta es degradado en el intestino delgado, por lo que su contenido en la dieta no influye en sus niveles celulares.

La síntesis y degradación del GSH forma el ciclo del gamma-glutamilo. El GSH es sintetizado en el hígado por la acción de dos enzimas, gamma-glutamil cisteína sintetasa y la glutathion sintetasa (Meister, 1983) y una vez formado es transportado a los tejidos a través de la sangre.

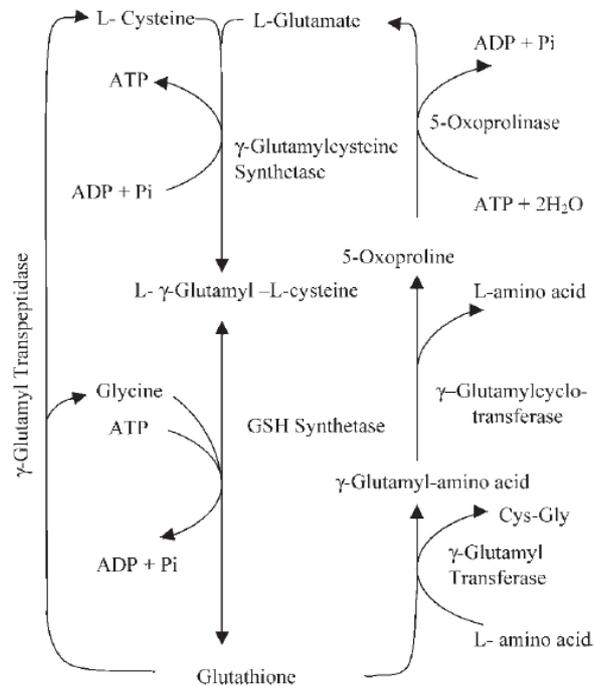
Para llevar a cabo la reacción, la gamma-glutamil cisteína sintetasa requiere la presencia de iones  $Mg^{2+}$ , siendo la etapa limitante en la síntesis de GSH y es inhibida por el glutathion mediante un mecanismo de retroalimentación negativo. La cisteína es el sustrato limitante de la reacción de síntesis del GSH, de forma que aumentando la disponibilidad de cisteína mediante la administración de N-acetilcisteína se aumenta la concentración intracelular de GSH (Anderson, 1997).

A continuación, la glutathion sintetasa cataliza la unión de glicina a la gamma-glutamil cisteína para lo que requiere iones  $K^+$  y ATP.

La degradación del GSH tiene lugar fuera de la célula y es llevada a cabo por la gamma-glutamil transpeptidasa y por las dipeptidasas, las cuales están unidas a la superficie externa de la membrana celular. Los sustratos para la degradación pueden ser tanto el GSH, como el GSSG, como S-conjugados del GSH. La transpeptidación requiere de la presencia de aminoácidos, obteniendo como resultado gamma-glutamil aminoácidos, los cuales son transportados al interior celular, donde son los sustratos de la enzima intracelular gamma-glutamil ciclotransferasa, que da lugar a la 5-oxoprolina y el correspondiente aminoácido libre. La 5-oxoprolina es transformada a glutamato por la 5-oxoprolinasa.

A su vez, la síntesis de GSH puede realizarse saltando la reacción de gamma-glutamil cisteína sintetasa mediante la internalización a la célula de la gamma-

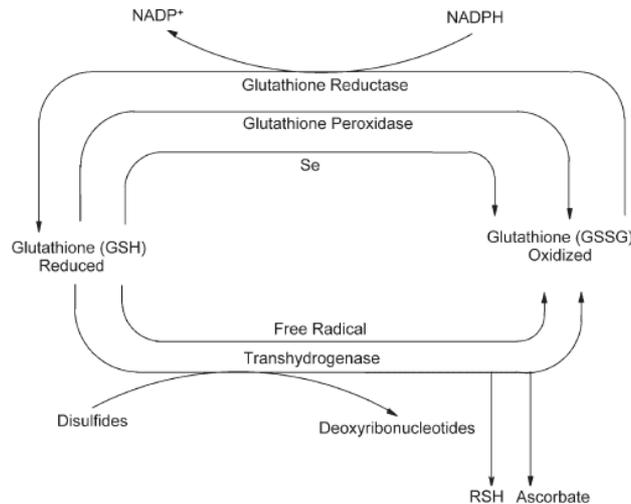
glutamil cistina extracelular, para ser reducida y formar cisteína y gamma-glutamil cisteína. Éstas son sustrato para la gamma-glutamil cisteína sintetasa y para la glutathion sintetasa respectivamente (Anderson, 1997) (Figura 10).



**Figura 10.** Ciclo de síntesis y degradación del glutathion.

Algunos autores han postulado que el ciclo del gamma-glutamilo es un sistema de transporte de aminoácidos a través de la membrana (Cornell and Meister, 1976). Sin embargo, el GSH es una sustancia que tiene otras funciones importantes, como su papel como antioxidante, interactuando fácilmente con una amplia gama de radicales libres cediendo un protón.

Una de las funciones antioxidantes más importantes del GSH es la eliminación del peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos en la reacción catalizada por la glutathion peroxidasa (GPx) (Takebe et al., 2002), en la que dos moléculas de GSH donan dos átomos de hidrógeno para dar lugar a glutathion oxidado (GSSG), el cual posteriormente es reducido por la glutathion reductasa (GR) para restaurar el GSH (Figura 11). De esta forma, la concentración de GSSG en la célula se mantiene a niveles muy bajos (Schafer and Buettner, 2001).



**Figura 11.** Mecanismo de acción del glutatión.

El GSH también está implicado en la reducción de varios antioxidantes celulares, como por ejemplo el radical vitamina E y el radical semidehidroascorbato (radical de la vitamina C).

Además, el GSH está implicado en la síntesis del DNA. En este proceso los ribonucleótidos son transformados a desoxirribonucleótidos por la enzima ribonucleótido reductasa. Los agentes reductores en esta reacción son la tiorredoxina o la glutarredoxina (Holmgren, 1979), que es dependiente a su vez del GSH.

La síntesis y degradación de las proteínas también se ven afectadas por el GSH, de forma que las fases de iniciación y elongación del proceso de traducción que tienen lugar en la síntesis proteica se inhiben cuando el GSH se oxida (Ochoa, 1983). Los responsables de la inhibición de la síntesis proteica pueden ser tanto la depleción del GSH, como el incremento del GSSG, como ambos a la vez.

Por otra parte, el GSH contribuye al mantenimiento del estado redox celular, al cual son sensibles las proteínas. Éstas cambian su función y conformación ante variaciones en el estado redox, siendo más susceptibles de degradación cuando éste es más oxidante (Droge, 2002a). Por tanto, y debido al cambio de conformación que pueden sufrir algunas proteínas enzimáticas alterando su función, el GSH, en la medida en que conserva los tioles proteicos, permite mantener la conformación y regular la actividad de enzimas metabólicas importantes, evitando la formación de disulfuros mixtos y puentes disulfuros.

El GSH está también implicado en otras funciones como la detoxificación de xenobióticos, especialmente de sustancias electrófilas como epóxidos, alquenos y metales pesados, como el caso de la metabolización del paracetamol (Vina et al., 1980). Además, actúa como cofactor para algunas enzimas y es reservorio de cisteína, ya que incluso a concentraciones no excesivamente altas, es tóxica para la célula.

En varias etapas de la respuesta inmune es requerido el GSH, actuando a nivel intracelular de las células T, consiguiendo aumentar la citotoxicidad de éstas mediante mecanismos de activación, proliferación y diferenciación celular (Multhoff et al., 1995). Diferentes estudios han mostrado como no sólo un aumento de la concentración del GSH intracelular puede activar la citotoxicidad de estos linfocitos, si no que una disminución de este tripéptido puede inhibir la activación celular, suprimiendo sus funciones citotóxicas y aumentando su susceptibilidad (Hollins et al., 2006).

El GSH juega un papel fundamental en el estado redox celular, del que también dependen numerosos procesos de señalización celular. De esta forma, el GSH está implicado en la regulación de la activación de varios factores de transcripción como el factor nuclear NF- $\kappa$ B, con funciones antiapoptóticas (Lou and Kaplowitz, 2007), y el factor AP-1, responsable de la activación de numerosos genes implicados en proliferación y diferenciación celular y por tanto relacionados con carcinogénesis y cáncer.

#### 1.1.1.2.2. Antioxidantes presentes en el plasma

Los antioxidantes fundamentales presentes en el plasma son: bilirrubina, urato, ascorbato, ceruloplasmina y ferritina.

##### Bilirrubina

La bilirrubina es un tetrapirrol lineal (unido a la albúmina) y producto final de la degradación del grupo hemo. Es un antioxidante liposoluble y por tanto capaz de inhibir la lipoperoxidación. Se le considera de gran importancia fisiológica como antioxidante, sobre todo en el recién nacido en los que se ha visto que la

hiperbilirrubinemia neonatal reduce el daño oxidativo producido por la hiperoxia. Como antioxidante, la bilirrubina rivaliza en las membranas con la vitamina E. Se oxida a biliverdina al captar radicales hidropéroxido y éste finalmente se reduce para dar la bilirrubina.

### Ácido Úrico

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas en el ser humano y otros primates, ya que carecen de la enzima uricasa, la cual hace que continúe la degradación hasta alantoina y urea. Como consecuencia de lo anterior, el ser humano presenta una concentración plasmática de ácido úrico más de diez veces superior a la encontrada en la mayoría de los mamíferos. El anión monovalente urato es la forma en que se encuentra más del 99% del ácido úrico a pH fisiológico.

La dieta puede ser una importante fuente de ácido úrico, ya que la ingestión de purinas hace que éstas sean transformadas en ácido úrico por la xantina oxidoreductasa presente en la mucosa intestinal, de forma que las purinas ingeridas no aparecen en sangre, sino su derivado el ácido úrico.

Es por todo lo anterior por lo que el ácido úrico no parece que sea simplemente un producto de desecho de una vía metabólica, si no todo lo contrario, ya que puede funcionar como un antioxidante suicida clásico y como quelante de metales de transición. Por su unión al hierro y/o cobre, el ácido úrico puede inhibir las reacciones de oxidación catalizadas por metales sin que llegue a ser oxidado. El urato es un eficaz eliminador de derivados del oxígeno muy reactivos y perjudiciales como el radical hidroxilo y el superóxido e intermediarios oxigenados del hemo. El urato es tan eficaz como el ascorbato como antioxidante. Es de interés que más del 30% de la capacidad antioxidante del plasma del hombre se debe al ácido úrico.

Así, se ha correlacionado positivamente la concentración de ácido úrico en plasma de distintas especies con su esperanza de vida (Cutler, 1984) y a una disminución en la incidencia de cáncer.

Queda claro por tanto que, algunos productos finales de las vías metabólicas degradativas, como el urato y la bilirrubina, han evolucionado para ejercer una acción beneficiosa en el organismo.

### Proteínas secuestradoras de metales: Ferritina, ceruloplasmina y albúmina

Recordar que metales de transición como el hierro y el cobre implican autooxidaciones y reacciones que conllevan la producción del radical hidroxilo desde el superóxido, por eso es importante el papel de proteínas quelantes de metales como antioxidantes preventivas, contribuyendo significativamente en la capacidad antioxidante de los fluidos corporales.

La ceruloplasmina es una proteína que une el cobre en el plasma jugando un papel importante como barrera en la generación de ROS en el flujo sanguíneo y actuando por tanto como antioxidante. Su actividad bloquea el daño de oxidación a lípidos, a proteínas y DNA, eliminando intermediarios reactivos como el peróxido de hidrógeno.

La ferritina es la proteína de almacenamiento del hierro en los mamíferos, actuando como antioxidante al prevenir la reacción de Fenton. Juega un papel muy importante como antioxidante citoprotector del endotelio y protege del daño oxidativo mediado por fagocitos.

La albúmina desempeñaría un papel en este contexto por su alta capacidad para transportar cobre.

#### 1.1.1.2.3. Exógenos: Antioxidantes presentes en la dieta

##### Ascorbato (ácido ascórbico o vitamina C)

La vitamina C o ácido ascórbico se considera uno de los antioxidantes naturales más efectivos y menos tóxicos, y es el antioxidante extracelular más importante (Carr and Frei, 1999; Kojo, 2004).

Es una vitamina hidrosoluble, y al contrario que la vitamina E, funciona mejor en medios acuosos. A pH fisiológico la forma predominante es el anión ascorbato,

estando presente en todos los tejidos, pero es especialmente abundante en el tejido adrenal.

La vitamina C como antioxidante tiene una doble importancia. En primer lugar como agente antioxidante capaz de neutralizar los radicales superóxido (Hemila and Wikstrom, 1985; Nishikimi, 1975), hidroxilo, oxígeno singlete (Bodannes and Chan, 1979) y lipohidroperóxido. Sin embargo, no es buen antioxidante frente al peróxido de hidrógeno, potenciando de hecho su generación mediante la inhibición de la catalasa. En segundo lugar, como agente fundamental en la regeneración de la vitamina E (Machlin and Bendich, 1987; Packer et al., 1979) y el urato. Al reciclar la vitamina E, se consume el ascorbato pasando a radical ascorbato, el cual puede ser a su vez reciclado por la NADH semiascorbil reductasa o por tioles celulares como el glutatión o el ácido dihidrolipoico (Sevanian et al., 1985).

Este doble papel es posible gracias a la facilidad con la que cede dos electrones dando lugar al dehidroascórbico. De esta forma, se combina con un radical libre, dando como resultado que la vitamina pierda o de dos hidrógenos y un par de electrones y se convierta en ácido dehidroascórbico. En consecuencia, el radical libre se reduce. La conversión del ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico, es un proceso reversible y se ha postulado la existencia de una reductasa específica para explicar la reacción opuesta. En este sentido, el ácido dehidroascórbico es inestable y su presencia como tal se detecta solamente durante breves periodos de tiempo. Constituye en sí mismo una molécula potencialmente tóxica que metabólicamente puede revertir a ácido ascórbico o modificarse irreversiblemente en un subproducto que se excreta por orina.

El incremento de los niveles celulares de vitamina C aumenta la protección contra los radicales libres, sin embargo, en concentraciones altas, la vitamina C tiene un efecto prooxidante en presencia de metales de transición como el  $\text{Fe}^{3+}$  o el  $\text{Cu}^{2+}$ . La acción prooxidante de la vitamina C reside en su capacidad para reducir el hierro férrico o ferroso, el cual es un potente inductor de radicales, por lo que la utilización de megadosis de vitamina C ha sido cuestionada por algunos autores.

## Vitamina E

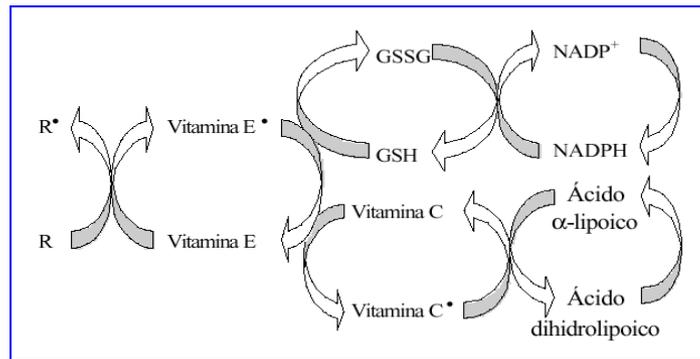
La vitamina E es el antioxidante más abundante en la naturaleza. El término vitamina E aglutina al menos ocho isómeros estructurales de tocoferoles y tocotrienoles. Entre ellos, el  $\alpha$ -tocoferol es el más estudiado y el que tiene mayor actividad antioxidante.

Debido a su alta liposolubilidad, la vitamina E se asocia a membranas ricas en lípidos, como la membrana mitocondrial, la del retículo plasmático o la membrana plasmática, protegiéndolas frente a la oxidación (Bisby and Parker, 1991). Aunque habitualmente la cantidad de vitamina E en las membranas es baja, la suplementación dietética puede aumentar su contenido.

Es considerado el principal antioxidante secuestrador de radicales lipofílicos *in vivo* (Burton and Ingold, 1989; Pryor, 2000). La acción antioxidante de la vitamina E reside en su capacidad para neutralizar los radicales superóxido, hidroxilo y lipoperoxilo a formas menos reactivas, además de ser capaz de romper la reacción en cadena de lipoperoxidación que ocurre en el daño oxidativo a las membranas (Burton et al., 1990).

Su acción antioxidante viene dada por el grupo fenólico en posición 6, de forma que el hidrógeno del grupo oxidrilo reacciona con los radicales. El grupo -OH del anillo aromático de la vitamina puede experimentar reacciones de oxidación perdiendo bien un electrón o un ión hidruro, en este caso la vitamina se convierte en un radical libre relativamente estable que posteriormente puede sufrir una reacción de oxidación que convierte el anillo central en un núcleo quinónico. Así, la vitamina E se oxida y se inutiliza, haciéndose incapaz de llevar a cabo posteriores efectos antioxidantes y junto con otros metabolitos se elimina por la orina.

Sin embargo, por su parte el radical vitamina E es reciclado a vitamina E a costa de diversos antioxidantes, como el glutatión o el ascorbato y esto es muy importante, ya que regenera o ahorra vitamina E y también reduce el carácter prooxidante del radical de vitamina E (Figura 12) (Abudu et al., 2004; Brigelius-Flohe and Traber, 1999).



**Figura 12.** Mecanismo de acción de la vitamina E.

Otras posibilidades de eliminación del radical tocoferoxílico son las reacciones con otro radical tocoferoxílico para dar lugar a un dímero. De esta forma protege a las células de la peroxidación de membranas y su posterior degeneración, impide el daño oxidativo de las lipoproteínas LDL, proteínas celulares y DNA (Topinka et al., 1989).

Una dieta deficiente de vitamina E está relacionado con una reducción de la actividad de catalasa hepática, GSH peroxidasa, y glutatión reductasa, induce la peroxidación lipídica en hígado y causa desordenes cardiovasculares y neurológicos (Carr and Frei, 2000; Muller, 1990).

### Carotenoides

Los carotenos son un conjunto de pigmentos aislados de plantas y algunos de ellos como el alfa, beta y gamma carotenos son precursores de la vitamina A. Son antioxidantes liposolubles situados principalmente en las membranas. Las propiedades antioxidantes de los carotenoides residen en su estructura, formada por largas cadenas de dobles enlaces conjugados. El carotenoide es modificado químicamente en esta interacción y los productos resultantes son antioxidantes menos activos. Esta disposición permite neutralizar diversos ROS, incluido el radical superóxido y radicales peroxilo. De hecho, los carotenoides son capaces de reducir la peroxidación lipídica provocada por los radicales libres (Young and Lowe, 2001).

El más frecuente e importante es el β-caroteno, que posee actividad antioxidante (Krinsky, 1989) y se ha descrito como el más importante neutralizador del oxígeno singlete aislado de la naturaleza.

### Ácido $\alpha$ -lipoico

Se considera un antioxidante ideal o universal, que es absorbido por la dieta y es antioxidante frente a un elevado número de radicales libres en medios lipídicos y acuosos y puede ejercer su actividad mediante la capacidad de quelar metales de transición.

Tras la ingesta el ácido  $\alpha$ -lipoico se reduce a ácido dihidrolipoico (DHLA), el cual es un potente antioxidante contra los radicales más importantes, además de participar en el reciclaje de la vitamina C, proceso por el que el DHLA es convertido en ácido  $\alpha$ -lipoico (Packer, 1994).

### Polifenoles

Los compuestos polifenólicos constituyen uno de los grupos más importantes de metabolitos de origen vegetal presentes en la dieta. Dentro de los polifenoles, los flavonoides constituyen el grupo más importante, descritos más de 4.000 compuestos y divididos en 13 clases. Todos ellos tienen en común una parte de estructura difenilpropano consistente en dos anillos aromáticos unidos a través de tres átomos de carbono formando un heterociclo oxigenado.

De unos años a esta parte ha aumentado grandemente el interés por este tipo de compuestos, particularmente por los flavonoides, debido a que su capacidad antioxidante proporciona efectos beneficiosos en la salud, destacando su papel en el tratamiento y prevención del cáncer así como en desordenes cardiovasculares y neurodegenerativos (Rice-Evans, 2001; Schroeter et al., 2002).

Su actividad antioxidante resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de metales de transición y secuestradoras de radicales libres (Bravo, 1998). Esta capacidad antioxidante está relacionada con la rápida donación de un átomo de hidrógeno al radical libre, formándose un compuesto intermedio fenoxi radical.

No obstante, bajo determinadas condiciones, como por ejemplo una elevada concentración de polifenoles, la presencia de metales redox como cobre y hierro y un elevado pH, puede hacer que se comporten como agentes pro-oxidantes.

Tanto la naturaleza como la posición de los sustituyentes, así como el número de grupos hidroxilos que conforman la estructura del polifenol, condicionan si a nivel fisiológico actuará como un antioxidante o como un modulador de la actividad enzimática o si por el contrario poseerá propiedades antimutagénicas o citotóxicas (Galati and O'Brien, 2004).

Por otra parte, además cabe destacar el papel de los polifenoles inhibiendo enzimas tales como oxidasas, lipooxigenasas, ciclooxigenasas, mieloperoxidasas, NADPH oxidasas y xantina oxidasas, evitando así la generación de especies reactivas del oxígeno *in vivo*, así como de hidroperóxidos orgánicos (Rice-Evans et al., 1996; Rivero et al., 2005).

Por otra parte se ha podido conocer que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2, al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, la catalasa y la superóxido dismutasa. De esta forma los polifenoles interfieren en las reacciones de propagación de radicales libres y en la formación del radical en sí.

## **1.2. CÁNCER COLORRECTAL**

En términos absolutos, el cáncer es la primera causa de muerte en España, con 96.499 muertes en el año 2005 (60.701 en hombres y 35.798 en mujeres), lo que supuso el 30,3% de todas las defunciones de hombres y el 19,4% de las de las mujeres, lo que es lo mismo, el cáncer fue la causa del fallecimiento de uno de cada tres hombres y de una de cada cinco mujeres.

La edad media de los pacientes que fallecen por un cáncer es de 69,3 años para los hombres y 69,7 para las mujeres.

Desde el año 2000, el cáncer ha pasado a ser la primera causa de muerte en hombres para el conjunto de España y para las Comunidades Autónomas de Aragón, Asturias, Cantabria, Castilla-León, Galicia, Madrid, Navarra, País Vasco y La Rioja. En mujeres, aunque aún se sitúa en segundo lugar, después de las enfermedades cardiovasculares, el cáncer presenta una tasa truncada ajustada (para los grupos de edad de 35 a 64 años) 3 veces mayor que aquéllas, y provoca el mayor número de años potenciales perdidos (Lopez-Abente et al., 2004), siendo la más baja de Europa, y de las más bajas del mundo desarrollado (Levi et al., 2004).

El envejecimiento de la población, el incremento de la incidencia de muchos tumores malignos y la mejor supervivencia de los enfermos de cáncer debida a los avances diagnósticos y terapéuticos, han supuesto un aumento significativo de la prevalencia.

A diferencia de lo que sucede con la mortalidad, no hay registro sistemático y continuo de todos los nuevos casos de cáncer que aparecen anualmente en España. Es decir, no hay un Registro de Cáncer de Población Nacional, aunque sí existen varios registros de este tipo a nivel provincial o autonómico, que en conjunto reúnen la incidencia de cáncer en alrededor del 25% de la población española. Estos datos se recogen en una publicación (Cancer Incidence in Five Continents) editada cada 4-6 años por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), organismo dependiente de la OMS (Pisani et al., 2002). A partir de ellos, diversos autores elaboran estimaciones de la incidencia del cáncer en toda España.

Según estas estimaciones, en el año 2002 se diagnosticarían en España aproximadamente 162.000 nuevos casos de cáncer, 97.800 en hombres y 64.000 en mujeres (razón de sexo 1,5:1). La incidencia global en España se puede considerar media-alta para el sexo masculino y media-baja para el femenino.

El mayor número de pacientes con cáncer tienen entre 65 y 75 años. Entre los 30 y los 45 hay más mujeres que hombres entre los enfermos, debido sin duda a la frecuencia del cáncer de mama en estas edades.

En cuanto a la supervivencia del cáncer en España, el estudio EUROCARE-3 (European Cancer Registry Study of Survival and Care of Cancer Patients) analizó en el año 2003 la supervivencia de 1.800.000 adultos y 25.000 niños enfermos de cáncer pertenecientes a 22 países europeos (Coleman et al., 2003; Sant et al., 2003). Así, un 44% de los hombres y un 56,4% de las mujeres que sufren cáncer en España sobreviven más de 5 años. La supervivencia ha mejorado aproximadamente un 10% entre la década de los 80 y la de los 90, esperando que esta tendencia continúe para la mayoría de los tumores. Dentro del contexto europeo, la supervivencia del cáncer en España es comparable a la de los países más desarrollados, situándose en casi todas las localizaciones por encima de la media europea (Boyle and Ferlay, 2005a).

El cáncer colorrectal (CCR) es la enfermedad causada por un crecimiento incontrolado que se produce en las células del colon y/o recto, con capacidad para invadir órganos y tejidos y diseminarse a distancia, tercero en frecuencia entre los hombres en países desarrollados (tras los tumores de pulmón y próstata), y el segundo entre las mujeres (tras el cáncer de mama), con aproximadamente 1.000.000 de nuevos casos al año en todo el mundo (550.000 hombres y 470.000 mujeres), representando el 9,5% del total de los tumores, tratándose por tanto del tumor más frecuente de todos en términos absolutos.

Se estima que en España se diagnostican al año unos 25.600 casos nuevos de cáncer colorrectal (Lopez-Abente et al., 2004), lo que representa el 12,7% de los tumores del sexo masculino (12.500 casos) y el 15% de los femeninos (9.500 casos) (Figura 13). La incidencia en nuestro país se puede considerar alta en ambos sexos y su tendencia es a aumentar, con más celeridad en el sexo masculino. Sin

embargo, en un contexto exclusivamente europeo, la incidencia en España se puede considerar media-baja.

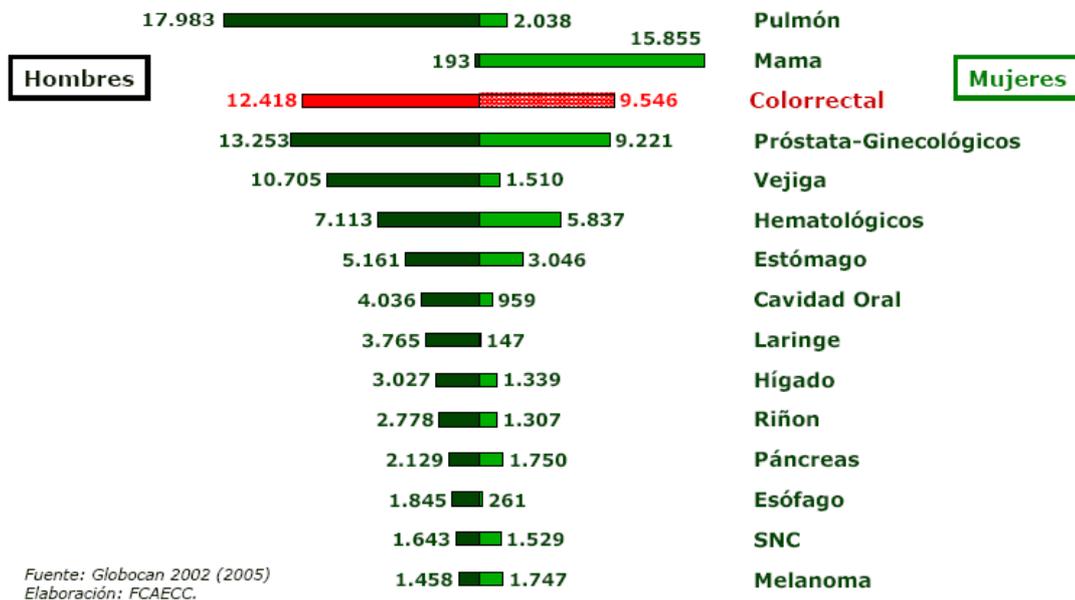


Figura 13. Estimaciones de nuevos casos de cáncer en España año 2002.

La mayoría de los casos se diagnostican entre los 65 y los 75 años, con un máximo a los 70, aunque se registran casos desde los 35-40 años, tal y como refleja la figura 14.

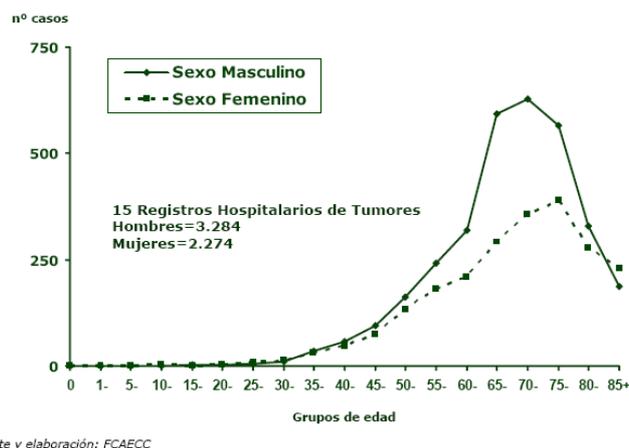


Figura 14. Distribución del cáncer colorrectal por grupos de edad.

En cuanto a datos de supervivencia, aproximadamente un 54% de los pacientes que sufren cáncer colorrectal en España sobreviven más de cinco años, sin tener en cuenta edad, tipo histológico o fase de la enfermedad.

En el caso de los hombres, la supervivencia se sitúa en torno al 53%, muy similar a la de las mujeres (55%), siendo ligeramente superior a la media europea, que se sitúa en torno al 50% a los cinco años, y próxima o superior a la de los países más desarrollados, como Suiza, Francia o Alemania.

La supervivencia ha mejorado en la última década (44% para casos diagnosticados entre 1980 y 1985, y 54% para los diagnosticados entre 1990 y 1994), y se espera que esta tendencia continúe.

El cáncer colorrectal fue la causa de aproximadamente 530.000 muertes en todo el mundo en el año 2002, siendo la segunda causa de muerte por cáncer en los países desarrollados, tanto entre los hombres (7,3% del total de fallecimientos por tumores malignos), tras el cáncer de pulmón, como entre las mujeres (8,5% del total de muertes por cáncer), tras el de mama (Boyle and Ferlay, 2005b).

En España, según datos del Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer, en el año 2005 fallecieron 12.917 personas por su causa, 7.461 hombres (el 12,3% de todas las muertes por cáncer y el 3,7% del total de muertes) y 5.456 mujeres (el 15,2% de las muertes por cáncer y el 2,9% del total de muertes), siendo por tanto la segunda causa de muerte por cáncer en España (Figuras 15 y 16).

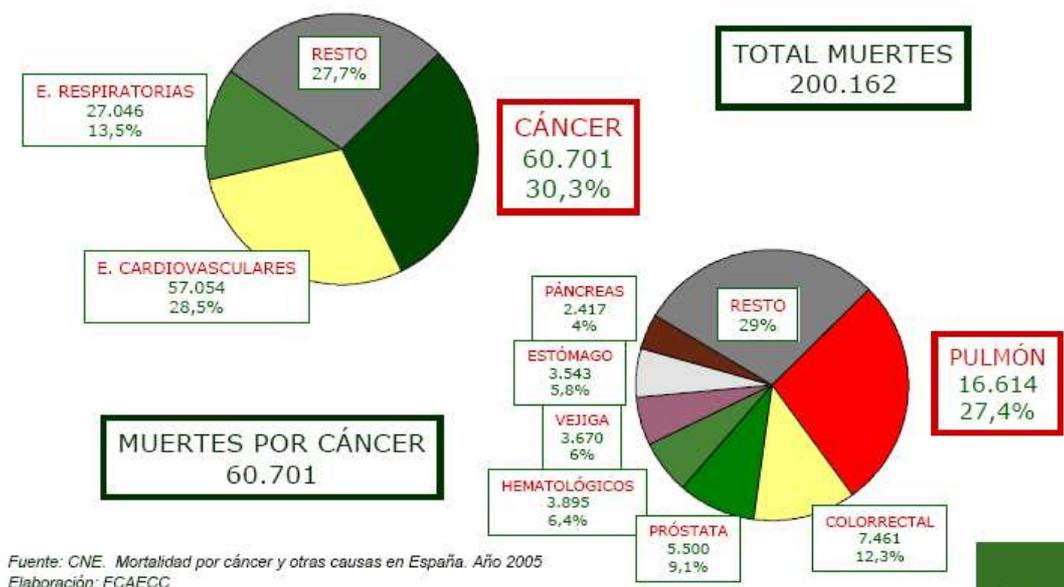
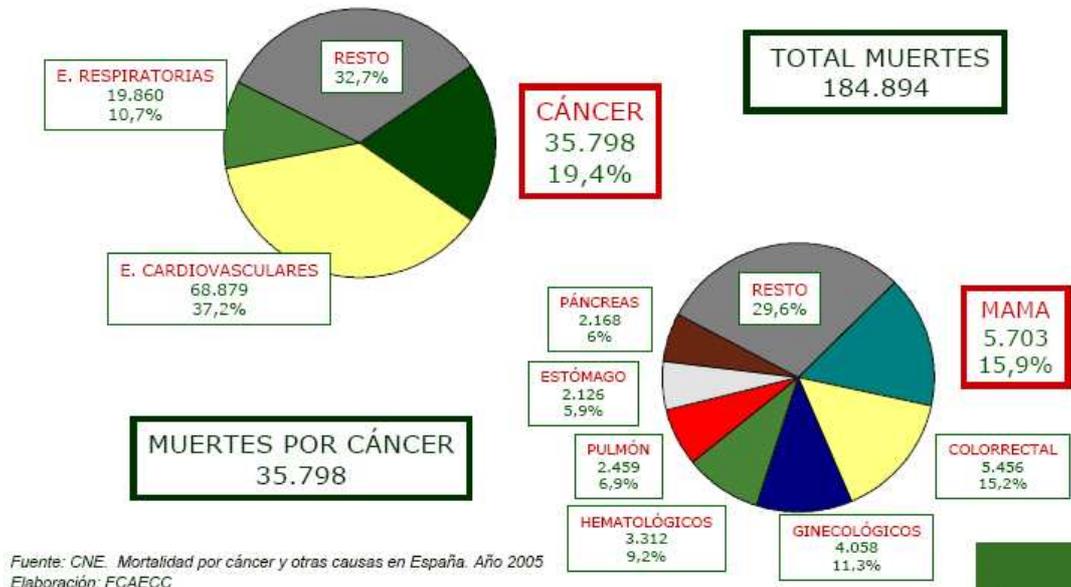


Figura 15. Mortalidad hombres por cáncer colorrectal en España año 2005.



**Figura 16.** Mortalidad mujeres por cáncer colorrectal en España año 2005.

La mortalidad en España, comparada con el resto del mundo (Fernandez et al., 2005), se puede considerar alta para ambos sexos. En los países desarrollados la mortalidad por cáncer colorrectal comienza a descender desde los años 90, probablemente debido a cambios en la dieta y en el estilo de vida, así como a diagnósticos más precoces y mejores tratamientos. No obstante en los países mediterráneos, y con ellos España, la mortalidad por este tumor sigue aumentando entre los hombres españoles mientras permanece casi estable entre las mujeres (2,6% de incremento anual entre los hombres y 0,8% entre las mujeres).

Respecto a la situación en Castilla y León, salvo datos relativos a mortalidad, apenas existen datos y registros oficiales sobre incidencia y supervivencia tanto en cáncer en general como en el caso del tumor colorrectal.

Atendiendo a los datos de mortalidad para el periodo 1996-2000, la tasa de mortalidad por cáncer de colon en Castilla y León se sitúa tanto en hombres como en mujeres en torno a la tasa media española, siendo bastante más inferior en mujeres que en hombres (Figura 17), como ya se ha comentado con anterioridad.

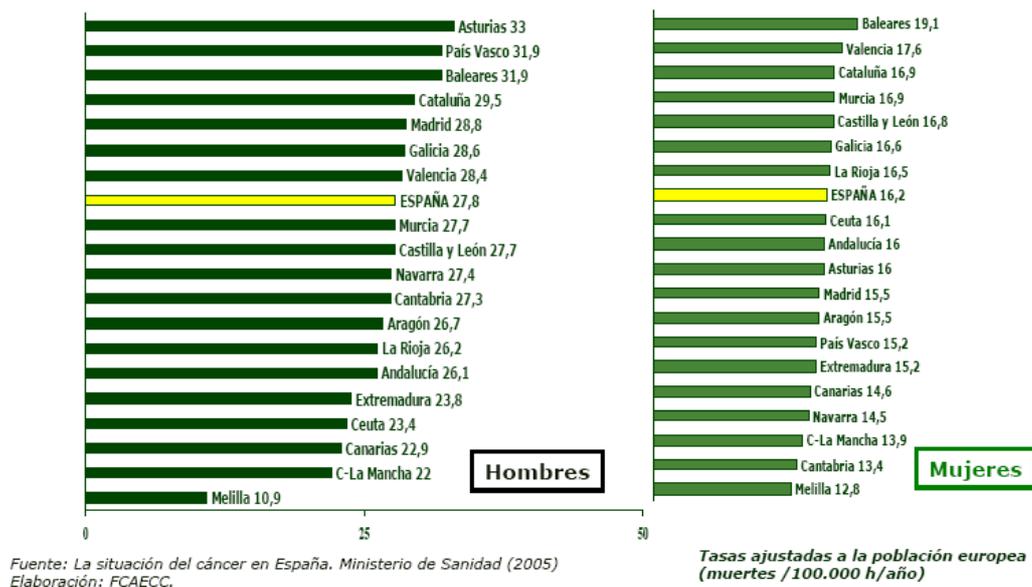


Figura 17. Tasa de mortalidad por cáncer de colon en España (años 1996-2000).

En Castilla y León, el cáncer colorrectal en el caso de los hombres, supone la segunda causa de muerte por cáncer, al igual que la media española. Sin embargo, en el caso de las mujeres, la muerte por cáncer colorrectal ocupa el primer puesto, relegando a un segundo lugar al cáncer de mama, primera causa de muerte por cáncer en España (Figura 18).

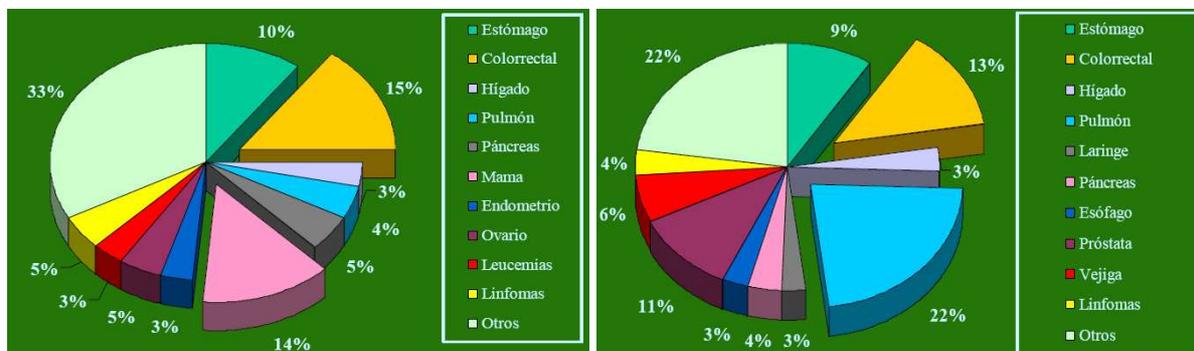


Figura 18. Mortalidad por cáncer en Castilla y León año 2004 (mujeres y hombres).

A continuación se describen diferentes aspectos relacionados con el cáncer colorrectal de relevancia para el desarrollo de la presente tesis doctoral.

Desde un punto de vista histológico, más del 90% de los tumores colorrectales se originan en las glándulas, denominándose adenocarcinomas y atendiendo al grado de diferenciación de las células, se pueden dividir en pobremente, moderadamente y altamente diferenciado, siendo el más agresivo de los tres grados el adenocarcinoma pobremente diferenciado.

Desde el punto de vista del estadio se pueden agrupar en cuatro clases o grupos, donde generalmente el I son tumores pequeños sin afectación ganglionar ni diseminación, el II cuando el tumor invade el tejido próximo, el III cuando hay mayor invasión local y afectación de ganglios linfáticos, y el IV son casos en los que ya se ha producido metástasis.

### **1.2.1. Factores de riesgo en cáncer colorrectal. Causalidad**

Las diferencias observadas en la incidencia del cáncer colorrectal entre las áreas geográficas, la evidencia del distinto riesgo generacional y la modificación de la incidencia en los emigrantes, plantea una causalidad basada primordialmente en factores medio ambientales, sociales y/o culturales.

Por otra parte, la multiplicidad de factores asociados al CCR y de las hipótesis que las sustentan, hace imposible precisar en cada enfermo una causa suficiente.

Los factores asociados al CCR se pueden resumir en cuatro grupos: factores biológicos (hereditarios, patología intestinal y otros); factores medioambientales o sociales (de riesgo o de protección) (Levi, 1999); intervenciones médicas y factores etiopatogénicos (Vines et al., 2003).

#### Factores biológicos

La herencia tiene escaso impacto en la incidencia poblacional (alrededor de un 5-10% de los casos de CCR) si bien existen casos con componentes hereditarios como la poliposis adenomatosa familiar (0,01%) y el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (5-10%). No obstante, por su presentación antes de los 50 años y la indefectible conversión en CCR en el 70 y el 100% de los portadores genéticos respectivamente, ocasiona una importante pérdida de años potenciales de vida. Además, el 50% de los descendientes de estos enfermos son portadores de las anomalías genéticas.

Por otra parte, el CCR hereditario, que afecta solamente a parientes en primer grado, sólo hijo o hermano, acumula el 20% de los casos de CCR, lo que puede justificar el seguimiento sistemático preventivo en estas personas (Rustgi, 1994). Los

demás parientes tienen la misma probabilidad individual de padecer pólipos adenomatosos, adenomas y cáncer que la población en general.

Por otro lado, los enfermos que han sido resecados padecen un segundo cáncer colorrectal primario entre el 1,5 y 3% en los 5 primeros años del post-operatorio.

El resto de los factores biológicos (diabetes, colecistectomía, otros cánceres previos, etc.) tienen escasa repercusión epidemiológica, sin perjuicio del interés del seguimiento clínico individual. Todo ello hace que el 40% de los cánceres colorrectales que se registran lo sean en personas de alto riesgo, vinculado al conjunto de factores biológicos, sin perjuicio de que en éstos concurren otros factores no biológicos, en cuyos pacientes la carga genética representa un factor componente sin carácter de causa ni suficiente ni necesaria.

### Factores medioambientales

La intervención de la dieta constituye la hipótesis más sólida de la causalidad (Greenwald et al., 2001). El consumo elevado de grasa total, colesterol, proteínas, calorías, alcohol, tabaco y carne (fundamentalmente roja), y la dieta baja en calcio, en fibra, en micronutrientes antioxidantes y en ácido fólico se asocian al incremento de la incidencia del cáncer colorrectal. No obstante, una de las evidencias más contrastadas sobre la dieta es el consumo alto en grasas/colesterol y la mayor proporción de secreción de ácidos biliares en intestino pudiendo dar origen a la formación de sustancias carcinogénicas.

La administración de fibra no ha tenido efecto protector en el adenoma recurrente, lo que sugiere que la fibra vegetal es un marcador de otros factores protectores que la acompañan contenidos en vegetales, frutas, legumbres y frutos secos.

De esta forma, el consumo de estos alimentos, particularmente frutas y verduras, son fuente de numerosos micronutrientes y cuyo consumo está relacionado con un menor riesgo. Varios de estos micronutrientes, como el  $\beta$ -caroteno (precursor de la vitamina A) (van Poppel and Goldbohm, 1995), la vitamina

E (Chan et al., 1999), la vitamina C (Ekstrom et al., 2000), el selenio (Finley et al., 2000), el calcio, la vitamina D (Giovannucci, 2006; Ishihara et al., 2008) y el folato (Potter, 1999) han sido objeto de numerosos estudios epidemiológicos que han determinado a estos compuestos como protectores para altos consumidores de estos alimentos frente a un bajo consumo. Asimismo, tanto los alimentos derivados de verduras y frutas como integrales contienen multitud de compuestos polifenólicos con probada actividad antioxidantes y por tanto, con capacidad para reducir el riesgo de cáncer (Fleischauer et al., 2000; Fournier et al., 1998; Giovannucci, 1999; Kuroda and Hara, 1999).

En cuanto a los estilos de vida, el consumo de alcohol y el hábito tabáquico se asocian al incremento del CCR en varios estudios epidemiológicos (Baron et al., 1998; Knekt et al., 1998) en tanto que la actividad física se manifiesta como protectora. Sin embargo, esta asociación se encuentra sometida a factores de confusión como es el sedentarismo y la dieta, el consumo de grasas y carne roja (Tavani et al., 2000), la masa corporal (Berglund, 2002) y otros factores de estilos de vida asociados a la propia actividad física, como el bajo consumo de tabaco y el alcohol.

En cuanto al efecto beneficioso frente al CCR de determinados fármacos o tratamientos, existen diversos estudios que otorgan un carácter preventivo a determinados antiinflamatorios no esteroídicos, como por ejemplo la aspirina. Asimismo, se ha puesto en evidencia el efecto protector en el CCR de los inhibidores de la reductasa HMG-CoA (familia de las estatinas) que reducen los niveles de colesterol, lo que corrobora a este lípido como factor de riesgo para el CCR e inductor de adenomas.

### Etiopatogenia

Los hallazgos en los estudios epidemiológicos aportan posibles hipótesis sobre las causas que producen la patogenia de los diferentes agentes descritos. La mayoría de los factores de riesgo asociados a determinados hábitos son causantes de situaciones de estrés oxidativo, bien directamente por ser generadores de especies reactivas oxidantes o de forma indirecta, ya que llevan consigo la baja

ingesta de nutrientes y micronutrientes con capacidad antioxidante como vitaminas, polifenoles y/o metales que median en procesos de oxidorreducción.

De la revisión de los factores de riesgo o causalidad se concluye por tanto que, si bien se ha evidenciado en los estudios epidemiológicos, tanto dietéticos, como de estilos de vida y genéticos, ninguno de ellos justifica una posible intervención preventiva individual o colectiva, más allá de la recomendación de una vida saludable: dieta equilibrada, baja en grasas, por debajo del 20% de las calorías y ejercicio físico con consumo de alcohol moderado y sin hábito tabáquico, por cuanto no existe una causalidad de suficiente fuerza, coherencia, consistencia, dosis efecto, ni plausibilidad que permita una intervención eficaz.

### ***1.2.2. Marcadores tumorales. Indicadores de progresión bioquímica de la enfermedad***

Clásicamente los marcadores tumorales se definen como “sustancias sintetizadas y segregadas por la célula tumoral, con o sin acción biológica conocida, que pasan a los líquidos biológicos donde pueden ser dosificadas, proporcionando información acerca de la existencia de un proceso neofornativo”. En este concepto se incluyen otras sustancias cuyo origen no es el tumor, sino el organismo en que asienta y que representan la respuesta del huésped a la presencia de la neoplasia.

Los marcadores tumorales surgieron como una gran esperanza para el diagnóstico del cáncer, pero el tiempo demostró que estas sustancias no se encuentran presentes sólo en los pacientes afectados de tumores, sino también en sujetos sanos, y no siempre son detectables en presencia de las neoplasias, siendo variable su aparición en función de diversos factores. Esta baja sensibilidad comporta un escaso valor de los marcadores en el cribado y diagnóstico de los tumores malignos.

Por tanto, ningún marcador tumoral disponible alcanza el calificativo de "marcador ideal", entendiéndose como tal, aquél que demuestre alta sensibilidad y especificidad, fuerte relación entre sus valores y la cantidad de tumor presente y cuya determinación resulte fácil y económica.

A pesar de todo, siguen desarrollando una labor fundamental, que es su empleo como herramientas de monitorización del curso de la enfermedad neoplásica. En general, hay presente una relación entre los valores del marcador y la extensión de la enfermedad, lo que confiere a algunos de ellos utilidad en el estadiaje y validez pronóstica (Bates, 1989; Bates and Longo, 1987).

Los marcadores tumorales pueden sugerir y apoyar la existencia de un cáncer, pero ninguno de ellos puede por sí mismo, en ausencia de una prueba histológica utilizarse como diagnóstico definitivo. La capacidad de los tumores para producir marcadores tumorales es variable, por tanto no puede excluirse la presencia de un cáncer porque los valores de un marcador determinado sean normales.

En el año 1996 la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) publicó por primera vez, una guía clínica sobre las recomendaciones del uso de marcadores tumorales en el cáncer gastrointestinal (1996). En los años 2000 y 2006 se han realizado posteriores revisiones y actualizaciones, estando ésta última vigente para el manejo de los marcadores en la actualidad (Locker et al., 2006).

Los marcadores tumorales se pueden clasificar en diferentes grupos atendiendo a diferentes criterios. Cabe destacar la que atiende a si son marcadores tumorales asociados al tejido o bien si son sustancias de secreción. Así, los marcadores tumorales tisulares son aquellos que se determinan en la propia célula tumoral, por diversas técnicas, desde la inmunohistoquímica a técnicas de biología molecular y que reflejan propiedades de la neoplasia relacionada con su propia génesis, capacidad proliferativa, potencial metastático y susceptibilidad a la terapia. En el caso del cáncer colorrectal cabe destacar la relevancia que está teniendo en los últimos años la determinación del oncogen K-Ras y su influencia en el empleo de determinados fármacos en su tratamiento, como es el caso de los anticuerpos anti EGFR cetuximab y panitumumab, cuya eficacia de tratamiento queda limitada a pacientes con tumores que tienen el oncogen K-Ras sin mutar (Amado et al., 2008).

Por otra parte, los marcadores tumorales de secreción son aquellas sustancias, que aún con características moleculares y orígenes diversos, presentan una común asociación con la malignidad. La dosificación de estos marcadores en los líquidos biológicos tiene aplicaciones clínicas tanto en la detección (cribado, diagnóstico,

pronóstico) como en el manejo (seguimiento y monitorización del tratamiento) de los pacientes con cáncer.

De entre los marcadores tumorales de secreción asociados a cáncer colorrectal cabe destacar el antígeno carcinoembrionario (CEA) y el antígeno Ca 19.9.

#### Antígeno carcinoembrionario (CEA)

Es una glicoproteína oncofetal descubierta por Gold y Freedman en 1965 (Gold and Freedman, 1965), en pacientes con cáncer de colon. Sin embargo, el CEA no es un marcador específico de tumor, sino más bien un marcador plasmático asociado a tumor. Aparece sobreexpresado particularmente en adenocarcinomas de colon y recto, especialmente en tumores bien diferenciados, pero pueden observarse incrementos de la cifra de CEA en otros tumores como el cáncer de mama, pulmón, páncreas, estómago, vejiga y tiroides, entre otros. Incluso pueden observarse niveles discretamente elevados en ausencia de enfermedades malignas, por ejemplo, en fumadores, pacientes con tuberculosis pulmonar, enfermedad inflamatoria intestinal y en hepatopatías, ya que el CEA plasmático se aclara normalmente a través del hígado.

Las mediciones de CEA se efectúan por radioinmunoanálisis y los niveles pueden variar según la técnica empleada. Los valores normales habitualmente se sitúan en torno a 5 ng/mL.

A pesar de las expectativas creadas inicialmente, su baja sensibilidad no le confiere valor como técnica de screening, en línea con las recomendaciones realizadas por el European Group on Tumor Markers (EGTM) (Duffy et al., 2003). Los estudios realizados en los años 70 evidenciaron que la tasa de detección de cáncer de colon en pacientes asintomáticos era inferior al 4%, con cifras de falsos positivos inaceptables (Macdonald, 1999).

Por otra parte, a través de diversos estudios se ha podido determinar como el valor preoperatorio del marcador es una importante variable con carácter pronóstico con importante significancia, incluso después de incluir el estadio y el grado de la enfermedad en el modelo estadístico (Park et al., 1999a; Park et al., 1999b).

Aprovechando que el 85% de los pacientes con cáncer de colon y recto diseminado presentan elevaciones séricas de CEA, se ha estudiado su valor como monitor de la eficacia del tratamiento sistémico. Es frecuente observar elevaciones de CEA en pacientes con progresión de la enfermedad durante el tratamiento quimioterápico y descensos acompañando a la mejoría. Por lo que en general, niveles elevados de CEA durante el tratamiento hace necesario reevaluar la estrategia terapéutica abordada. No obstante, se debe tener mucha precaución a la hora de interpretar los niveles de CEA durante las primeras de 4 a 6 semanas de un nuevo tratamiento, especialmente en el caso de empleo de oxaliplatino (Sorbye and Dahl, 2003, 2004). Además, el aumento de CEA asociado a quimioterapia puede estar relacionado con alteraciones en las funciones hepáticas provocadas por los fármacos que componen el tratamiento. Otras causas que elevan valores de CEA incluyen gastritis, úlcera, diverticulitis, EPOC y otra serie de enfermedades de tipo inflamatorio.

El área que mayor interés ha despertado en los últimos años ha sido el uso de CEA en la monitorización de pacientes con cáncer de colon y recto tras resección potencialmente curativa de su tumor primario. La elevación del marcador en este contexto, en pacientes asintomáticos permite detectar la recidiva cinco meses antes de que aparezcan los síntomas (Graham et al., 1998; Pietra et al., 1998).

Es sabido que la resección quirúrgica de las metástasis hepáticas (o pulmonares), en pacientes bien seleccionados puede conseguir la curación en aproximadamente un 25% de ellos y que un porcentaje no despreciable pueden ser detectados a través de la monitorización del CEA (Nelson, 1995). Sin embargo, todavía no se ha demostrado claramente que este procedimiento conduzca a un aumento de la supervivencia con respecto a pacientes cuya recaída se detecta en base a la clínica, aunque el debate sobre este tema está completamente abierto.

Un nivel elevado de CEA constituye una indicación para investigar la recaída, pero nunca por sí solo para comenzar tratamiento sistémico. Por otra parte, un 30% de las recaídas ocurren con niveles normales de CEA, sobre todo en tumores indiferenciados.

### Antígeno Ca 19.9

El Ca 19.9 es el marcador tumoral gastrointestinal más ampliamente estudiado después del CEA. El análisis de Ca 19.9 detecta una mucina (glicoproteína) que contiene el pentasacárido sialato de Lewis y que se encuentra sobreexpresada en numerosos tipos de células tumorales. Los valores normales habitualmente se sitúan en torno a 37 UI/mL.

Este marcador parece aportar poca información en la monitorización de pacientes con carcinoma colorrectal (Ial'chenko et al., 1991). El Ca 19.9 también puede estar elevado en otros adenocarcinomas como el gástrico, pulmonar, pancreático o hepatobiliar, y en patología no tumoral de la vía biliar intra y extrahepática o pancreática.

#### ***1.2.3. Tratamiento quimioterápico en cáncer colorrectal***

La quimioterapia consiste en la administración de fármacos con actividad antitumoral, indicada como tratamiento complementario a la cirugía y/o para controlar la enfermedad y aliviar los síntomas que produce. Ya no es discutible el beneficio de la quimioterapia, sino que el dilema actual estriba en decidir cuál es el mejor tratamiento quimioterápico que puede recibir un paciente en base a las características que presenta, ya sea inherente a la neoplasia o al propio paciente.

Existen varios fármacos citostáticos con actividad antitumoral para las células colorrectales (Wolpin and Mayer, 2008). Los principales son las fluoropirimidinas (5-fluorouracilo y capecitabina), el oxaliplatino, el irinotecan, el cetuximab, el panitumumab y el bevacizumab. Estos fármacos se pueden administrar solos o bien combinar entre sí, formando esquemas de quimioterapia cuya eficacia y tolerancia varían según sus componentes. La combinación de citotóxicos es hoy día un concepto que parece incuestionable y necesario en el tratamiento del cáncer, si se quiere obtener una mayor capacidad antitumoral con la mínima toxicidad y evitar en la medida de lo posible la formación de resistencias.

## **5-Fluorouracilo (5-FU)**

Tras el empleo de múltiples fármacos y combinaciones, el 5-FU se situó en la década de los 70 como el fármaco más activo, y hoy día, tras haber potenciado su eficacia con la modulación bioquímica (acompañado de ácido folínico) (1992) y con la infusión continua frente a la administración en bolo (1998), sigue siendo el citostático de elección en primera línea de tratamiento.

El 5-fluorouracilo, antineoplásico antimetabolito de la uridina (base pirimidínica), incorpora un átomo de flúor en posición 5 en lugar de hidrógeno. Se han descrito, al menos, tres vías diferentes por las que el 5-FU puede ejercer sus efectos antineoplásicos. En primer lugar, mediante la inhibición de la timidilato sintetasa (Sobrero et al., 2000), enzima esencial para la síntesis de la mayoría de los nucleótidos de timidina, precursor necesario en la síntesis de DNA. En segundo lugar, mediante la inhibición de la función del RNA y síntesis proteica y por último, mediante su incorporación al DNA provocando su ruptura. Dado que tanto el DNA como el RNA son esenciales para la división y el crecimiento celular, el efecto del 5-FU provoca un crecimiento desequilibrado y la muerte celular.

Mediante la modulación bioquímica se ha aumentado la actividad antitumoral del 5-FU gracias a la adicción en el tratamiento de otro fármaco que no tiene actividad citotóxica intrínseca pero que ayuda a estabilizar el complejo formado por la enzima y el fármaco, siendo el más empleado el ácido folínico (de Gramont et al., 1997). La fluorodesoxiuridilato (FdUMP), metabolito del 5-FU se une a la timidilato sintetasa en presencia del ácido folínico formando un complejo covalente y produciendo por tanto la inhibición de dicha enzima (Berger and Hakala, 1984), imprescindible para la síntesis del DNA. En este sentido, se ha postulado que la cantidad de folato que hay presente en la mayoría de los tumores es insuficiente para permitir una óptima citotoxicidad del 5-FU.

## **Capecitabina**

Es la primera fluoropirimidina por vía oral, gracias a que posee una estructura carbamato en su molécula, lo que permite que se absorba en el intestino con rapidez como molécula intacta.

Desde hace varias décadas se han venido investigando diversos análogos del 5-FU con el fin de mejorar su índice terapéutico y la aceptación del tratamiento por parte del enfermo. En este sentido, se han desarrollado las fluoropirimidinas orales (Sharma and Saltz, 2000) que presentan mejores características farmacológicas. Por una parte, su administración oral permite conseguir exposiciones prolongadas de 5-FU, similares a las que se logran con infusiones continuas. Por otra parte, han demostrado una eficacia terapéutica superior a la del 5-FU, ya que se consiguen concentraciones intratumorales más elevadas debido a una mayor activación selectiva en el tumor y una disminución de la exposición general, con la consiguiente mejoría del perfil de seguridad.

La capecitabina se comporta como un profármaco del 5-FU. Para activarse requiere tres enzimas, la primera localizada en el hígado y las otras dos, principalmente en los tejidos tumorales (Figura 19). En la primera etapa la capecitabina se hidroliza por la carboxilesterasa en el hígado y se convierte en el producto intermedio 5'-desoxi-5-fluorocitidina (5'-DFCR). La siguiente etapa está dirigida por la citidina-desaminasa, que es muy activa en el hígado y el tejido tumoral y convierte la 5'-DFCR en el segundo producto intermedio, la 5'-desoxi-5-fluoruridina (5'-DFUR) que tampoco es citotóxica. La timidina-fosforilasa, que muestra una actividad significativamente mayor en el tejido tumoral que en el tejido normal, convierte la 5'-DFUR en 5-FU en la etapa de conversión final, que culmina con la liberación selectiva de 5-FU en el tejido tumoral, lo que reduce al mínimo la exposición general al 5-FU (Pentheroudakis and Twelves, 2002a, b).

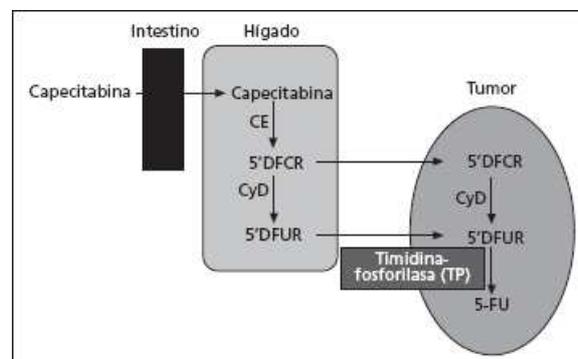
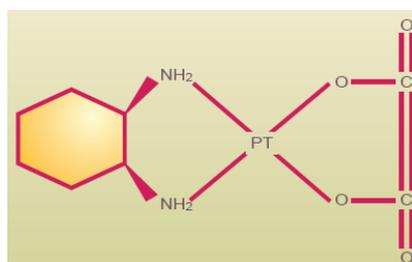


Figura 19. Conversión enzimática de capecitabina en 5-FU.

Se han realizado diversos estudios con capecitabina en combinación con otros agentes quimioterápicos, como el oxaliplatino y el irinotecan demostrando su factibilidad y actividad (Twelves et al., 2001).

### **Oxaliplatino**

El oxaliplatino es un fármaco antineoplásico perteneciente a una clase de compuestos de platino en los que el átomo de platino está formando un complejo con un 1,2-diaminociclohexano (DACH) y un grupo oxalato (Figura 20). Es un análogo del cisplatino pero con patrones de actividad y toxicidad diferentes.



**Figura 20.** Estructura química del oxaliplatino.

Los derivados hidratados resultantes de la biotransformación del oxaliplatino interaccionan con el DNA formando puentes intra e intercatenarios que entrañan una interrupción de la síntesis de DNA, causante de la actividad citotóxica y antitumoral. Así, el oxaliplatino es hidrolizado previamente para formar un derivado hidratado que ha perdido el grupo diamino ciclohexano. Posteriormente, este compuesto intermedio reacciona principalmente con los ácidos nucleicos del DNA, mostrando afección por el nitrógeno en posición 7 de la guanina, formándose un enlace guanina-guanina en la misma hebra del DNA o de la guanina-adenina entre dos hebras diferentes. De esta forma se inhibe la replicación y transcripción del DNA, produciéndose roturas y equivocaciones en la codificación (Raymond et al., 1998). Parece que la formación de puentes platino-adenina-guanina es la estructura más citotóxica desencadenando la muerte celular.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que el oxaliplatino también podría interaccionar con otras moléculas y vías celulares aumentando así su citotoxicidad (Tonissen and Di Trapani, 2009).

De esta forma, los compuestos de platino interactúan con el sistema tiorredoxina, causando una inhibición de tipo irreversible y con una elevada especificidad de la tiorredoxina reductasa (Urig and Becker, 2006). La inhibición enzimática que provocan estos compuestos se ha correlacionado con una disminución de la supervivencia y viabilidad celular (Sasada et al., 1999), debido principalmente al papel que juega el sistema tiorredoxina en los mecanismos de apoptosis celular.

En otra serie de estudios, se ha puesto de manifiesto la diferente afinidad y reactividad que muestran los distintos compuestos derivados del platino (oxaliplatino, cisplatino y carboplatino) por la tiorredoxina reductasa y como ninguno de ellos es capaz de inhibir la glutatión reductasa (Witte et al., 2005), poniendo este hecho de manifiesto la importancia del grupo selenol de la tiorredoxina reductasa para que se produzca la inhibición por parte del oxaliplatino y del cisplatino. Asimismo, también se ha demostrado como ninguno de estos compuestos es capaz de inhibir la glutarredoxina, enzima encargada de regular el estado redox de los grupos sulfidrilo de las proteínas (Arner et al., 2001).

Por otra parte, cabe destacar la elevada afinidad que tienen los derivados del platino, a través de los átomos de azufre, por los residuos de metionina y cisteína presentes en enzimas, receptores y otro tipo de proteínas, provocando modificaciones tanto en su conformación como en su actividad y funciones, cuya alteración contribuye a la inducción de apoptosis y muerte celular. Esta afinidad por los grupos sulfidrilo es especialmente elevada en el caso del GSH (Jerremalm et al., 2006), cuyo complejo, sí es capaz de inhibir la glutarredoxina, provocando una alteración del estado redox, tanto por la propia disminución de GSH que se produce como por la inhibición del sistema glutarredoxina.

En resumen, el oxaliplatino a través de los diferentes mecanismos descritos, es capaz de alterar el sistema redox celular, y por tanto desencadenar procesos de estrés oxidativo provocando apoptosis, necrosis y muerte celular. En este sentido, no sólo hay que tener en cuenta los niveles elevados de estrés oxidativo que provoca, sino también su capacidad para formar directamente ROS (Masuda et al., 1994).

En monoterapia es un fármaco que ha demostrado una actividad similar al 5-FU, sin embargo su mecanismo de acción es diferente, no habiéndose demostrado resistencia cruzada y no siendo su toxicidad superponible, lo que le confiere un sinergismo muy interesante para su combinación con el 5-FU y el ácido folínico (de Gramont et al., 2000; Goldberg et al., 2004) mejorando el grado de respuesta y la supervivencia.

### **Irinotecan**

Compuesto antitumoral desarrollado a partir de la camptotecina, alcaloide presente en un árbol de origen chino (*Camptotheca acuminata*), con potentes efectos citotóxicos, debidos a la inhibición de la síntesis de RNA y DNA (específicos de la fase S del ciclo celular) (Jaxel et al., 1989). El irinotecan es un profármaco, que por acción de la enzima carboxilesterasa es transformado en la mayoría de los tejidos en un metabolito activo (SN 38) que se ha revelado más activo y más citotóxico que el propio irinotecan.

El SN 38 o el irinotecan actúan inhibiendo de forma selectiva la topoisomerasa I, el enzima intranuclear implicado en el desenrollamiento de las hebras de DNA, proceso previo a la replicación y transcripción del DNA. El enzima actúa uniéndose a las regiones específicas de la cadena de DNA rompiendo una de las hebras del DNA. Posteriormente, el enzima vuelve a soldar la cadena tras haberla desenrollado. Grivicich y cols observaron que en el tratamiento con irinotecan en combinación con 5-FU se incrementaban los niveles de la enzima antioxidante superóxido dismutasa en líneas de cultivo celular de cáncer de colon, sugiriendo por tanto que el mecanismo de acción podría estar mediado por la generación de peróxido de hidrógeno (Grivicich et al., 2005).

Se ha sugerido que las células neoplásicas presentan niveles de topoisomerasa I superiores a los de las células normales (Laco et al., 2002), lo que implicaría un cierto grado de selectividad citotóxica de estos agentes frente a las células tumorales.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto el beneficio en cuanto a tasa de respuesta, tiempo a progresión y supervivencia derivada de la asociación del irinotecan con el 5-FU y ácido folínico (Douillard et al., 2000; Saltz et al., 2000).

### **Fármacos anti-EGFR: Cetuximab y Panitumumab**

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un miembro de la familia de receptores transmembrana con actividad tirosina quinasa para transducción de señales intracelulares relacionadas con crecimiento, diferenciación y supervivencia celular (Mendelsohn and Baselga, 2000). Este receptor se encuentra sobreexpresado en numerosos tumores, incluyendo entre un 25-77% de los cánceres colorrectales.

EGFR juega un papel fundamental en la carcinogénesis humana, ya que se encuentra implicado en procesos relacionados con la progresión del ciclo celular, inhibición de apoptosis, inhibición de la diferenciación celular, angiogénesis y migración celular y metástasis (Hynes and Lane, 2005; Mendelsohn and Baselga, 2006).

El conocimiento de estos mecanismos moleculares implicados en la patogénesis tumoral constituyen la base racional para una nueva generación farmacológica que tiene como diana el EGFR.

El cetuximab es un anticuerpo IgG monoclonal quimérico cuya diana específica es el dominio extracelular del EGFR. Este anticuerpo se une al EGFR bloqueando la unión de sus ligandos naturales al receptor, lo que provoca la inhibición de su función. Además induce la internalización de EGFR lo que puede conllevar una disminución de los receptores disponibles en la superficie celular (Mendelsohn and Baselga, 2000). También dirige a las células efectoras inmunitarias citotóxicas hacia las células tumorales que expresan EGFR (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo, ADCC). Por otra parte, cuando la vía de señalización mediada por EGFR es bloqueada por el cetuximab, se activan una amplia variedad de mecanismos apoptóticos. Además, el bloqueo del EGFR también induce mecanismos antimetastásicos, inhibe la expresión de factores angiogénicos por

parte de las células tumorales y provoca una reducción de la neovascularización (Iqbal and Lenz, 2004).

La experiencia clínica ha puesto de manifiesto que los niveles de expresión de EGFR, medidos mediante técnicas de inmunohistoquímica, no predice el beneficio clínico del tratamiento con el cetuximab (Adams and Maughan, 2007; Chung et al., 2005). Sin embargo, varios estudios han indicado que la presencia de mutación del gen K-Ras que codifica para una pequeña proteína G, implicada en la transducción de la señal del EGFR en sentido descendente, está asociado a una falta de respuesta de los inhibidores de los EGFR (Benvenuti et al., 2007; Di Fiore et al., 2007). Esto ha puesto de manifiesto el papel del oncogen K-Ras como marcador para el tratamiento con inhibidores del EGFR.

Cabe destacar como entre un 30 y un 50% de los cánceres colorrectales tienen mutado el gen K-Ras (Andreyev et al., 2001; Bos, 1989).

Diferentes estudios han demostrado el beneficio en cuanto a tasa de respuesta, tiempo a progresión y supervivencia derivado de la asociación del cetuximab con otros agentes quimioterápicos como el 5-FU, la capecitabina, el irinotecan o el oxaliplatino entre otros (Jonker et al., 2007).

El panitumumab es un anticuerpo monoclonal recombinante totalmente humano IgG, que al igual que el cetuximab se une con gran afinidad y especificidad al EGFR, desencadenando los mismos procesos que los descritos para el cetuximab. De igual forma que el cetuximab, el estado del oncogen K-Ras es un factor pronóstico para el tratamiento (Weber and McCormack, 2008).

### **Fármacos antiangiogénicos: Bevacizumab**

La angiogénesis tumoral consiste en una serie de complejos pasos consecutivos que llevan en último lugar a la formación de neovasos que suministran sangre y nutrientes a la masa tumoral. Por tanto, se trata de un proceso esencial tanto para el crecimiento del propio tumor como para el desarrollo de metástasis.

Son múltiples los procesos que regulan la angiogénesis, sin embargo se considera que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) tiene un papel

central en la angiogénesis tumoral. Por otra parte, diferentes estudios han puesto de manifiesto el papel que juegan en la respuesta angiogénica la hipoxia, la privación de nutrientes, p53 así como diferentes ROS (North et al., 2005). Así, el estrés oxidativo interviene en la angiogénesis a través de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, implicado en la regulación de la expresión de genes que median procesos antiapoptóticos, de proliferación celular, metástasis y angiogénesis. Además, también se ha podido comprobar el efecto de ROS en la angiogénesis ya que activan alguno de los sistemas que intervienen en la expresión de VEGF (Schafer et al., 2003).

El bevacizumab, es un anticuerpo monoclonal que se une al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor clave de la vasculogénesis y la angiogénesis (Fukumura et al., 2001), inhibiendo así la unión de éste a sus receptores Flt-1 (VEGFR-1) y KDR (VEGFR-2), situados en la superficie de las células endoteliales.

La neutralización de la actividad biológica del VEGF produce una regresión de la vascularización de los tumores, normaliza la vasculatura residual del tumor e inhibe la neovascularización tumoral, inhibiendo así el crecimiento del tumor y la progresión de la enfermedad metastásica (Caprioni and Fornarini, 2007; Castro-Carpeno et al., 2009).

Por último, cabe destacar el beneficio en cuanto a tasa de respuesta, tiempo a progresión y supervivencia derivado de la asociación del bevacizumab con otros agentes quimioterápicos como el 5-FU, la capecitabina, el irinotecan o el oxaliplatino entre otros (Hurwitz et al., 2004).

### 1.3. ESTRÉS OXIDATIVO Y CÁNCER

#### 1.3.1. *Mecanismos de carcinogénesis*

La carcinogénesis es un complejo proceso formado por varias secuencias que permiten a la célula evolucionar desde un estado de salud a un estado precanceroso para finalmente alcanzar un estadio inicial cancerígeno (Trueba et al., 2004). En este sentido, existen varias teorías para explicar el proceso de carcinogénesis. Así, un aumento de la síntesis del DNA y de la mitosis provocado por agentes no genotóxicos podría inducir mutaciones en las nuevas células. Estas mutaciones podrían ir expandiéndose a través de nuevas divisiones evolucionando de un estado inicial preneoplásico a un estado neoplásico (Ames and Gold, 1990).

Otra teoría formula que existe un equilibrio entre proliferación y muerte celular. Si el daño al DNA es demasiado grande existen importantes mecanismos que eliminan selectivamente las células alteradas, proceso denominado apoptosis (Hengartner, 2000). La proteína p53 juega un papel primordial en este proceso (Oren, 2003), iniciando mecanismos que eliminan por ejemplo, las bases del DNA oxidadas que puedan causar mutaciones. Si el daño celular es demasiado grande, p53 pone en marcha los mecanismos de apoptosis, aunque procesos incontrolados de apoptosis, también pueden ser dañinos para el organismo ya que provocarían la muerte de células sanas (Hussain et al., 2003). Por tanto, existen sistemas de regulación de la propia apoptosis consistiendo en factores proapoptóticos (p53) como antiapoptosis.

En más de la mitad de los tipos de cánceres se han encontrado alteraciones en vías por arriba o bien por abajo que afectan al funcionamiento del gen p53. Esto indica que los procesos de carcinogénesis estarían causados por un desequilibrio entre la proliferación celular y la muerte, estando a favor de la proliferación.

Estudios epidemiológicos y de experimentación animal han mostrado que el proceso de carcinogénesis podría tener lugar en varias y diferentes etapas caracterizadas por diversos mecanismos. De esta forma, cabe destacar el modelo de carcinogénesis basado en la hipótesis de tres etapas consistentes en iniciación, promoción y progresión.

Existen una serie de agentes denominados genotóxicos, normalmente sustancias químicas que dañan directamente al DNA, provocando la aparición de una mutación y/o una serie de cambios estructurales. Por otra parte, existiría otra segunda categoría de agentes carcinogénicos no genotóxicos, cuyo papel en el proceso carcinogénico no estaría mediado directamente a través de daño al DNA. Estos compuestos modulan mecanismos de muerte y crecimiento celular.

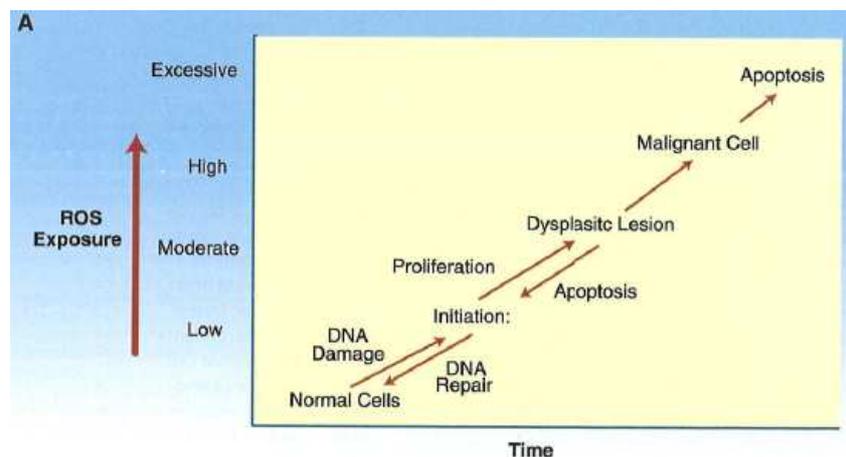
De esta forma, el proceso de desarrollo de un cáncer estaría formado por la acción acumulativa de múltiples eventos, pudiendo actuar ROS a varios niveles y en todas las etapas (Klaunig and Kamendulis, 2004). Así, ROS puede inducir tanto inestabilidad genómica, causada por daño al DNA como alteraciones en los procesos de señalización celular relacionados con supervivencia, proliferación, resistencia a apoptosis, angiogénesis y metástasis en células precancerosas y cancerosas, promoviendo así la iniciación, promoción y progresión del cáncer, tal y como se describe a continuación (Figura 21):

La iniciación implica una mutación del DNA no letal pero que produce una alteración celular seguida por al menos un ronda de síntesis de DNA que permite fijar el daño producido. En este punto, la célula es capaz de interrumpir temporalmente su ciclo celular, reparar el daño y reanudar la división (Loft and Poulsen, 1996). El daño al DNA puede ocurrir mediante la acción de ROS, como por ejemplo radicales hidroxilo formados por la reacción de Fenton. Varios estudios han revelado una interesante correlación entre el tamaño del tumor y la cantidad de 8-OH-dG.

El estadio de promoción está caracterizado por la expansión de las células iniciadas, produciéndose la proliferación celular y/o la inhibición de la apoptosis. El resultado de este proceso es la formación de una lesión identificable y es dosis dependiente, requiriendo por tanto la presencia continuada de un agente que estimule la promoción. No obstante, es un proceso reversible. Muchos agentes promotores poseen una fuerte capacidad inhibitoria de agentes celulares antioxidantes como catalasas, glutatión, SOD, etc. Mientras que un alto nivel de estrés oxidativo es citotóxico para las células y detiene la proliferación induciendo la apoptosis o incluso provocando necrosis, niveles bajos de estrés oxidativo pueden

estimular la división celular y por tanto estimular el crecimiento y promoción de un tumor (Dreher and Junod, 1996).

La progresión es la tercera y última etapa del proceso de carcinogénesis. Esta etapa implica cambios celulares y moleculares que ocurren desde un estado preneoplásico hasta un estado neoplásico. Esta etapa es irreversible y está caracterizada por la acumulación de daños genéticos que permiten evolucionar a la célula de benigna a la malignidad.



**Figura 21.** Modelo de carcinogénesis y su relación con niveles de estrés oxidativo.

Una importante etapa en el crecimiento de cualquier tumor es la generación de un nuevo sistema de suministro sanguíneo que alimente a las células malignas, denominado angiogénesis (Carmeliet, 2000). Este proceso está regulado por el supresor tumoral p53, ya que es capaz de activar genes que inhiben la neovascularización y la represión de genes que activan el crecimiento vascular, y por tanto intrínsecamente conectado con el desarrollo de metástasis.

Asimismo se ha podido comprobar el importante papel que juega ROS en la neovascularización durante el crecimiento tumoral. Arbiser y colaboradores (Arbiser et al., 2002) demostraron que RNS inducido por  $H_2O_2$  aumentaba la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), provocando la promoción de los mecanismos de vascularización y la rápida expansión de los tumores.

Por otra parte, en la mayoría de los tumores, se ha podido relacionar una mayor capacidad metastásica con niveles elevados de ROS (Ishikawa et al., 2008; Lim et al., 2005). Así, la administración exógena de ROS podría aumentar ciertos

estados metastáticos (Jing et al., 2002) mientras que el tratamiento con antioxidantes podría atenuar la progresión metastásica (Ferraro et al., 2006).

Los linfocitos intratumorales en muchos de los procesos carcinogénicos atacan a las células malignas produciendo su muerte. Sin embargo, monocitos y macrófagos pueden ser inhibidos por ROS liberados por la NADPH oxidasa. Datos *in vitro* sugieren que en ambientes con niveles de estrés oxidativo, determinadas citoquinas, tales como la interleucina 2 (IL-2) o el interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) provocan una débil activación de las células T o de las natural killer, produciéndose por tanto escape tumoral a la respuesta inmune (Mantovani et al., 2003).

### **1.3.2. Señalización celular y cáncer**

Tal y como se ha venido describiendo, desde hace años se ha podido constatar como ROS y RNS juegan un papel fundamental en la iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis. Sin embargo, aún no están totalmente claros ni definidos todos los procesos y mecanismos a través de los que median, a pesar de que ya se conoce como los radicales libres a determinadas concentraciones juegan un importante papel como reguladores en los procesos de comunicación y señalización intra e intercelular, participando en cascadas que regulan distintas funciones y vías metabólicas (Thannickal and Fanburg, 2000).

Estos procesos de transducción de señales permiten que determinada información del exterior de la célula sea transmitida a varios elementos funcionales del interior, cuyo objetivo final suele ser la expresión de determinados genes siendo los factores de transcripción las proteínas encargadas de transmitir esta información al núcleo celular. Este mecanismo de transducción es disparado por elementos extracelulares tales como hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, neurotransmisores y ROS (Hensley et al., 2000).

Dado el papel de ROS en los mecanismos de señalización, es importante considerar la influencia tanto del estado redox como de la concentración de estas especies oxigénicas, ya que pueden provocar una respuesta positiva, traducido en proliferación celular o bien una respuesta negativa produciéndose la muerte celular o la detención de su crecimiento. De esta forma, mientras que elevadas

concentraciones de ROS causan muerte celular y necrosis, los efectos de ROS sobre la proliferación ocurren exclusivamente a bajas o concentraciones transitorias de estos radicales.

De esta forma y teniendo en cuenta que el crecimiento celular es el proceso fundamental regulado a través de la transducción de señales, alteraciones en su normal funcionamiento puede conducir a cáncer, quedando ampliamente demostrado como ROS puede interferir en la expresión de varios genes así como en las vías de transducción de señales, siendo ambas alteraciones fundamentales en los procesos de carcinogénesis (Poli et al., 2004).

A modo de resumen en la figura 22 quedan reflejadas las vías de señalización que son inducidas tanto por ROS como por otros metales productores de estrés oxidativo.

Concretamente, una activación de Ras como consecuencia de ROS se ha observado en distintos tumores (Dayan and Paine, 2001), cuya función natural es regular los procesos de crecimiento oponiéndose a la apoptosis. Se han encontrado mutaciones de Ras en un 30% de los cánceres de pulmón, piel, hígado y colon (Vachtenheim, 1997).

Por otra parte, tanto especies reactivas de nitrógeno, el anión superóxido o bien el peróxido de hidrógeno, pueden activar la cascada de las serin-treonin Kinasas MAPK (Kyriakis and Avruch, 2001). Esta alteración en la regulación de las MAPK es frecuente en carcinoma de mama y de cérvix. Dentro del grupo de las MAPK destaca el equilibrio entre ERK y JNK, claves en la proliferación celular, de forma que para inducir apoptosis es necesario que se produzca un aumento de JNK y una disminución de ERK, influido directamente por el estado redox (Iles and Forman, 2002).

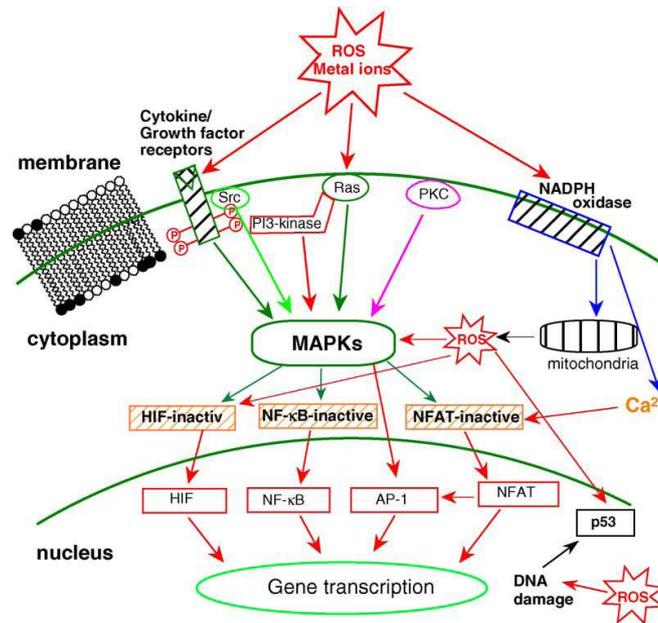


Figura 22. Vías de señalización inducidas por ROS y metales.

Por otra parte, la activación de la vía de señalización de las protein quinasas (MAPK) por parte de ROS, implica la activación de factores de transcripción, como NF-κB y el factor AP-1, involucrados en el control de la expresión de determinados genes, como los encargados de la reparación del daño al DNA, la detención de la proliferación de células dañadas y la inducción de la apoptosis, mecanismos directamente implicados en la iniciación y progresión tumoral.

Cabe destacar el papel del gen p53, cuya disrupción está asociada con más de la mitad de todos los tipos de cáncer. La proteína p53 controla el ciclo celular y su inactivación provoca un crecimiento celular de forma incontrolada (Polyak et al., 1997). Por otra parte, existen trabajos que describen mutaciones en p53 causadas por acción directa de ROS, provocando alteraciones directas en el control del ciclo celular (Renzing et al., 1996). Asimismo, p53 está implicado como factor de respuesta celular al estrés oxidativo (Wang et al., 2007).

ROS y determinados metales también pueden producir alteraciones en el funcionamiento de los receptores y/o factores de crecimiento (EGFR, PDGF y VEGF). Estas alteraciones se han asociado con el desarrollo de numerosos tipos de cáncer (Dreys et al., 2003).

Además de los receptores ya mencionados, ROS también pueden activar varias protein quinasas (PTKs) pertenecientes a la familia de las Src quinasas y de

Janus quinasas (JAK) (Abe and Berk, 1999; Esposito et al., 2003). Por ejemplo, el peróxido de hidrógeno, el radical superóxido y otra serie de metales como el arsénico o el Cromo (III) inducen la fosforilación de los residuos de tirosina de varias PTKs en diferentes tipos de células (Simeonova and Luster, 2002). De esta forma, se ha detectado sobreexpresión de Src en varios tipos de cáncer como en el caso colorrectal. Las Src activadas que se encuentran unidas a las membranas celulares son capaces de iniciar la cascada de señalización mediante la activación de las MAPK y de las PI3K.

### 1.3.3. Cáncer colorrectal y daño oxidativo a biomoléculas

El cáncer colorrectal es uno de los mayores problemas de salud presente en las sociedades desarrolladas, estando ampliamente demostrado que el periodo de supervivencia aumenta cuando la enfermedad se diagnostica de forma precoz y no está totalmente desarrollada (Arnold et al., 1995). Por tanto, es importante encontrar nuevos y fiables marcadores capaces de proporcionar un diagnóstico temprano de esta patología.

El colon está constantemente expuesto a ROS y RNS provenientes de fuentes tanto endógenas como exógenas (Stone and Papas, 1997). Así, es ampliamente conocido que elevados niveles de estrés oxidativo están asociados a un mayor riesgo de cáncer colorrectal (Blau et al., 1999) interviniendo en los procesos de iniciación, promoción y/o progresión de la carcinogénesis (Figura 23).

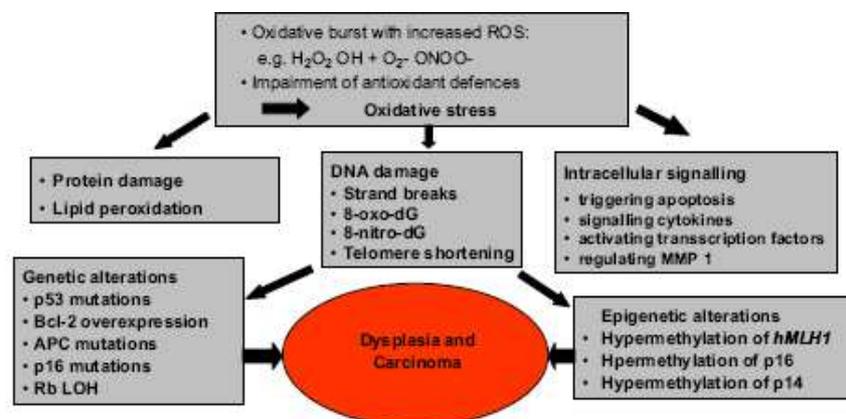


Figura 23. Estrés oxidativo y carcinogénesis en el tracto gastrointestinal.

De esta forma, modificaciones en el material genético, resultantes del daño oxidativo, representan el primer paso implicado en los procesos de mutagénesis,

carcinogénesis y envejecimiento, habiendo sido identificadas más de 100 productos de oxidación del DNA. Además, se ha podido constatar como estas especies reactivas están implicadas en los procesos de metástasis, migración celular y angiogénesis (Wu, 2006).

Además de las especies oxigénicas reactivas (ROS), existen varios metales redox, debido a su capacidad de generar radicales libres, o metales no-redox, pero con capacidad para unirse a tioles, que también están implicados en los mecanismos de carcinogénesis y envejecimiento (Pourahmad and O'Brien, 2001; Santos et al., 2005; Stayner et al., 1996; Waalkes et al., 2004). Así, el estrés oxidativo inducido por el hierro es considerado uno de los factores determinantes del cáncer colorrectal (Valko et al., 2001).

Las alteraciones en el DNA implican ruptura de las hebras, modificaciones de las bases púricas o pirimidínicas o bien de las desoxirribosas y alteraciones en el proceso de entrecruzamiento de sus cadenas. Estos procesos se traducen en la detención o inducción de la transcripción, inducción de las vías de transducción de señales, replicación de los errores e inestabilidad genómica, todos ellos asociados a la carcinogénesis (Marnett, 2000).

La alteración más ampliamente estudiada es la formación de la base modificada 8-hidroxi-desoxiguanina (8-OH-dG). Esta lesión es importante ya que se forma con relativa facilidad y es mutagénica, aspecto que le permite desempeñar un importante papel como biomarcador de carcinogénesis (Haghdoost et al., 2005).

En este sentido, tanto el daño al DNA, las mutaciones y la alteración de la expresión genómica tienen como común denominador el estrés oxidativo, asimismo las diferentes etapas de los procesos carcinogénicos y apoptóticos (Valko et al., 2004; Valko et al., 2001; Valko et al., 2006).

Además de ROS, especies reactivas nitrogenadas (RNS), tales como peroxinitritos y el óxido de nitrógeno, han sido relacionadas con el daño al DNA (Hegner et al., 2000). De la misma forma que con el oxígeno, el peroxinitrito es capaz de formar la base modificada 8-nitroguanina. Esta modificación puede inducir

transversión de G:C a T:A. Mientras que la estabilidad de esta lesión en el DNA es baja, en el RNA el compuesto nitrogenado formado es muy estable.

Además de los extensos estudios que existen sobre el papel del daño oxidativo en el DNA nuclear en procesos neoplásicos, existen evidencias sobre la implicación del daño oxidativo del DNA mitocondrial en dichos procesos, habiéndose encontrado diversas mutaciones y alteraciones en la expresión de genes mitocondriales y en regiones del DNA mitocondrial en varios tipos de cáncer (Shokolenko et al., 2003), incluido el colorrectal.

El daño a lípidos, que media fundamentalmente a través de procesos de peroxidación lipídica, también ha sido relacionado con mecanismos de carcinogénesis (Cejas et al., 2004). Una vez formado el radical lipoperoxilo, éste puede ser reorganizado mediante una reacción de ciclación para formar el producto final de la peroxidación, llamado malondialdehído (MDA). Además de tratarse de un producto mutagénico, se ha demostrado que el malondialdehído puede reaccionar con las bases guanina, adenina y citosina del DNA (Marnett, 1999), pudiendo provocar transversiones a timina (Fink et al., 1997; Mao et al., 1999). La cuantificación del MDA está siendo empleado en la actualidad como indicador del estado de peroxidación lipídica, de forma que niveles elevados de MDA se relacionan con niveles de estrés oxidativo y procesos de carcinogénesis, respecto a valores más bajos encontrados en sujetos controles sanos (Ahmad et al., 2008).

Cabe destacar que los productos resultantes de los procesos de peroxidación lipídica también pueden inducir mecanismos de señalización intracelular (Leonarduzzi et al., 2000), y por tanto modular funciones relacionadas con expresión génica, proliferación celular y otros mecanismos de respuesta celular (Uchida, 2003).

El daño a proteínas causado por ROS y RNS, produce formación de grupos carbonilo y como consecuencia alteraciones en su conformación y por tanto en sus funciones biológicas, relacionadas con carcinogénesis y envejecimiento (Valko et al., 2006). De esta forma, la cuantificación de los grupos carbonilos de las proteínas se ha comenzado a emplear como biomarcador del daño a proteínas causado por estrés oxidativo consecuencia de ROS y RNS. Además, en numerosos estudios se han podido relacionar niveles elevados de este biomarcador con procesos de

carcinogénesis respecto a los valores determinados en sujetos controles sanos (Ahmad et al., 2008; Di Giacomo et al., 2003).

Además del daño a DNA, lípidos y proteínas que se ha detectado en los procesos de carcinogénesis consecuencia de la acción de ROS y RNS, diferentes estudios han puesto de manifiesto como se ven afectadas otra serie de biomoléculas que intervienen en el control del equilibrio redox, como el tripéptido GSH y su especie oxidada GSSG, así como el sistema tiorredoxina.

La concentración de glutation reducido (GSH) en plasma refleja los niveles presentes en los tejidos, de forma que una disminución en plasma de los niveles de GSH puede ser un indicador de un estado patológico (Wlodek et al., 2006). Así, se han medido en sangre de enfermos de cáncer de colon y mama los niveles de GSH en relación con su estado oxidado, observándose concentraciones significativamente inferiores respecto a grupos controles. Esta diferencia se hace especialmente significativa cuando los estadios de cáncer son más avanzados (Pastore et al., 2003). Estos hallazgos podrían justificarse por el incremento en la generación de peróxidos, causando por tanto aumento del glutacion oxidado.

En cuanto al sistema tiorredoxina existen evidencias experimentales que muestran niveles elevados en pacientes con cáncer colorrectal respecto a sujetos sanos (Lincoln et al., 2003). Además, tanto la tiorredoxina como la tiorredoxina reductasa son secretadas al medio, pudiéndose detectar y cuantificar en el plasma extracelular (Soderberg et al., 2000).

Así, resultados de varios estudios sugieren que la tiorredoxina tiene diferentes funciones en las células tumorales dependiendo del estado del desarrollo del cáncer (Tonissen and Di Trapani, 2009). En estadios iniciales, la tiorredoxina puede ser beneficiosa, ya que actúa previniendo el cáncer gracias a su capacidad para contrarrestar el estrés oxidativo causado por muchas sustancias carcinogénicas. Sin embargo, una vez que las células han iniciado el proceso cancerígeno, altos niveles de tiorredoxina pueden ayudar al desarrollo de la enfermedad debido a su papel en la promoción del crecimiento celular y sus funciones antiapoptóticas. En estadios más avanzados de la enfermedad, la tiorredoxina puede estar implicada en los procesos de angiogénesis y metástasis. De hecho, se ha podido comprobar como

interviene en la regulación de la expresión y en el funcionamiento del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Welsh et al., 2002). Por otra parte, niveles elevados de tiorredoxina se han asociado con resistencia a determinados fármacos quimioterápicos incluido el cisplatino, el oxaliplatino (Kopetz et al., 2009; Sun and Rigas, 2008) y el docetaxol (Kim et al., 2005).



## 1.4. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO

La determinación del estrés oxidativo medido como los niveles del estado antioxidante y del daño oxidativo es esencial para poder valorar la implicación de éste en la enfermedad, como el caso del cáncer colorrectal. Asimismo, sería importante encontrar nuevos y fiables marcadores que pudieran proporcionar información precoz sobre el diagnóstico y evolución de la enfermedad.

Existen múltiples sustratos de oxidación y son también múltiples los efectos de las defensas antioxidantes, poniendo esto en evidencia que la evaluación del estrés oxidativo debe ser abordada desde diversos puntos de vista que permitan ofrecer una imagen más global y completa de todos los aspectos implicados en ese mecanismo defensivo. Por lo tanto, con un sólo método de medida no se puede obtener toda la información deseada y se requiere un ensayo múltiple para generar un perfil que comprenda el estado de la defensa antioxidante como la del daño oxidativo (Hermans et al., 2007).

### 1.4.1. Capacidad Antioxidante Total

La finalidad es medir el potencial antioxidante total de una muestra biológica como el plasma. Se medirá la contribución de todos los compuestos presentes en el plasma. La captación de radicales es el principal mecanismo de acción de los antioxidantes, lo que ha permitido desarrollar métodos en los que se mide la capacidad antioxidante a través de la estabilización de radicales libres sintéticos generados en medios acuosos o solventes orgánicos polares, como el metanol.

Aunque existen distintos métodos, los más utilizados son el ABTS y el FRAP. El ensayo del ABTS se basa en la capacidad antioxidante del plasma para estabilizar el radical  $ABTS^{\cdot+}$  (Miller and Rice-Evans, 1997). Se inicia la reacción por adición de radicales peróxido u otros oxidantes que generan el radical catión  $ABTS^{\cdot+}$ , producto intensamente coloreado.

El método del FRAP se fundamenta en la capacidad del plasma de reducir un compuesto de hierro (III) mediante compuestos antioxidantes formándose un complejo fuertemente coloreado (Benzie and Strain, 1996).

Los polifenoles, compuestos con una elevada actividad antioxidante, tanto por sus propiedades quelantes como su capacidad secuestradora de radicales libres, se determinan mediante el procedimiento de Folin-Ciocalteu (Singleton and Esau, 1969), de forma que los compuestos fenólicos son oxidados por el reactivo de Folin-Ciocalteu formándose un compuesto para su posterior determinación espectrofotométrica.

#### **1.4.2. Evaluación de los biomarcadores de estrés oxidativo**

Los biomarcadores han sido usados para evaluar la eficacia antioxidante *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, y aportan información del daño a proteínas, aminoácidos, lípidos o bases de DNA, el cual está relacionado con enfermedades específicas.

Conocer la implicación de los radicales libres en la patogénesis de distintas enfermedades es extremadamente difícil, debido a la corta vida media de estas especies y a la dificultad de técnicas suficientemente sensibles como para detectar los radicales directamente en sistemas biológicos, por ello se hace necesario el estudio de biomarcadores que suponen un reflejo de los cambios que se producen en sistemas biológicos debidos al estrés oxidativo. Un biomarcador tiene que ser el principal producto de modificación oxidativa que pueda estar implicado directamente en el desarrollo de una enfermedad, un producto estable y no susceptible a modificaciones durante el ensayo. Además tiene que ser medido por un ensayo que sea específico, sensible, reproducible y robusto.

Además de la medida de diversos biomarcadores, se ha puesto a punto un protocolo para determinar nitrato y nitrito como indicadores de niveles de óxido nítrico, especie altamente inestable y por tanto difícilmente cuantificable, pero con un importante papel en la señalización molecular de determinados procesos biológicos. En el medio extracelular, el óxido nítrico reacciona con oxígeno y agua formando los aniones nitrato y nitrito. El procedimiento para su cuantificación se basa en la determinación colorimétrica de los nitritos con el reactivo de Griess, antes y después de la conversión del nitrato a nitrito por la nitrato reductasa de *Aspergillus* (Moshage et al., 1995).

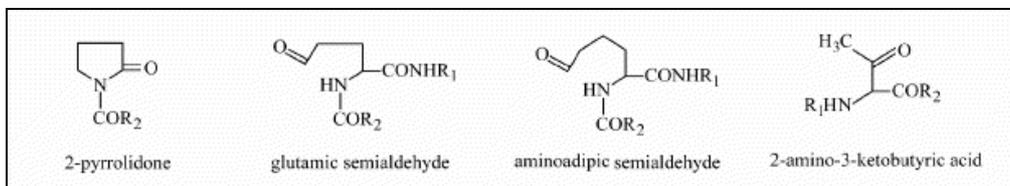
Biomarcadores de la oxidación a lípidos

La medida directa de los productos de la oxidación endógena de los lípidos resulta difícil, por lo que se han desarrollado diferentes métodos que evalúan este daño a través de la determinación de las moléculas que lo causan o bien miden los niveles de productos secundarios de oxidación como aldehidos o cetonas. El más ampliamente usado es el que mide el malondialdehido (MDA) en presencia de ácido tiobarbitúrico. La medida puede realizarse espectrofotométricamente o por fluorescencia (Draper et al., 1993; Grotto et al., 2007; Janero, 1990).

En cuanto a una de las especies reactivas que causan daño a lípidos cabe destacar los hidroperóxidos, como indicador de las especies reactivas generadoras de daño a estas biomoléculas. El procedimiento para su determinación se basa en la oxidación del ión ferroso por los hidroperóxidos lipídicos presentes en plasma y su cuantificación espectrofotométrica posterior mediante un ensayo colorimétrico acoplado (Nourooz-Zadeh et al., 1994).

Biomarcadores de la oxidación a proteínas

La oxidación proteica se define como una modificación covalente de una proteína inducida por especies reactivas (Figura 24). Los cambios oxidativos en proteínas pueden comportar diversas consecuencias en su función, como la inhibición de la actividad enzimática, un incremento de la susceptibilidad a la agregación y proteolisis, un aumento o disminución de la captación celular y una alteración de la inmunogénesis.



**Figura 24.** Oxidación de las proteínas.

Esta oxidación origina la oxidación de los grupos sulfidrilo, de aminoácidos como la metionina y cisteína que ven totalmente anulada su actividad biológica. La oxidación de proteínas ha sido asociada con el envejecimiento y la severidad de algunas patologías.

El más utilizado como biomarcador del daño oxidativo a proteínas es la cuantificación de grupos carbonilo, donde además sus niveles están asociados con distintas patologías (Berlett and Stadtman, 1997; Dean et al., 1997). Estos grupos son producidos sobre las cadenas laterales de las proteínas cuando están oxidadas, dando lugar a grupos químicos estables que son fácilmente detectables. Para ello se derivatizan con el NDPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) que lleva a la formación de un derivado que puede ser detectado por distintos métodos como ELISA, Western-Blot o por técnicas de HPLC o espectrofotometría a 373 nm de longitud de onda (Levine et al., 1990).

### Biomarcadores del daño al DNA

El DNA en el núcleo celular es un componente particularmente susceptible al daño oxidativo por los ROS (Cerutti, 1985). El radical hidroxilo es responsable de la oxidación de bases púricas y pirimidínicas, entre ellas la desoxiguanina (dG), generando la base modificada 8-hidroxi-desoxiguanina (8-OHdG).

La relación de concentraciones entre 8-OHdG/dG, se considera un marcador por excelencia del estado de daño oxidativo causado por los radicales libres sobre el DNA. Las técnicas aplicadas para la cuantificación de esta base modificada puede ser por HPLC utilizando detector electroquímico o por cromatografía de gases-masas (GC-MS).

#### **1.4.3. Evaluación del estado redox**

En los sistemas biológicos se establece un dinámico equilibrio entre la producción de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y una amplia variedad de especies que se encargan de su neutralización, denominado estado redox.

Como indicadores del estado redox celular cabe destacar el sistema antioxidante tiorredoxina, siendo uno de los mayores sistemas de control redox que existe tanto a nivel de citoplasma celular como a nivel mitocondrial. Para su determinación se valora por una parte, la actividad tiorredoxina reductasa, mediante un ensayo acoplado y cuantificación espectrofotométrica de una especie colorimétrica que se correlaciona con la actividad enzimática (Holmgren and

Bjornstedt, 1995), y por otra parte, se determina la tiorredoxina, a través de un kit de ELISA (Kogaki et al., 1996; Nakamura et al., 1996).

El glutatión se presenta como el antioxidante celular no enzimático más importante, y por tanto, también es un indicador del estado redox. La determinación de este tripéptido se realiza mediante la cuantificación espectrofotométrica del complejo formado por el glutatión y el clorodinitrobenzenu mediante catálisis de la enzima glutatión-S-transferasa (Brigelius et al., 1983).



## ***HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS***



## **2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

### **2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La contribución del estrés oxidativo a la evolución del cáncer así como a la respuesta de los agentes quimioterapéuticos es conocida y resulta evidente a juzgar por los datos de la Revisión Bibliográfica.

Sin embargo, el análisis del estrés oxidativo como respuesta a distintos tipos de tratamiento así como en los distintos estadios revela una gran discrepancia de resultados, siendo la gran mayoría estudios *in vitro*. Esto junto con la falta de un abordaje completo e integral en el que se valoren conjuntamente diferentes biomarcadores del estrés oxidativo así como la falta de datos acerca de ciertos parámetros, nos ha hecho plantear un estudio en el que hemos evaluado en diferentes poblaciones de pacientes con cáncer colorrectal el estado antioxidante total y parámetros de daño oxidativo y de estado redox en plasma y en linfocitos, comparándolo con otras neoplasias, así como evaluando estos parámetros en función del tratamiento quimioterápico y del grado y tipo de metástasis.

### **2.2. OBJETIVOS**

En base a la hipótesis de trabajo planteada, se definen a continuación los objetivos del trabajo relativos al desarrollo de la presente Tesis Doctoral:

1. Analizar las diferencias en capacidad antioxidante, estrés oxidativo y estado redox en tres grupos de pacientes con neoplasia (cáncer colorrectal, cáncer gástrico y linfoma) respecto a grupo de sujetos control.
2. Establecer en los pacientes con cáncer colorrectal las diferencias en los parámetros de estrés oxidativo en función del tratamiento.
3. Evaluar la evolución del estrés oxidativo en función del grado y tipo de metástasis.
4. Establecer correlaciones y/o inferencias con los diferentes parámetros clínicos.

5. Consecuencia del análisis de los resultados obtenidos se valorará si alguno de los parámetros estudiados se podría emplear como marcador de progresión del cáncer colorrectal.

## ***MATERIAL Y MÉTODOS***



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL

Los diferentes reactivos utilizados en las determinaciones analíticas, así como su procedencia, serán reseñados en el apartado correspondiente a cada uno de los métodos.

##### 3.1.1. Aparatos

- **Cromatógrafo líquido de alta resolución Waters Alliance 2695** con Detector Dual  $\lambda$  Absorbance Waters 2487
- **Espectrofotómetro** ultravioleta/visible Kontron instruments modelo Uvikon 922 con baño termostatzado (Kontron)
- **Centrífugas:**
  - ✓ Centrífuga refrigerada Eppendorf 5702
  - ✓ Centrífuga refrigerada Eppendorf 5415R
- **Sonicador** de células modelo Microson Ultrasonic cell disruptor
- **Otros aparatos:**
  - ✓ Baño termostatzado de temperatura regulable SBS- BT21
  - ✓ pHmetro Crison modelo micropH 2000
  - ✓ Balanza Swiss Quality y microbalanza Precisa 62 A
  - ✓ Sistema Millipore de filtración bajo vacío, equipados con filtros para solventes y soluciones acuosas
  - ✓ Agitadores magnéticos con calefacción
  - ✓ Agitadores manuales de tubos Vórtex
  - ✓ Congelador de -80 °C modelo Revco
  - ✓ Material habitual de laboratorio

### **3.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Hemos planteado un estudio sobre 85 pacientes con cáncer colorrectal sin tratamiento y tratados con quimioterapia, procedentes del Complejo Asistencial de Burgos. Además, se ha contado con un pequeño grupo de población con cáncer gástrico (12 pacientes) y otra población de sujetos con linfoma (16 pacientes), lo que ha permitido realizar una aproximación al estudio del estrés oxidativo en ambos tipos de patologías.

#### **3.2.1. Selección de Pacientes**

Se realizó entre pacientes con cáncer colorrectal pertenecientes al Servicio de Oncología Médica del Hospital General Yagüe, del Complejo Asistencial de Burgos. Se aceptaron como pacientes para ser incluidos en el estudio aquellos que cumplían los siguientes criterios de inclusión:

- a. Edad comprendida entre 40 y 85 años
- b. Tener cáncer colorrectal en cualquiera de los estadios II, III y IV
- c. Fueron incluidos en el estudio pacientes con cualquier patología de base, así como con cualquier tratamiento farmacológico, enfermedades concomitantes o anteriores, y estado y pronóstico actual

Los pacientes con cáncer colorrectal y en régimen quimioterápico han sido agrupados en función de tres tratamientos tipo, con objeto de poder realizar el estudio y el análisis comparativo de resultados de los diferentes parámetros medidos (Tabla I).

**Tabla I.** Fármacos correspondientes a los tratamientos tipificados para el estudio.

TRATAMIENTO TIPO	FÁRMACOS
TIPO 1	5-FU ó Capecitabina 5-FU ó Capecitabina + Oxaliplatino ó Irinotecan
TIPO 2	5-FU ó Capecitabina + Oxaliplatino ó Irinotecan + Cetuximab ó Bevacizumab ó Panitumumab
TIPO 3	Otros Cetuximab Mitomicina Pemetrexed Bevacizumab Erlotinib Irinotecan + Cetuximab Capecitabina + Mitomicina Cisplatino + Cetuximab Bevacizumab + Erlotinib Cetuximab + Irinotecan Capecitabina + Mitomicina + Bevacizumab

Se ha incluido también en el estudio un grupo control de sujetos sanos, con similares características en cuanto a edad y sexo que el grupo objeto de estudio, y en base a los requisitos mínimos establecidos para poder realizar la donación voluntaria de sangre.

Tanto el grupo de pacientes como el grupo control de sujetos sanos dieron consentimiento informado de la donación de su sangre para fines relacionados con los trabajos de investigación realizados.

Asimismo para el estudio comparativo del estrés oxidativo en diferentes neoplasias, se seleccionaron otros dos grupos de pacientes, uno formado por una población con cáncer gástrico y otro grupo con linfoma.

### **3.2.2. Tamaño de la muestra**

Constituida por un total de 85 pacientes con cáncer colorrectal estableciendo como número de sujetos suficiente para la comparación de medias, así como para realizar las diferentes agrupaciones atendiendo a determinadas características poblacionales y realizar los estudios correspondientes. De este grupo, 15 pacientes no habían comenzado el tratamiento quimioterápico o bien lo habían finalizado por lo menos 6 meses antes de la toma de muestra para la realización del estudio. El tamaño de muestra fue calculado para obtener una diferencia significativa entre los grupos para cada parámetro analizado, con un grado de error alfa de 5%, un riesgo beta de 0,1 y unas pérdidas estimadas del 10%.

Según los estudios planteados se han realizado distintas agrupaciones poblacionales dando lugar a diferentes tamaños de muestra en función de las características de los pacientes. En primer lugar, para el estudio del estrés oxidativo asociado al cáncer colorrectal se ha considerado una población de enfermos con CCR y sin tratamiento quimioterápico con un tamaño muestral de 15 pacientes. Por otra parte, esta muestra también se ha empleado para el estudio del estrés oxidativo asociado al tratamiento quimioterápico, contando además con un grupo formado por 70 pacientes en régimen terapéutico. Asimismo, esta población se ha dividido en función del tipo de tratamiento (un 47% de los individuos en tratamiento T<sub>1</sub>, un 37% en tratamiento T<sub>2</sub> y un 16% en tratamiento T<sub>3</sub>), con objeto de estudiar como se ve afectado el estrés oxidativo en cada uno de estos casos. Para el estudio del E.O. asociado a metástasis, en una primera aproximación se ha tenido en cuenta el grupo de pacientes que no estaba recibiendo tratamiento quimioterápico, de los cuales el 47% no presentaba enfermedad metastásica mientras que el 53% corresponde al grupo de población con metástasis. Considerando el grupo de pacientes en tratamiento quimioterápico, se ha estudiado el estrés oxidativo asociado a metástasis y a su tipo. De esta forma se ha partido de una población formada por 30 pacientes y que no había desarrollado enfermedad metastásica y de otro grupo compuesto por 40 pacientes con metástasis, de los cuales el 33% se corresponde a pacientes con metástasis hepática, el 35% a no hepáticas y el 32% a hepáticas y otras. Por último, para el estudio del estrés oxidativo asociado a concentración del marcador carcinoembrionario se ha partido de un tamaño muestral de 38 y 32 pacientes para las concentraciones de CEA < 5 ng/mL y ≥ 5 ng/mL respectivamente, y para el marcador Ca 19.9 se ha contado con un grupo de 44 y 26 pacientes para las concentraciones de Ca 19.9 < 37 U/mL y ≥ 37 U/mL respectivamente.

Para el grupo control se seleccionaron 71 sujetos sanos que aceptaron voluntariamente participar.

El grupo de pacientes con cáncer gástrico ha estado formado por 12 sujetos mientras que se contaron con 16 pacientes para la realización del estudio de la población con linfoma.

### **3.2.3. Obtención de muestras y procesamiento**

A los pacientes seleccionados se les extrajo una sola y única muestra de sangre para la realización del estudio. Se separaron 50  $\mu$ L de sangre, añadiendo 50  $\mu$ L de agua, se agitó y se incubó a 4 °C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se mezcló con 100  $\mu$ L de cloroformo-etanol (1:1) y se centrifugó a 8.000 r.p.m. durante 30 minutos. El sobrenadante se transfirió a un eppendorf añadiendo 10  $\mu$ L de ácido perclórico (PCA) al 20% para cada 100  $\mu$ L de sobrenadante, procediendo a su conservación a -80 °C. El resto de sangre se centrifugó a 8000 r.p.m. durante 6 minutos para la obtención de plasma. Éste se distribuyó en tubos eppendorf que se mantuvieron guardados a -80 °C hasta su utilización para la determinación de la actividad antioxidante total (FRAP, ABTS y polifenoles), de biomarcadores de daño oxidativo a lípidos (malondialdehído e hidroperóxidos) y a proteínas (grupos carbonilo), de biomarcadores de niveles de óxido nítrico (nitratos y nitritos) y evaluación del estado redox (tioredoxina, y la enzima tioredoxina reductasa).

Una vez separado el plasma, el precipitado se hemodiluyó con un volumen equivalente de cloruro sódico al 0,9%. A continuación esta fracción se fue añadiendo suavemente a otro tubo con 15 mL de Ficoll, y se centrifugó a 1.500 r.p.m. durante 20 minutos. El anillo de linfocitos se transfirió a otro tubo, se centrifugó a 1.800 r.p.m. durante 6 minutos previo lavado con 50 mL de cloruro sódico al 0,9%, repitiendo tres veces esta operación. El botón celular se resuspendió en 2 mL de PBS al 1%, distribuyéndose posteriormente en tubos eppendorf que se mantuvieron guardados a -80 °C hasta su utilización para la determinación del malondialdehído y grupos carbonilo de la fracción de linfocitos. A la alícuota para la determinación de GSH se le añadieron 10  $\mu$ L de PCA al 20%, se centrifugó a 8.000 r.p.m. durante 5 minutos guardando el sobrenadante a -80 °C, para también su posterior análisis y cuantificación.

### 3.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

#### 3.3.1. Capacidad antioxidante total del plasma

##### 3.3.1.1. Determinación mediante el método FRAP

**Fundamento teórico:** Para la determinación de la capacidad antioxidante total del plasma se siguió el método del FRAP de Benzie y Strain (Benzie and Strain, 1996) que se fundamenta en la capacidad de reducir el complejo formado por el hierro (III) y TPTZ (2,4,6-tris-2-piridil-s-triazina) hasta hierro (II)-TPTZ, mediante un donante de electrones (antioxidante), formándose un compuesto de color azul que presenta un máximo de absorción a 593 nm. La medida espectrofotométrica a esa longitud de onda es proporcional a la capacidad reductora de la muestra.

**Reactivos:** Acetato de sodio ( $C_2H_3NaO_2$ ), ácido acético ( $CH_3CO_2H$ ), tricloruro férrico ( $FeCl_3 \cdot H_2O$ ), sulfato de hierro ( $FeSO_4 \cdot 2H_2O$ ) y ácido clorhídrico (ClH) fueron de Panreac y el TPTZ (2,4,6-tris-2-piridil-s-triazina) fue suministrado por Sigma-Aldrich. El reactivo TPTZ se preparó mezclando 25 mL de tampón acetato sódico 0,3 M pH 3,6, 2,5 mL de tricloruro férrico 20 mM, 2,5 mL de una solución de TPTZ 10 mM y 3 mL de agua miliQ.

**Metodología:** Para las determinaciones, se incubaron durante 30 minutos a 37 °C, 970  $\mu$ L de reactivo TPTZ junto a 20  $\mu$ L de muestra de plasma y 10  $\mu$ L de tampón acetato sódico 0,3 M. Transcurrido el tiempo se realizó la medida espectrofotométrica a 593 nm, utilizando el tampón acetato para el blanco de lectura. Los resultados se expresaron refiriéndoles a concentración de hierro (II), para lo que se realizó una recta de calibrado a partir de una solución acuosa estándar de sulfato de hierro (Figura 25).

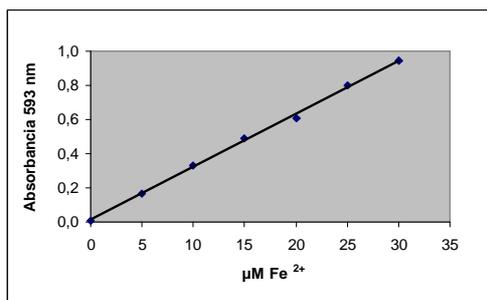


Figura 25. Recta de calibrado a partir de una solución de sulfato de hierro.

### 3.3.1.2. Determinación mediante el método ABTS

**Fundamento teórico:** Para la determinación de la capacidad antioxidante total se siguió el método del ABTS<sup>•+</sup> de Miller y Rice-Evans (Miller and Rice-Evans, 1997) modificado posteriormente por Pellegrini (Re et al., 1999), basado en la oxidación del ABTS (sal diamonio 2,2'azinobis-(6-ácido sulfónico 3-etilbenzotiazolina)) por el sulfato potásico para formar el radical ABTS<sup>•+</sup>, que es reducido en presencia de antioxidantes donadores de hidrógeno.

**Reactivos:** Cloruro potásico (ClK), fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) y fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) fueron de Panreac; cloruro sódico (ClNa) fue suministrado por Merck y ABTS (sal diamonio 2,2'azinobis-(6-ácido sulfónico 3-etilbenzotiazolina)), persulfato potásico (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) y TROLOX (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) suministrados por Sigma-Aldrich. La solución PBS pH 7,4 se compuso de las siguientes sales: NaCl 137 mM, KC l 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM. La preparación del reactivos ABTS<sup>•+</sup> se realizó mezclando una solución de ABTS en PBS 7 mM con una solución acuosa de persulfato potásico 2,45 mM en una proporción 1:1. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y en oscuridad de 12 a 16 horas antes de usar y posteriormente se diluye con PBS pH 7,4.

**Metodología:** La determinación de la actividad antioxidante total se realizó espectrofotométricamente a 734 nm añadiendo alícuotas de las muestras problema al reactivo del ABTS<sup>•+</sup>. Para las determinaciones, se midió la absorbancia de 960 µL de ABTS<sup>•+</sup>, añadiendo a continuación 35 µL de PBS pH 7,4 y 5 µL de muestra de plasma, leyendo a los 4 minutos de reacción. Como blanco se emplearon 995 µL de tampón PBS pH 7,4 y 5 µL de plasma. Los resultados se expresaron como TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity), referido a su porcentaje de capacidad de inhibición o bien como concentración de TROLOX. La recta de calibrado con TROLOX se realizó a partir de una solución estándar de TROLOX en metanol. El ajuste de la recta de calibrado se muestra a continuación (Figura 26).

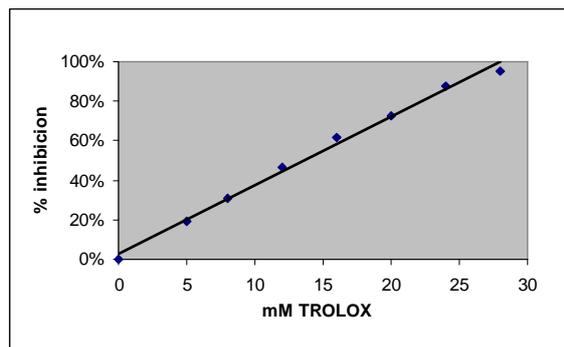


Figura 26. Recta patrón de TROLOX.

### 3.3.1.3. Determinación de Polifenoles Totales

**Fundamento teórico:** La cantidad total de polifenoles en plasma se determinó de acuerdo con el procedimiento de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton (Singleton and Esau, 1969) basado en la importante capacidad de oxidación que poseen los polifenoles y su posible cuantificación a pH básicos (en torno a 10). De esta forma, los polifenoles presentes en plasma son oxidados por el reactivo de Folin-Ciocalteu formándose un compuesto que presenta un máximo de absorción a 750 nm. La medida espectrofotométrica a esa longitud de onda es proporcional a la concentración de polifenoles presentes en la muestra.

**Reactivos:** Acido metafosfórico ( $\text{HPO}_3$ ) 33,5-36,5% fue de Fluka, el reactivo de Folin-Ciocalteu, el carbonato sódico anhidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) y el ácido gálico fueron adquiridos en Panreac.

**Metodología:** Para las determinaciones se centrifugaron 300  $\mu\text{L}$  de plasma a 12.000 g durante 5 minutos. A continuación, a 250  $\mu\text{L}$  de sobrenadante se le añadieron 50  $\mu\text{L}$  de una solución de ácido metafosfórico 1,32 M preparado *in situ*, y se centrifugó a 2.700 g durante 3 minutos, precipitándose las proteínas que posteriormente pudieran interferir en el análisis. A 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ, se le añadieron 500  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:10 y 400  $\mu\text{L}$  de una solución de carbonato de sodio al 7,5%, dejándolo incubar a temperatura ambiente durante 40 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se midió la absorbancia a 750 nm, empleando como blanco 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ. Los cálculos se realizaron a partir de la recta patrón de ácido gálico realizada en paralelo exactamente en las mismas condiciones experimentales (Figura 27).

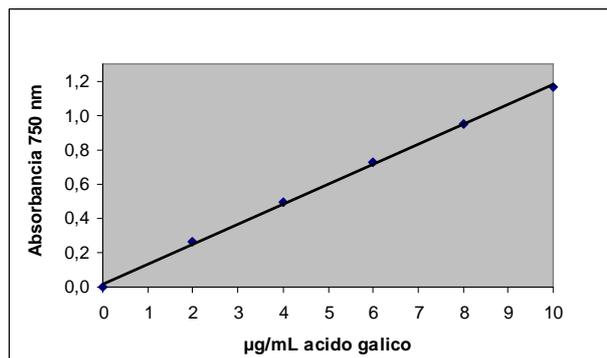


Figura 27. Recta patrón de ácido gálico.

### 3.3.2. Determinación de nitrato y nitrito

**Fundamento teórico:** Los nitritos y nitratos presentes en plasma se cuantificaron según el procedimiento descrito por Moshage (Moshage et al., 1995), basado en la determinación colorimétrica de los nitritos con el reactivo de Griess, antes y después de la conversión del nitrato a nitrito por la nitrato reductasa de *Aspergillus*. Puesto que la nitrato reductasa requiere FAD y NADPH para funcionar, el exceso de NADPH, que interfiere con el color posterior, se elimina con la enzima lactato deshidrogenasa que lo utiliza para la conversión del piruvato a lactato. El nitrito reacciona con ácido sulfanílico y naftilamina (componentes del reactivo de Griess) en medio ácido, formando un compuesto diazónico (p-sulfobenceno-azo- $\alpha$ -naftil-amina) con una máxima de absorción a 540 nm y un coeficiente de extinción de  $39,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

**Reactivos:** Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), hidróxido potásico (KOH), nitrito sódico ( $\text{NaNO}_2$ ), sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) y piruvato sódico ( $\text{NaC}_3\text{H}_3\text{O}_3$ ) fueron de Panreac; hidróxido sódico (NaOH), nitrato sódico ( $\text{NaNO}_3$ ), sulfanilamida (cristalina), N-(1-naftil) etilendiamina, FAD (flavin adenin dinucleótido, sal disódica), NADPH ( $\beta$ -nicotinamin adenin dinucleótido fosfato, forma reducida, sal tetrasódica) y ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) fueron de Sigma-Aldrich; lactato deshidrogenasa (de músculo de conejo; 142 U/mg de proteína) fue adquirida en Fluka y nitrato reductasa (de *Aspergillus spp*, cristalina; 10 U/mg de proteína) fue de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). Para la preparación del reactivo de Griess se partió de la solución A (2 g/L de sulfanilamida en 50 g/L de ácido fosfórico) y de la solución B (0,2 g/L de N-(1-naftil) etilendiamina). En el momento de su utilización se mezclan ambas soluciones en partes iguales

obteniéndose una concentración final de 1 g/L de sulfanilamida, 0,1 g/L de N-(1-naftil) etilendiamina y 25 g/L de ácido fosfórico.

**Metodología:** Para las determinaciones, 300  $\mu\text{L}$  de plasma se incubaron (volumen final de 510  $\mu\text{L}$ ) con 50  $\mu\text{L}$  de una solución de NADPH, 510  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 50 mM pH 7,5, 10  $\mu\text{L}$  de una solución de FAD 255  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato 50 mM pH 7,5 y 10  $\mu\text{L}$  de nitrato reductasa (10 mg/mL en tampón fosfato 50 mM pH 7,5), completando con el mismo tampón hasta alcanzar volumen final. Tras incubar las muestras durante 20 minutos a 37 °C, se añadieron 30  $\mu\text{L}$  de lactato deshidrogenasa (0,2 mg/mL en tampón fosfato potásico 0,15 M, pH 7,5) y 30  $\mu\text{L}$  de piruvato sódico 0,2 M, prosiguiéndose con la incubación otros 5 minutos a 37 °C para oxidar el NADPH. Finalmente, las muestras fueron desproteinizadas con 30  $\mu\text{L}$  de sulfato de zinc (300 g/L) y centrifugadas (15.000 g, 5 minutos) tras 15 minutos a 0-4 °C. 500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante se mezclaron en tubos eppendorf con 500  $\mu\text{L}$  del reactivo de Griess y, tras 15 minutos a temperatura ambiente, para el desarrollo del color, se determinó la absorbancia a 540 nm. Los valores de absorbancia así obtenidos representan la suma total de las contribuciones de nitrato y nitrito. Para la determinación de nitrito se procesaron paralelamente otras muestras, siguiendo exactamente el mismo procedimiento, pero omitiendo la adición de nitrato reductasa. La concentración de nitrato se obtuvo por sustracción de la concentración de nitrito de la total de nitrato + nitrito. Los resultados se expresaron en concentración de nitratos y nitritos para lo cual se realizaron ambas curvas de calibrado con tubos patrón que contenían cantidades conocidas de nitrito o nitrato (Figura 28).

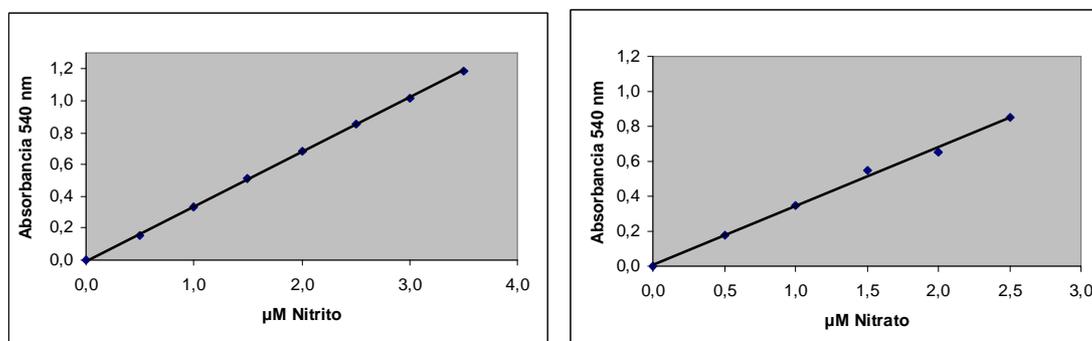


Figura 28. Rectas de calibrado de nitrito y nitrato.

### 3.3.3. Determinación de biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas

#### 3.3.3.1. Daño a oxidativo a Lípidos

##### 3.3.3.1.1. Determinación de Hidroperóxidos

**Fundamento teórico:** Para cuantificar la cantidad de Hidroperóxidos (ROOHs) en plasma se siguió el método colorimétrico de Nourooz-Zadeh (Nourooz-Zadeh et al., 1994). El procedimiento se basa en la oxidación del ión ferroso a férrico por hidroperóxidos lipídicos (ROOHs) en condiciones ácidas. Los iones férricos producidos en el ensayo se complejan con el indicador naranja de xilenol generando un cromóforo con un coeficiente de extinción a 560 nm de  $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . En muestras de plasma el procedimiento utiliza trifenilfosfina para obtener un control interno, ya que destruye los ROOHs presentes en plasma, señalando de esta manera la presencia de ión férrico no producido por los ROOHs. Por otra parte, el metanol/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  que se adiciona al medio desnaturaliza las proteínas facilitando el acceso de los ROOHs a los iones ferrosos, y el hidroxitolueno butilado funciona como antioxidante. El límite de detección del procedimiento es de, aproximadamente,  $1 \mu\text{M}$ .

**Reactivos:** Sulfato ferroso amónico ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y metanol (grado HPLC) fueron de Panreac; naranja de xilenol, hidroxitolueno butilado (BHT) y trifenilfosfina (TPP) fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Para la preparación de solución de FOX 2, se disolvieron 9,8 mg de sulfato ferroso amónico hexahidratado en 10 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  250 mM y la solución obtenida se mezcla con 90 mL de metanol (grado HPLC) conteniendo 79,2 mg de BHT. Finalmente, y bajo agitación, se añaden 7,6 mg de naranja de xilenol. Las concentraciones finales de todos los componentes en el reactivo son: sulfato ferroso amónico 20  $\mu\text{M}$ , naranja de xilenol 100  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25 mM y BHT 4 mM en 90% de metanol (v/v). Previamente a su uso se calibró su funcionamiento frente a soluciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de concentración conocida.

**Metodología:** Se transfirieron alícuotas de 90  $\mu\text{L}$  de plasma a tubos eppendorf que contenían 10  $\mu\text{L}$  de metanol o 10  $\mu\text{L}$  de TPP 10 mM en metanol (tubos control) y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de 900  $\mu\text{L}$  del

reactivo de FOX 2. Tras incubar otros 30 minutos a temperatura ambiente para el desarrollo de color, las muestras se centrifugaron a 15.000 g durante 10 minutos y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 560 nm. De acuerdo con el procedimiento utilizado, la absorbancia a utilizar para el cálculo de la concentración de ROOHs en las muestras de plasma se obtuvo por diferencia entre la media de los tubos experimentales y la de los controles tratados con TPP. Los cálculos se realizaron a partir de la recta patrón de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> realizada en paralelo exactamente en las mismas condiciones experimentales.

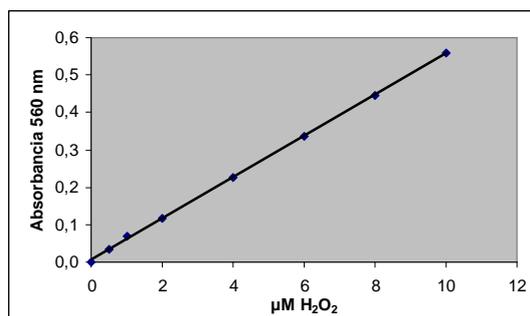


Figura 29. Recta patrón de peróxido de hidrógeno.

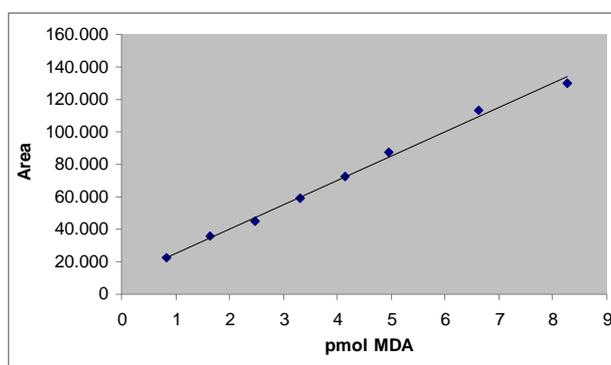
#### 3.3.3.1.2. Determinación de malondialdehído (MDA)

**Fundamento teórico:** Para cuantificar la cantidad de MDA se utilizó el método desarrollado recientemente por Grotto (Grotto et al., 2007) para su determinación por HPLC. El procedimiento se basa en la reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico (TBA) en medio ácido generando un complejo formado por condensación de dos moléculas de TBA y MDA y la posterior determinación del complejo por HPLC empleando un detector ultravioleta-visible. A pesar de que el TBA reacciona con una elevada variedad de compuestos, como azúcares, aminoácidos, bilirrubina y otra serie de aldehídos, la posterior determinación por HPLC proporciona al procedimiento una elevada especificidad. Por otra parte la etapa inicial de hidrólisis alcalina va a permitir determinar no sólo el MDA libre, sino también el unido a la matriz de otras moléculas.

**Reactivos:** n-Butanol, ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), fosfato dipotásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) fueron de Panreac; dodecil sulfato sódico (SDS) fue de Fluka; hidróxido sódico (NaOH) y metanol (pureza HPLC) fueron de Merck y ácido

tiobarbitúrico (TBA) y 1,1,3,3- tetrametoxipropano (TMP) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

**Metodología:** Se transfirieron alícuotas de 75  $\mu\text{L}$  de plasma a tubos eppendorf que contenían 25  $\mu\text{L}$  de agua milliQ y 25  $\mu\text{L}$  de NaOH 3M y se incubaron 30 minutos a 60  $^{\circ}\text{C}$  antes de la adición de 125  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 6% y 125  $\mu\text{L}$  de TBA al 0,8%, preparado in situ. Tras incubar 45 minutos a 90  $^{\circ}\text{C}$ , se enfrió la mezcla y se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de una solución de SDS al 10% y se extrajo con 300  $\mu\text{L}$  de n-butanol. Tras agitar y centrifugar a 3.000 g durante 10 minutos, se procedieron a inyectar 50  $\mu\text{L}$  de la fase superior al equipo HPLC para su posterior determinación. En la determinación cromatográfica (HPLC) del MDA se utilizó una columna ODS 5  $\mu\text{m}$  de dimensiones 0,46\*25 cm. Se aplicó un flujo isocrático de 1 mL/min con una fase móvil formada por tampón fosfato potásico 50 mM pH 6,8 y metanol al 35% y un detector ultravioleta visible a una  $\lambda$  de 532 nm. Los compuestos a estudiar se identificaron por su tiempo de retención y el área del pico obtenido fue directamente proporcional a la concentración de MDA en la muestra que se calculó por interpolación en la recta de regresión de las curvas de calibrado obtenida con los tubos patrón de TMP que contenían cantidades conocidas y se realizadas en igual condiciones (Figura 30). Para la determinación de MDA en linfocitos, se procedió a lisar las células sonicando tres veces durante 5 segundos con una potencia de 4 w. Del resultante se tomaron 75  $\mu\text{L}$  para realizar la determinación, siguiendo el mismo procedimiento que el descrito para las muestras de plasma.



**Figura 30.** Recta patrón de malondialdehído.

### 3.3.3.2. Daño a oxidativo a Proteínas. Determinación de grupos carbonilo

**Fundamento teórico:** El procedimiento utilizado, desarrollado por Levine (Levine et al., 1990), se basa en la reacción equimolar de los grupos carbonilo con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) en condiciones ácidas. La DNFH unida a proteínas se cuantifica espectrofotométricamente ( $\epsilon = 21 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) tras la separación de las proteínas derivatizadas por precipitación con ácido, lavado y posterior solubilización con guanidina.

**Reactivos:** Fosfato monosódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y guanidina (clorhidrato) fueron de Sigma-Aldrich; ácido clorhídrico fue de Merck; acetato de etilo, ácido trifluoroacético y 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) fueron adquiridos en Fluka y etanol y ácido tricloroacético (TCA) fueron suministrados por Panreac.

**Metodología:** Para las determinaciones, 15  $\mu\text{L}$  de plasma se mezclaron en tubos eppendorf con 500  $\mu\text{L}$  de DNFH al 0,2% (p/v) en ácido clorhídrico 2 N incubando la mezcla 1 hora a temperatura ambiente con agitación ocasional (vórtex). A continuación se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de TCA al 20% (p/v) y se dejó durante 15 minutos a 0-4 °C para permitir la precipitación de las proteínas, que se separaron por centrifugación (6.000 g, 3 minutos), descartándose el sobrenadante. Para eliminar el exceso de reactivo libre, se lavó el precipitado tres veces con 1 mL de una mezcla de etanol: acetato de etilo (1:1), dejando 10 minutos antes de recuperar el precipitado por centrifugación (6.000 g, 3 minutos), y despreciándose cada vez el sobrenadante. Finalmente, la proteína se redisolvió mediante agitación en 1 mL de una solución guanidina 6 M pH 2,3 en tampón fosfato sódico 20 mM pH 6,5, ajustado con ácido trifluoroacético. Tras incubación a 37 °C durante 30 minutos, se determinó su absorción óptica a 373 nm frente a una solución de guanidina. Para cada muestra analizada se procesó en paralelo un blanco tratado exactamente en las mismas condiciones pero sin DNFH (sólo con ácido clorhídrico 2 N). Los cálculos del contenido de carbonilos para cada muestra se realizaron por diferencia de absorbancias entre el tubo experimental derivatizado con DNFH y su blanco correspondiente de HCl, y se expresaron como nmoles de grupos carbonilo/mg de proteína presente en el ensayo. Para la determinación de los grupos carbonilos en

linfocitos, se procedió a lisar las células sonicando tres veces durante 5 segundos con una potencia de 4 vatios. Del resultante se tomaron 50  $\mu\text{L}$  para realizar la determinación, siguiendo el mismo procedimiento que el descrito para las muestras de plasma.

### **3.3.4. Determinación del estado redox**

#### **3.3.4.1. Determinación de Glutation Reducido (GSH)**

**Fundamento teórico:** Para la determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH) se siguió el método de Brigelius (Brigelius et al., 1983), basado en la determinación espectrofotométrica de la conjugación del GSH con el cloro 2,4-dinitrobenceno (CDNB) ( $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Esta reacción está catalizada por la enzima glutatión-S-transferasa (GS-T). El GS-DNB formado absorbe a 340 nm de longitud de onda, siendo proporcional el cambio de extinción medido espectrofotométricamente a la cantidad de GSH presente en la muestra.

**Reactivos:** Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), fueron suministrados por Panreac; cloro 2,4-dinitrobenceno (CDNB) fue de Fluka; etanol puro fue de Merck; glutatión-S-transferasa (GS-T) de equine liver (25 U/mg de proteína) y ácido etilendiamino tetracético (EDTA) fue adquirido en Sigma-Aldrich.

**Metodología:** Para las determinaciones, 25  $\mu\text{L}$  de plasma se mezclaron con 750  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato potásico 0,1 M, EDTA 1 mM pH 7 y 10  $\mu\text{L}$  de CDNB 10 mM en etanol puro procediendo a determinar su valor de absorbancia. A continuación se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de glutatión-S-transferasa (1 mg/mL en tampón fosfato potásico 0,1 M, EDTA 1 mM pH 7), siguiendo la reacción espectrofotométricamente a 340 nm. La diferencia de absorbancia obtenida antes y después de añadir la enzima es proporcional a la cantidad de GSH presente en la muestra y se expresaron como  $\mu\text{moles/g}$  de hemoglobina presente en el ensayo. Para la determinación de GSH en linfocitos, se procedió a lisar las células sonicando tres veces durante 5 segundos con una potencia de 4 w. Del resultante se tomaron 25  $\mu\text{L}$  para realizar la determinación, siguiendo el mismo procedimiento que el descrito para las muestras de plasma.

### 3.3.4.2. Determinación de la actividad Tiorredoxina Reductasa (TrxR)

**Fundamento teórico:** El ensayo de la actividad de la tiorredoxina reductasa en plasma fue llevado a cabo usando una ligera modificación del método descrito por Holmgren y Bjornstedt (Holmgren and Bjornstedt, 1995). El procedimiento se basa en la catálisis llevada a cabo por el sistema tiorredoxina la cual reduce el grupo disulfuro de la insulina y cuyo producto es utilizado como sustrato de un ensayo acoplado para la determinación de la tiorredoxina reductasa. El consumo de NADPH necesario para la catálisis enzimática, que es cuantificado mediante disminución de absorbancia ( $\lambda = 412 \text{ nm}$ ), es proporcional a la actividad enzimática de la tiorredoxina reductasa.

**Reactivos:** Tampón HEPES, ácido etilendiamino tetracético (EDTA), NADPH ( $\beta$ -nicotinamin adenin dinucleótido fosfato, forma reducida, sal tetrasódica), guanidina (clorhidrato), albúmina de suero bovino (BSA), tiorredoxina de *E.coli* (3 U/mg de proteína), ácido 5,5' ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) y tiorredoxina reductasa de *E.coli* (25 U/mg de proteína) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich; insulina humana fue de Boehringer Mannheim y tampón Tris-HCl fue de Panreac. Para la preparación de la solución reactiva se mezclaron 200  $\mu\text{L}$  del tampón HEPES 1 M, pH 7,6 con 40  $\mu\text{L}$  de una solución de EDTA 0,2 M, 40  $\mu\text{L}$  de una solución NADPH con una concentración de 40 mg/mL y 500  $\mu\text{L}$  de insulina 10 mg/mL.

**Metodología:** Para las determinaciones, las muestras de plasma diluidas 1:1 con agua milliQ se mezclaron con 40  $\mu\text{L}$  de la solución reactiva, manteniendo los eppendorf en hielo. A continuación se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de una solución 60  $\mu\text{M}$  de tiorredoxina de *E.coli*, completando con agua milliQ hasta un volumen final de 120  $\mu\text{L}$  e incubando durante 20 minutos a 37 °C. Tras añadir 750  $\mu\text{L}$  de una solución que para la reacción, formada por DTNB 0,4 mg/mL y guanidina 6 M en Tris-HCl 0,2 M, pH 8, se determina la absorbancia a 412 nm. Como blanco se realiza la reacción en ausencia de tiorredoxina, sustrato de la reacción. Para el cálculo de las concentraciones de tiorredoxina reductasa (mU/mL), se realizó en las mismas condiciones experimentales una recta patrón (Figura 31), para lo que se prepararon soluciones a diferentes concentraciones de tiorredoxina reductasa procedente de

*E.coli* en Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y EDTA 1 mM con BSA en una concentración de 100 µg/mL.

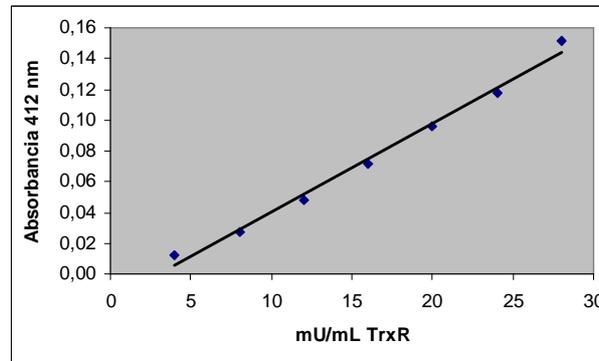


Figura 31. Recta patrón de tiorredoxina reductasa.

### 3.3.4.3. Determinación de la concentración de Tiorredoxina (Trx)

**Fundamento teórico:** Para la determinación de la concentración de tiorredoxina se empleó un kit de ELISA, basado en el procedimiento desarrollado por Kogaki (Kogaki et al., 1996) y Nakamura (Nakamura et al., 1996), el cual emplea dos diferentes anticuerpos monoclonales contra dos diferentes epitopos de la tiorredoxina humana. Por otra parte, estos anticuerpos no son capaces de reconocer la tiorredoxina mitocondrial (TRx2) ni la tiorredoxina de origen no humana, lo que por tanto les confiere una muy alta especificidad.

**Reactivos:** Kit de ELISA para la determinación de tiorredoxina humana fue adquirido en Ebisu Build, Shimotsutsumi-cho, Kawabata Marutamachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8396, Japan.

**Metodología:** Para las determinaciones, se añadieron en los pocillos cubiertos con el anti-anticuerpo monoclonal de tiorredoxina humana 220 µL por pocillo de muestra de plasma o bien 220 µL de los estándares proporcionados en el kit diluidos 1:10, dejando el micro plato en incubación durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras realizar un primer lavado con 300 µL/pocillo de solución, se añadieron 200 µL/pocillo de una solución compuesta por peroxidasa conjugada con anti-anticuerpos monoclonales de tiorredoxina humana y se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras llevar a cabo un segundo lavado se añadieron 100 µL/pocillo de una solución de reacción formada por el sustrato de la peroxidasa

unido a un cromóforo que permitirá el posterior desarrollo de color. Trascurridos 30 minutos de incubación a temperatura ambiente se añadieron 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de solución de parada que además de finalizar la reacción enzimática permitió estabilizar el desarrollo de color.

Por último se procedió a la lectura del micro plato a una densidad óptica de 450 nm, obteniendo la concentración de tiorredoxina en ng/mL presente en plasma por interpolación con el resultado de la curva patrón obtenido a partir de los estándares de reacción (Figura 32).

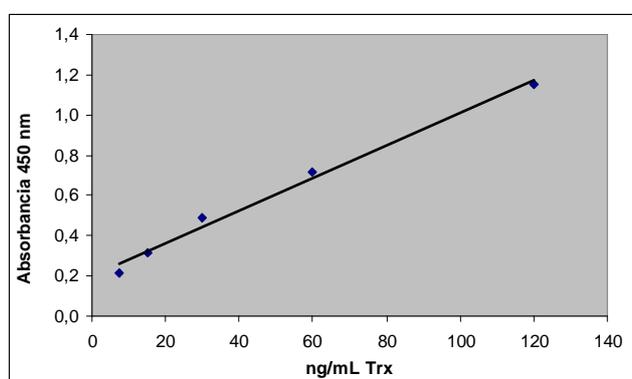


Figura 32. Recta patrón de tiorredoxina.

### 3.3.5. Otras determinaciones

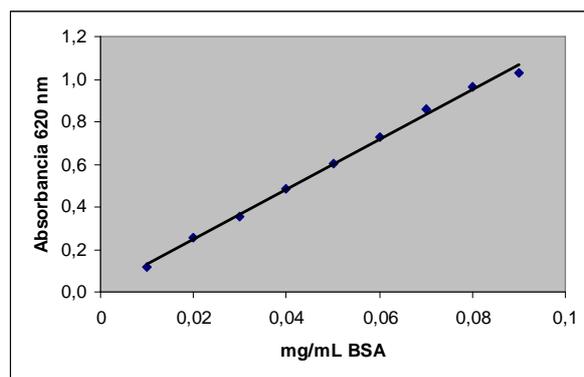
#### 3.3.5.1. Determinación de Proteínas en plasma y en linfocitos

**Fundamento teórico:** La determinación de la concentración de proteínas existentes en las muestras de plasma se realizó por el procedimiento de Lowry y cols (Lowry et al., 1951). El método se basa en la propiedad que presentan los compuesto con enlaces peptídicos de reaccionar en medio alcalino con sales de cobre para dar un coloración violeta (reactivo de Biuret), en una primera reacción. En una segunda reacción, el reactivo de Folin para fenoles (restos de tirosina y triptófano) permite incrementar la sensibilidad del procedimiento.

**Reactivos:** Sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) fue suministrado por Probus. El carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) y tartrato sodio-potasio ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ ) fueron suministrados por Panreac. Albúmina de suero bovino (BSA) y el reactivo de Folin-Ciocalteu fueron suministrados por Sigma-Aldrich. El Reactivo A se compuso de 1 mL de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 3% en

NaOH 0,1 M, 1 mL de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 2% y 98 mL de una solución de tartrato Na-K al 4%. Asimismo, el Reactivo B se formó mediante dilución 1:1 del reactivo Folin-Ciocalteu.

**Metodología:** Para las determinaciones, se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de una muestra de plasma diluida en agua milliQ 1:4, 490  $\mu\text{L}$  de agua milliQ y 2,5 mL del reactivo A. Tras incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente se añadieron 250  $\mu\text{L}$  del reactivo B dejándolo reposar nuevamente durante 10 minutos, al final de los cuales se determinó la absorbancia a 620 nm. La concentración de proteínas, expresado en mg/mL de BSA, se realizó por interpolación de las absorbancias en una curva patrón realizada con muestras a diferentes concentraciones de BSA (seroalbúmina bovina), tal y como muestra la figura 33.



**Figura 33.** Recta patrón para cuantificar proteínas.

Para la determinación de proteínas en linfocitos, se procedió a lisar las células sonicando tres veces durante 5 segundos con una potencia de 4 vatios. Del resultante se tomaron 25  $\mu\text{L}$  para realizar la determinación, siguiendo el mismo procedimiento que el descrito para las muestras de plasma.

### **3.3.5.2. Determinaciones del laboratorio clínico de referencia**

A lo largo del presente estudio además se emplearon resultados de una serie de parámetros clínicos cuyas medidas se realizaron en el Servicio de Análisis Clínicos del Complejo Asistencial de Burgos.

### **3.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

Los resultados de este trabajo han sido procesados con el paquete estadístico de Stat Graphics. Se llevaron a cabo análisis comparativos ANOVA, y t de Student con el fin de determinar las diferencias significativas entre las muestras a un nivel de significación de  $\alpha=0,05$ .

Los resultados obtenidos de la medición de los distintos parámetros en las diferentes poblaciones se resumen en las tablas y/o en los gráficos que se presentan en el apartado de Resultados. Los datos recogidos en las tablas corresponden al valor promedio  $\pm$  su desviación estándar. Las letras minúsculas y símbolos del test de ANOVA en forma de superíndices se incluyen en las tablas y los gráficos. Dichas letras indican los resultados del test después de realizar una comparación múltiple de las medias de los tres valores ensayados en una misma muestra para una variable determinada. Si dichos superíndices son distintos para una misma columna en caso de las tablas y en el caso de los gráficos para una misma serie de columnas, los valores correspondientes serán estadísticamente diferentes entre sí a un nivel de significación de  $p<0,05$ . La secuencia en orden alfabético de letras como superíndice corresponde al ordenamiento de menor a mayor del valor promedio de las muestras.

Los símbolos (\*) indican los resultados de t de Student. Así, (\*), (\*\*) o (\*\*\*) indican diferencias significativas a niveles de  $p<0,05$ ,  $p<0,005$  o bien  $p<0,0005$ , respectivamente.

Para el análisis de las correlaciones entre las variables estudiadas se aplicaron los contrastes de Pearson, Student y Snedecor a un nivel de significación de  $p<0,05$ .

## ***RESULTADOS***



## 4. RESULTADOS

### 4.1. ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS INICIALES DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES Y SUJETOS CONTROL

En la primera etapa del estudio se han establecido las características iniciales de la población con cáncer colorrectal (CCR) y se comparó con un grupo control de individuos sanos.

En la Tabla II se resumen las diferentes variables características de las muestras correspondientes al grupo control, que tiene un tamaño muestral de 71 sujetos con una media de 55 años de edad. Debido a los requisitos básicos establecidos para realizar la donación voluntaria de sangre en cuanto a edad y a patologías de base, los individuos control no poseen enfermedad alguna, salvo un tercio de sujetos que presenta algún tipo de lipidemias, alteración que no afecta al manejo de los resultados de las mediciones realizadas en el estudio. En cuanto a parámetros analíticos, sólo se ha obtenido el resultado correspondiente a hemoglobina y proteínas totales, con un promedio dentro de los valores de referencia.

**Tabla II.** Características poblacionales del grupo control.

PARÁMETRO	CONTROL
Tamaño muestra	71
Edad (años)	55 ± 3
Sexo	51 H/ 20 M
Hipertensión	0%
EPOC	0%
Diabetes	0%
Lipidemias	32%
Parámetros analíticos	
Hemoglobina (g/dL)	15,2 ± 1,1
Proteínas totales (g/dL)	7,4 ± 0,4

En la Tabla III se resumen las características de la población con CCR, con un tamaño muestral de 85 pacientes y una media de edad de 66 años cuya desviación estándar es de ± 10 años, aproximándose a la edad media del grupo control. La composición por sexos de ambos grupos también es similar (72% hombres en CCR frente a un 77% de hombres en el grupo control).

Tabla III. Características poblacionales del grupo de enfermos con CCR.

PARÁMETRO	CCR
Tamaño muestra	85
Edad (años)	66 ± 10
Sexo	61 H/ 24 M
PS-ECOG	
0	34%
1	62%
2	2%
3	1%
Hipertensión	39%
EPOC	4%
Diabetes	19%
Lipidemias	27%
Otras neoplasias anteriores	9%
Estadio	
II	12%
III	32%
IV	56%
Grado de diferenciación	
Pobremente diferenciado	11%
Moderadamente diferenciado	80%
Altamente diferenciado	9%
Metástasis	
Hepáticas	33%
No hepáticas	31%
Hepáticas y otras	35%
Parámetros analíticos	
Leucocitos (mill/mm <sup>3</sup> )	6,3 ± 2,6
Hemoglobina (g/dL)	12,2 ± 1,6
Creatinina (mg/dL)	0,9 ± 0,4
Bilirrubina total (mg/dL)	0,8 ± 1,1
Proteínas totales (g/dL)	7,0 ± 0,7
Fosfatasa Alcalina (UI/L)	131 ± 162
Lactato Deshidrogenasa (UI/L)	450 ± 493
Marcadores Tumorales	
CEA (ng/mL)	72 ± 184
Ca 19.9 (UI/L)	251 ± 898
Tratamiento quirúrgico previo	93%
Tratamiento radioterápico previo	11%
Tratamiento quimioterápico previo	32%
Tratamiento quimioterápico actual	
Sin tratamiento	15
Tratamiento	70
Tipo 1	47%
Tipo 2	37%
Tipo 3	16%

A diferencia del grupo control, tan sólo el 16% de la población con CCR no tiene ninguna patología acompañando al proceso carcinogénico. Entre estas enfermedades destaca la hipertensión arterial (HTA) (39%), seguida de lipidemias (27%) y de diabetes (19%). Por otra parte, el 9% de los pacientes estudiados ya habían desarrollado anteriormente algún proceso tumoral, sin relación alguna con el cáncer colorrectal actual.

En cuanto al estadio, algo más de la mitad de los enfermos (56%) se encuentran en un estado avanzado de la enfermedad, con algún tipo de metástasis (33% hepáticas, 31% no hepáticas y 35% hepáticas y otras). Cabe destacar que el 80% de los carcinomas estudiados corresponden a un grado de diferenciación moderado.

El valor promedio de los parámetros analíticos (leucocitos, creatinina, bilirrubina total y proteínas totales) se encuentra dentro de los límites marcados por el laboratorio de referencia, salvo en el caso de la hemoglobina, cuyo valor es ligeramente inferior al referenciado. Respecto a los valores promedio de las enzimas plasmáticas, fosfatasa alcalina y lactato deshidrogenasa, destacar que los resultados presentan una dispersión muy elevada, con una desviación estándar superior al 100% del valor promedio. Esto también ocurre con el valor promedio de los marcadores tumorales CEA y Ca 19.9, valores que además se encuentran muy por encima de los límites de referencia.

Por otra parte, la mayoría de los pacientes (93%) han sido sometidos a algún tipo de tratamiento quirúrgico previo relacionado con el proceso cancerígeno, y sólo en un 11% de los casos han recibido radioterapia concomitante con el tratamiento quimioterápico.

En cuanto al tratamiento quimioterápico, del grupo total, 15 pacientes (18%) no habían comenzado el tratamiento quimioterápico o bien lo habían finalizado por lo menos 6 meses antes de la toma de muestra. Los pacientes restantes, que representan el 82% de la población estudiada, estaban recibiendo algún tipo de tratamiento quimioterápico en el momento de la toma de muestra, agrupados según descrito en el apartado de Material y Métodos.

El 47% de los pacientes tratados recibieron algún tipo de fluoropirimidina (5-FU o capecitabina) sola (7%) o bien junto a oxaliplatino o irinotecan (40%). En el 37% de los pacientes, junto con la fluoropirimidina y el oxaliplatino o irinotecan se les administró algún tipo de anticuerpo monoclonal (bevacizumab, cetuximab o panitumumab). Un 16% de los pacientes recibieron otro tipo de tratamiento.

Por otro parte, se ha contado con un pequeño grupo de población con cáncer gástrico (CG) y otra población de sujetos con linfoma (L), que nos ha permitido realizar una aproximación al estudio comparativo del estrés oxidativo en los tres tipos de enfermedad.

Respecto a la población con cáncer gástrico (Tabla IV), está compuesta por 12 sujetos, 7 hombres y 5 mujeres con un promedio de edad de 69 años. Como patología de base cabe destacar la hipertensión, presente en un 42% de los individuos que componen la población estudio. El 17% de los pacientes habían padecido algún tipo de neoplasia anterior, no relacionada con el proceso actual. Prácticamente el total de los enfermos (92%) presenta la enfermedad en un estadio IV, y con un grado de diferenciación pobre y moderado (55% y 45% respectivamente). Los valores promedio de los parámetros analíticos estudiados se encuentran dentro de los límites marcados según laboratorio de referencia, menos la hemoglobina, ligeramente inferior al valor marcado. Al igual que en la población con CCR, los valores de tanto las enzimas plasmáticas como de los marcadores tumorales presentan una elevada dispersión, mucho más acusado en el caso de los marcadores tumorales, con una desviación estándar por encima del 100% del valor promedio. Además, destacar que el valor promedio de la lactato deshidrogenasa, del marcador CEA y del Ca 19.9 se encuentran fuera de los límites de referencia.

**Tabla IV.** Características poblacionales del grupo enfermos con CG.

<b>PARÁMETRO</b>	<b>CG</b>
Tamaño muestra	12
Edad (años)	69 ± 9
Sexo	7 H/ 5 M
<b>PS-ECOG</b>	
0	8%
1	75%
2	17%
Hipertensión	42%
EPOC	8%
Diabetes	8%
Lipidemias	0%
Otras neoplasias anteriores	17%
<b>Estadío</b>	
II	8%
III	--
IV	92%
<b>Grado de diferenciación</b>	
Pobrementemente diferenciado	55%
Moderadamente diferenciado	45%
Altamente diferenciado	--
Metástasis	92%
<b>Parámetros analíticos</b>	
Leucocitos (mill/mm <sup>3</sup> )	6,8 ± 5,1
Hemoglobina (g/dL)	11,2 ± 1,8
Creatinina (mg/dL)	0,9 ± 0,3
Bilirrubina total (mg/dL)	0,7 ± 0,3
Proteínas totales (g/dL)	6,8 ± 0,7
Fosfatasa Alcalina (UI/L)	128 ± 65
Lactato Deshidrogenasa (UI/L)	596 ± 426
<b>Marcadores Tumorales</b>	
CEA (ng/mL)	51 ± 111
Ca 19.9 (UI/L)	308 ± 907

Respecto a la población estudiada con linfoma, (Tabla V) está compuesta por 16 pacientes (6 hombres y 10 mujeres), con un promedio de edad de 59 años. El 69% de la población presenta hipertensión y sólo un 6% han desarrollado otro proceso neoplásico con anterioridad. El 69% de los pacientes presenta la enfermedad en un estadio inicial, mientras que el 13% de la población tiene desarrollada la enfermedad de forma más avanzada. Respecto a los parámetros analíticos destacar que los valores promedios, salvo la hemoglobina, ligeramente por debajo del valor de referencia, se encuentran dentro de los límites referenciados. En cuanto a las enzimas plasmáticas, la fosfatasa alcalina se encuentra dentro de los

valores de referencia, mientras que la lactato deshidrogenasa, con una dispersión muy elevada, presenta un valor promedio por encima del límite. Por otra parte, el promedio del marcador tumoral estudiado, Beta-2-microglobulina, presenta valores normales y la velocidad de sedimentación de la sangre es ligeramente superior al valor referenciado.

**Tabla V.** Características poblacionales del grupo de enfermos con linfoma.

<b>PARÁMETRO</b>	<b>LINFOMA</b>
Tamaño muestra	16
Edad (años)	59 ± 14
Sexo	6 H/ 10 M
<b>PS-ECOG</b>	
0	63%
1	19%
2	19%
Hipertensión	69%
EPOC	6%
Diabetes	--
Otras neoplasias anteriores	6%
<b>Estadío</b>	
I	69%
II	6%
III	13%
IV	13%
<b>Parámetros analíticos</b>	
Leucocitos (mill/mm <sup>3</sup> )	6,6 ± 2,4
Hemoglobina (g/dL)	12,0 ± 2,5
Creatinina (mg/dL)	0,8 ± 0,2
Bilirrubina total (mg/dL)	0,9 ± 0,3
Proteínas totales (g/dL)	7,2 ± 0,9
Fosfatasa Alcalina (UI/L)	95 ± 35
Lactato Deshidrogenasa (UI/L)	576 ± 552
<b>Marcadores Tumorales</b>	
Beta-2 microglobulina (µg/L)	2.008 ± 477
VSG (mm/hr)	20 ± 13

## 4.2. ESTUDIO COMPARATIVO DEL ESTADO OXIDATIVO SEGÚN EL TIPO DE CÁNCER

En una primera aproximación al estudio del estrés oxidativo en pacientes con cáncer, se ha comparado el resultado promedio de los diferentes parámetros medidos en los grupos de población estudiados, grupo control, pacientes con cáncer colorrectal, con cáncer gástrico y con linfoma.

Los parámetros medidos, descritos en el apartado de material y métodos, responden al análisis del estrés oxidativo en las diferentes poblaciones objeto de estudio. Así, para realizar dicha valoración se ha dispuesto fundamentalmente de cuatro tipos de datos. Por un lado, los que indican el estado antioxidante, medido como capacidad antioxidante total del plasma, a través del método FRAP y ABTS y la cuantificación de los polifenoles. En segundo lugar, estaría la determinación de los niveles de nitrito y nitrato como indicadores de niveles de óxido nítrico. Continuando con el estudio, se encuentran los datos indicadores del daño oxidativo a lípidos y proteínas, enmarcando las determinaciones de diferentes biomarcadores (hidroperóxidos, MDA y grupos carbonilo), tanto en plasma como en linfocitos, en el caso del MDA y de los grupos carbonilo. Por último, se han englobado los parámetros relacionados con el estado redox, determinación de glutatión reducido, tanto en plasma como en linfocitos, y cuantificación del sistema tiorredoxina (tiorredoxina y tiorredoxina reductasa).

Los resultados obtenidos de la medición de los distintos parámetros en las diferentes poblaciones se resumen en las tablas y/o en los gráficos que se presentan a continuación.

### **4.2.1. Capacidad antioxidante total del plasma**

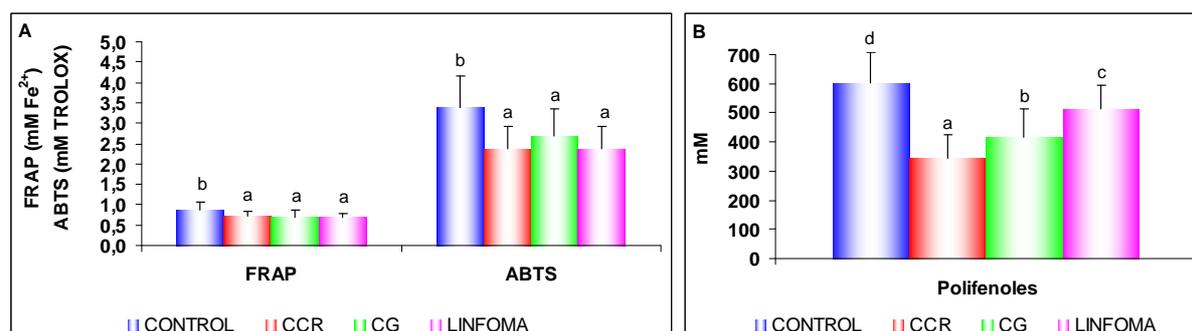
La Tabla VI y la Figura 34 recogen el valor promedio junto con la desviación estándar obtenidos de la determinación de los parámetros indicadores de la capacidad antioxidante total del plasma.

**Tabla VI.** Capacidad antioxidante total del plasma en una población con cáncer colorrectal, gástrico o linfoma respecto al grupo control.

	Control	CCR	CG	L
FRAP (mM Fe <sup>2+</sup> )	0,879 ± 0,197 <sup>b</sup>	0,718 ± 0,117 <sup>a</sup>	0,701 ± 0,166 <sup>a</sup>	0,684 ± 0,100 <sup>a</sup>
ABTS (mM TROLOX)	3,37 ± 0,789 <sup>b</sup>	2,38 ± 0,547 <sup>a</sup>	2,69 ± 0,654 <sup>a</sup>	2,38 ± 0,549 <sup>a</sup>
Polifenoles (mM)	603 ± 105 <sup>d</sup>	343 ± 81,4 <sup>a</sup>	418 ± 95,1 <sup>b</sup>	513 ± 81,1 <sup>c</sup>

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Los resultados muestran que la capacidad antioxidante del plasma es significativamente más alta en el grupo control que en los pacientes con enfermedad neoplásica. Así, el grupo control presenta un 22% más de capacidad antioxidante, según el método FRAP, y un 42% más, según ABTS, respecto a la población con CCR. Además, la población control tiene un 78% más de concentración de polifenoles comparado con los enfermos colorrectales.



**Figura 34.** Capacidad antioxidante total, medida mediante método FRAP y ABTS (A) y polifenoles (B) en una población con cáncer colorrectal, gástrico o linfoma respecto al grupo control. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Por otra parte, no se encuentran diferencias significativas entre los tres tipos de enfermedad, salvo en el caso de los polifenoles, donde se detectan niveles significativamente diferentes en cada uno de los grupos poblacionales estudiados.

#### 4.2.2. Biomarcadores de óxido nítrico en plasma

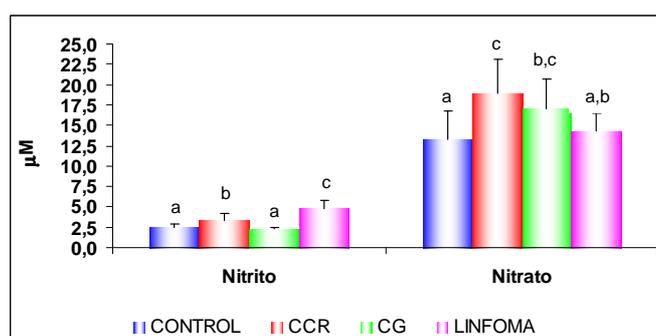
Los resultados de los niveles de nitrito y nitrato como indicadores de óxido nítrico en plasma se muestran en la Tabla VII y en la Figura 35. La población con cáncer colorrectal presenta unos valores promedio para el nitrito ( $3,38 \pm 0,840$ ) y el nitrato ( $18,9 \pm 4,22$ ) significativamente superiores a los encontrados en la población control ( $2,42 \pm 0,479$  y  $13,3 \pm 3,36$ , respectivamente).

**Tabla VII.** Concentración de indicadores de óxido nítrico en plasma en una población con cáncer colorrectal, gástrico o linfoma respecto al grupo control.

	Control	CCR	CG	L
Nitrito ( $\mu\text{M}$ )	$2,42 \pm 0,479^a$	$3,38 \pm 0,840^b$	$2,33 \pm 0,165^a$	$4,70 \pm 1,06^c$
Nitrato ( $\mu\text{M}$ )	$13,3 \pm 3,36^a$	$18,9 \pm 4,22^c$	$17,1 \pm 3,58^{b,c}$	$14,3 \pm 2,22^{a,b}$

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Con respecto a la población con cáncer gástrico y el resultado de la determinación del nitrito, destacar que no se detectan diferencias significativas con respecto al grupo control, pero sí con el resto de enfermos. En cuanto a la concentración de nitrato, sí presenta diferencias significativas con el grupo control, pero no con las otras dos poblaciones estudiadas.



**Figura 35.** Concentración de indicadores de óxido nítrico en plasma en una población con cáncer colorrectal, gástrico o linfoma respecto al grupo control. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

En relación a los pacientes con linfoma, en cuanto a la determinación del nivel de nitrito, sí se detectan diferencias significativas respecto a los otros dos tipos de cáncer estudiados así como con el grupo control, mientras que en el caso del nitrato, sólo se presentan éstas con el grupo de pacientes CCR.

#### 4.2.3. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas

##### a. Lípidos

Como parámetros indicativos del daño oxidativo a lípidos se han determinado los niveles de MDA en plasma y en linfocitos así como la concentración de hidroperóxidos en plasma.

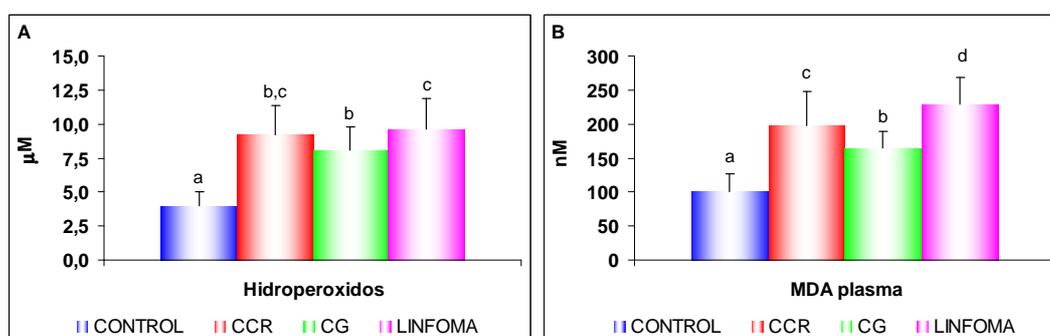
Los resultados en plasma muestran (Tabla VIII y Figura 36) que existe una diferencia significativa en cuanto a los niveles de hidroperóxidos y MDA, medidos en la población control con respecto a los tres grupos de enfermos. Así, el grupo con CCR con respecto a los sujetos control, posee un porcentaje de incremento en los niveles de hidroperóxidos de un 44% y de un 51% para el MDA y no muestra diferencias significativas con los otros dos grupos de población, en el caso de los hidroperóxidos pero sí con el resultado obtenido del MDA.

**Tabla VIII.** Concentración de indicadores del daño a lípidos medido en plasma en una población con cáncer colorrectal, gástrico o linfoma respecto al grupo control.

	Control	CCR	CG	L
Hidroperóxidos ( $\mu\text{M}$ )	$4,03 \pm 0,986^a$	$9,18 \pm 2,19^{b,c}$	$8,06 \pm 1,69^b$	$9,67 \pm 2,18^c$
MDA-plasma (nM)	$101 \pm 25,3^a$	$198 \pm 49,8^c$	$165 \pm 23,3^b$	$229 \pm 39,6^d$

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

En relación a los enfermos con cáncer gástrico y linfoma los resultados muestran que existe diferencia significativa entre ambos grupos de población, aunque los niveles promedio reflejan menor incremento que los detectados con respecto al grupo control.



**Figura 36.** Indicadores del daño a lípidos, mediante medida de concentración de hidroperóxidos (A) y MDA (B) medidos en plasma en una población con cáncer colorrectal, gástrico o linfoma respecto al grupo control. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

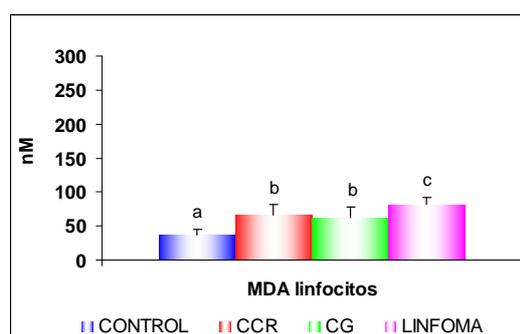
La determinación de MDA en linfocitos (Tabla IX y Figura 37), como biomarcador del daño oxidativo a lípidos, refleja diferencias significativas entre el control y los tres grupos de enfermos, no entre los pacientes con CCR y CG y sí entre el grupo con linfoma y las otras dos poblaciones con enfermedad tumoral. Asimismo, se detecta un incremento de un 56% en la población con cáncer colorrectal respecto a los valores del grupo control.

**Tabla IX.** Concentración de MDA como indicador del daño a lípidos medido en linfocitos en una población con cáncer colorrectal, gástrico o linfoma respecto al grupo control.

	Control	CCR	CG	L
MDA-linfocitos (nM)	36,6 ± 9,09 <sup>a</sup>	65,3 ± 16,3 <sup>b</sup>	62,7 ± 15,3 <sup>b</sup>	80,9 ± 11,4 <sup>c</sup>

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Estos resultados parecen indicar que el MDA, como biomarcador de daño a lípidos, presenta mayor sensibilidad en plasma que en linfocitos.



**Figura 37.** Concentración de indicadores del daño a lípidos medido en linfocitos en una población con cáncer colorrectal, gástrico o linfoma respecto al grupo control. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

### b. Proteínas

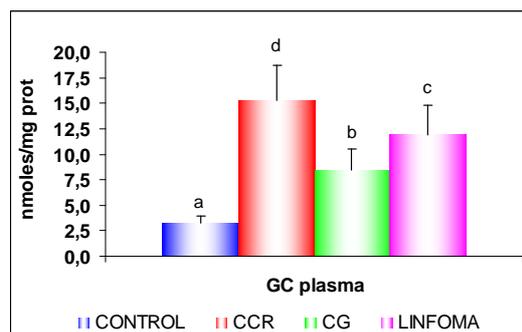
Como parámetros indicativos del daño oxidativo a proteínas se han determinado los niveles de grupos carbonilo (GC) en plasma y en linfocitos.

En el caso de la determinación en plasma (Tabla X y Figura 38), el resultado muestra diferencias significativas entre los cuatro grupos de población estudiados. Destacar que se detectan niveles de oxidación de las proteínas hasta 5 veces más en los pacientes con cáncer colorrectal que en el grupo control.

**Tabla X.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en plasma en una población con cáncer colorrectal, gástrico o linfoma respecto al grupo control.

	Control	CCR	CG	L
GC-plasma (nmoles/mg proteína)	3,18 ± 0,779 <sup>a</sup>	15,3 ± 3,42 <sup>d</sup>	8,50 ± 2,07 <sup>b</sup>	11,9 ± 2,89 <sup>c</sup>

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .



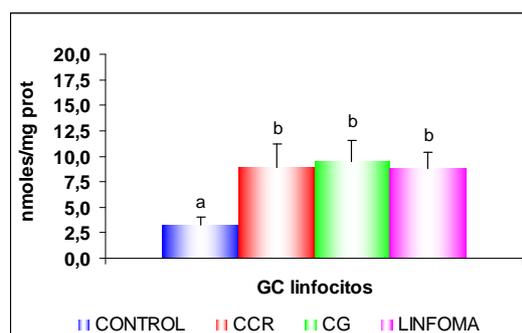
**Figura 38.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en plasma en una población con cáncer colorrectal, gástrico o linfoma respecto al grupo control. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Por otra parte, al igual que en los resultados del daño a lípidos, se detecta menor nivel de sensibilidad de este parámetro en linfocitos (Tabla XI y Figura 39) que en plasma, ya que sólo se encuentran diferencias significativas entre el grupo control y las poblaciones enfermas pero no entre ellas. Asimismo, el nivel de oxidación encontrado entre la población con CCR y el grupo control es algo menor (2,8 veces) que el detectado en las determinaciones realizadas en el plasma.

**Tabla XI.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en linfocitos en una población con cáncer colorrectal, gástrico o linfoma respecto al grupo control.

	Control	CCR	CG	L
GC-linfocitos (nmoles/mg proteína)	3,24 ± 0,819 <sup>a</sup>	8,92 ± 2,25 <sup>b</sup>	9,46 ± 2,14 <sup>b</sup>	8,76 ± 1,63 <sup>b</sup>

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .



**Figura 39.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en linfocitos en una población con cáncer colorrectal, gástrico o linfoma respecto al grupo control. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

#### 4.2.4. Estado Redox

Para el estudio del estado redox se midió la concentración del antioxidante no enzimático glutation (GSH) tanto en plasma como en linfocitos, así como del sistema tiorredoxina en plasma, formado por la tiorredoxina (Trx) y la enzima tiorredoxina reductasa (TrxR).

En la Tabla XII y en la figura adjunta (Figura 40) se resumen los resultados del estado redox en plasma.

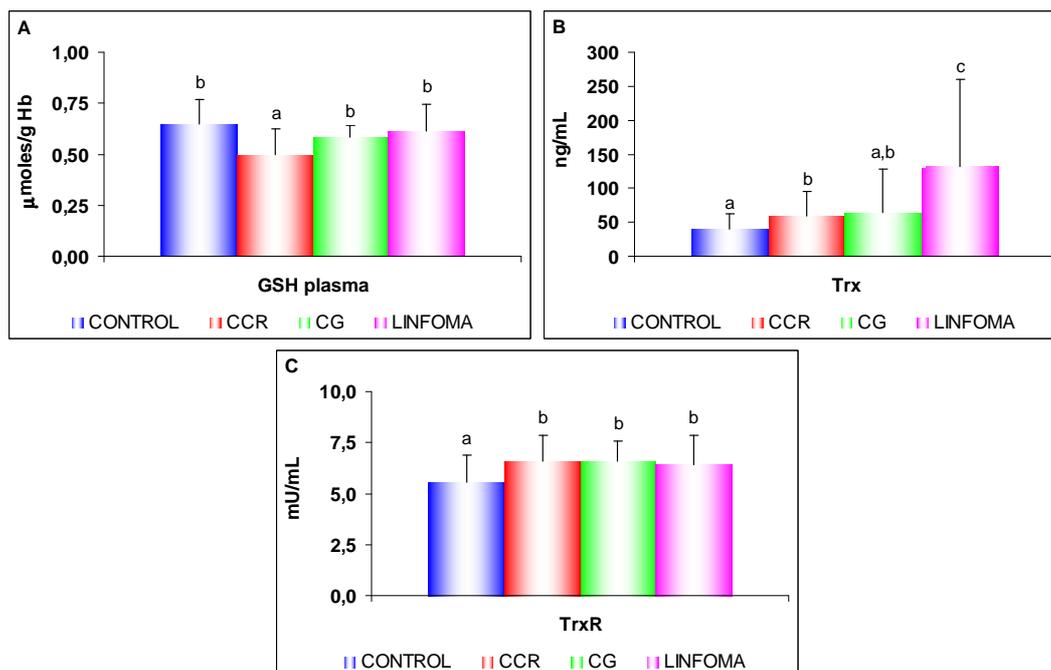
Así, en el caso del GSH sólo se detectan cambios significativos entre la población formada por los pacientes con CCR y el resto de grupos estudiados.

Sin embargo, la actividad tiorredoxina reductasa es significativamente menor en el grupo control respecto a los tres grupos de enfermos. Este mismo comportamiento se observa al analizar los resultados de medir la concentración de la tiorredoxina, detectándose diferencias significativas entre los grupos estudiados, salvo en el caso de la población con CG, que no muestra diferencias ni con el grupo control ni con el CCR.

**Tabla XII.** Estado redox medido en plasma en una población con cáncer colorrectal, gástrico o linfoma respecto al grupo control.

	Control	CCR	CG	L
GSH-plasma ( $\mu$ moles/g Hb)	0,649 $\pm$ 0,119 <sup>b</sup>	0,497 $\pm$ 0,126 <sup>a</sup>	0,582 $\pm$ 0,060 <sup>b</sup>	0,615 $\pm$ 0,129 <sup>b</sup>
Trx (ng/mL)	40,1 $\pm$ 22,0 <sup>a</sup>	59,1 $\pm$ 35,4 <sup>b</sup>	64,8 $\pm$ 63,4 <sup>a,b</sup>	131 $\pm$ 128 <sup>c</sup>
TrxR (mU/mL)	5,54 $\pm$ 1,36 <sup>a</sup>	6,61 $\pm$ 1,28 <sup>b</sup>	6,61 $\pm$ 0,974 <sup>b</sup>	6,44 $\pm$ 1,40 <sup>b</sup>

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .



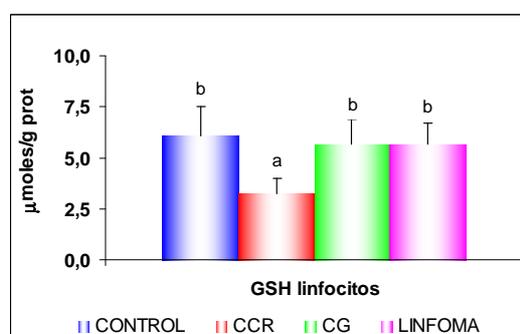
**Figura 40.** Estado redox medido en plasma mediante concentración de GSH (A), Trx (B) y actividad TrxR (C) en una población con cáncer colorrectal, gástrico o linfoma respecto al grupo control. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Respecto al resultado de las mediciones realizadas de GSH en linfocitos (Tabla XIII y Figura 41), al igual que ocurre en plasma, sólo se detectan cambios significativos entre la población formada por los pacientes con CCR y el resto de grupos estudiados.

**Tabla XIII.** Estado redox medido en linfocitos en una población con cáncer colorrectal, gástrico o linfoma respecto al grupo control.

	Control	CCR	CG	L
GSH-linfocitos ( $\mu\text{moles/g proteína}$ )	$6,04 \pm 1,46^b$	$3,23 \pm 0,778^a$	$5,65 \pm 1,24^b$	$5,65 \pm 1,07^b$

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .



**Figura 41.** Estado redox medido en linfocitos (concentración de GSH) en una población con cáncer colorrectal, gástrico o linfoma respecto al grupo control. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

### 4.3. ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL

Para el estudio del estrés oxidativo en pacientes con cáncer colorrectal, se ha contado con un total de 85 pacientes, los cuales han sido agrupados en base a diferentes criterios con objeto de conformar las distintas poblaciones permitiendo realizar un completo abordaje al estudio de la enfermedad respecto al estado de estrés oxidativo que presentan. Así, en un primer caso, se ha estudiado el estado oxidativo debido exclusivamente al proceso tumoral, para lo que se ha contado sólo con los enfermos de cáncer colorrectal que no han recibido ningún tipo de tratamiento quimioterápico o bien lo han finalizado por lo menos 6 meses antes de la toma de muestra para el estudio. En un segundo escenario, se ha analizado la relación existente entre el tratamiento quimioterápico y los niveles de estrés oxidativo presentes en esta población. A continuación y en tercer lugar, se ha estudiado el estado oxidativo en función de la presencia o no de metástasis, para por último, empleando el nivel de los marcadores tumorales CEA y Ca 19.9 como indicador de evolución de la enfermedad, se han analizado los niveles de estrés oxidativo presentes en las poblaciones estudiadas de acuerdo al valor de estos marcadores.

Para el desarrollo del estudio se han empleado los parámetros ya descritos en el apartado de material y métodos, los cuales agrupados en cuatro tipos de datos (capacidad antioxidante total del plasma, niveles de nitrito y nitrato, biomarcadores de daño oxidativo a lípidos y proteínas y estado redox), permiten responder al análisis del estrés oxidativo.

De igual forma que en el apartado anterior, los resultados obtenidos de la medición de los diferentes parámetros se recogen en tablas y/o gráficos donde también quedan reflejadas las diferentes significancias detectadas en base al tratamiento estadístico realizado posteriormente de los resultados obtenidos.

#### ***4.3.1. Estudio del estrés oxidativo asociado al cáncer colorrectal***

En un primer momento se ha hecho necesario conocer el nivel de estrés oxidativo asociado sólo y exclusivamente al proceso tumoral, y no el producido

además por otras causas, como pueden ser, fundamentalmente, los diferentes tratamientos quimioterápicos, ya que, tal y como se ha descrito en el apartado de revisión bibliográfica, muchos de los mecanismos de acción de este tipo de fármacos están mediados o bien causan directa o indirectamente alteraciones en los niveles de oxidación. Por tanto, en este estudio, se ha contemplado un grupo de pacientes con cáncer colorrectal, pero que todavía no han comenzado el tratamiento quimioterápico o bien lo han finalizado al menos 6 meses antes de la toma de muestra, comparando sus niveles de estrés respecto a un grupo de sujetos control. El análisis de estos resultados permitirá evaluar si el desarrollo de la enfermedad afecta a los niveles de estrés oxidativo.

#### 4.3.1.1. Capacidad antioxidante total del plasma

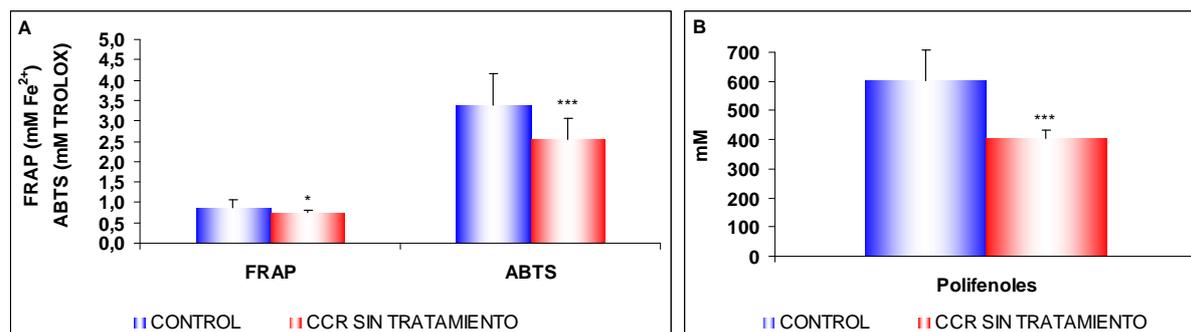
En la Tabla XIV y la Figura 42 se recogen el valor promedio obtenido de la determinación de los parámetros indicadores de la capacidad antioxidante total del plasma.

**Tabla XIV.** Capacidad antioxidante total del plasma en una población con cáncer colorrectal sin tratamiento respecto a grupo control.

	Control	CCR sin tratamiento	<i>p</i>
FRAP (mM Fe <sup>2+</sup> )	0,879 ± 0,197	0,748 ± 0,048	0,0129*
ABTS (mM TROLOX)	3,37 ± 0,789	2,56 ± 0,506	<0,0005***
Polifenoles (mM)	603 ± 105	404 ± 29,2	<0,0005***

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \* y \*\*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  y  $p < 0,0005$  respectivamente cuando se compara CCR sin tratamiento vs control.

Los resultados muestran que existe una capacidad antioxidante significativamente menor en la población con cáncer colorrectal respecto al grupo de sujetos control. Cuando se emplea para su determinación el método ABTS, esta diferencia se hace especialmente significativa ( $p < 0,0005$ ), siendo un 32% mayor en los sujetos control.



**Figura 42.** Capacidad antioxidante total del plasma mediante método FRAP y ABTS (A) y polifenoles (B) en una población con cáncer colorrectal sin tratamiento respecto a grupo control. \* y \*\*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  y  $p < 0,0005$  respectivamente.

#### 4.3.1.2. Biomarcadores de óxido nítrico en plasma

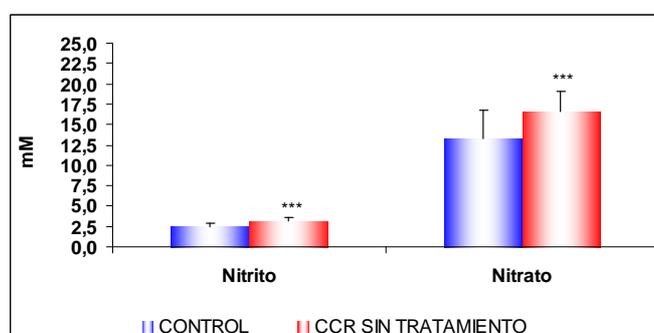
Los resultados de los niveles de nitrito y nitrato como indicadores de óxido nítrico en plasma se muestran en la Tabla XV y en la Figura 43.

**Tabla XV.** Concentración de indicadores de óxido nítrico en plasma en una población con cáncer colorrectal sin tratamiento respecto a grupo control.

	Control	CCR sin tratamiento	$p$
Nitrito ( $\mu\text{M}$ )	$2,42 \pm 0,479$	$3,16 \pm 0,522$	$<0,0005^{***}$
Nitrato ( $\mu\text{M}$ )	$13,3 \pm 3,36$	$16,7 \pm 2,47$	$<0,0005^{***}$

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$  cuando se compara CCR sin tratamiento vs control.

La población con cáncer colorrectal presenta unos valores promedio para el nitrito ( $3,16 \pm 0,522$ ) y el nitrato ( $16,7 \pm 2,47$ ) significativamente superiores ( $p < 0,0005$ ) a los encontrados en la población control ( $2,42 \pm 0,479$  y  $13,3 \pm 3,36$ , respectivamente).



**Figura 43.** Concentración de indicadores de óxido nítrico en plasma en una población con cáncer colorrectal sin tratamiento respecto a grupo control. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$ .

### 4.3.1.3. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas

#### a. Lípidos

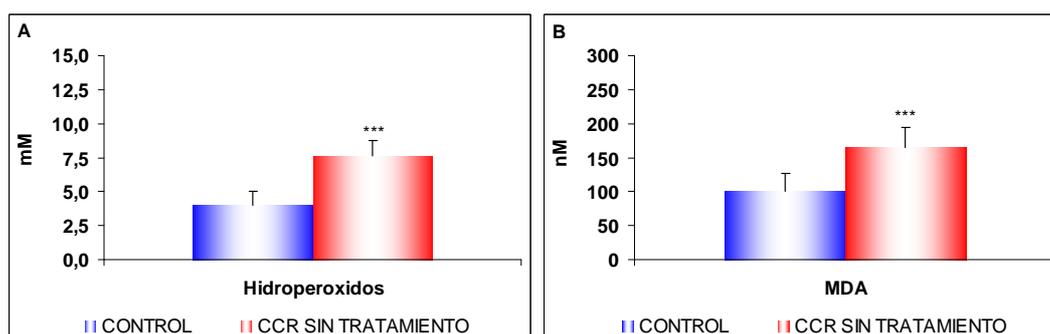
Como parámetros indicativos del daño oxidativo a lípidos se han determinado en plasma los niveles de MDA y la concentración de hidroperóxidos mientras que en linfocitos sólo se ha procedido a cuantificar el MDA.

Los resultados en plasma muestran (Tabla XVI y Figura 44) que existe una diferencia muy significativa ( $p < 0,0005$ ) en cuanto a los niveles de hidroperóxidos y MDA, medidos en el grupo con cáncer colorrectal respecto a la población control. Así, el grupo con CCR, posee un porcentaje de incremento en los niveles de hidroperóxidos de un 90% y de un 62% para el MDA, con respecto a los sujetos control.

**Tabla XVI.** Concentración de indicadores del daño a lípidos medido en plasma en una población con cáncer colorrectal sin tratamiento respecto a grupo control.

	Control	CCR sin tratamiento	$p$
Hidroperóxidos ( $\mu\text{M}$ )	$4,03 \pm 0,986$	$7,67 \pm 1,13$	$<0,0005^{***}$
MDA-plasma (nM)	$101 \pm 25,3$	$164 \pm 30$	$<0,0005^{***}$

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$  cuando se compara CCR sin tratamiento vs control.



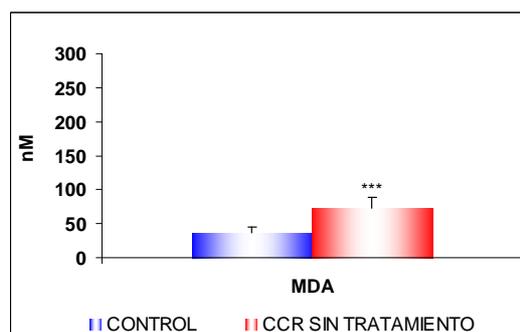
**Figura 44.** Indicadores del daño a lípidos, mediante medida de concentración de hidroperóxidos (A) y MDA (B) medidos en plasma en una población con cáncer colorrectal sin tratamiento respecto a grupo control. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$ .

La determinación de MDA en linfocitos (Tabla XVII y Figura 45), como biomarcador del daño oxidativo a lípidos, refleja diferencias altamente significativas ( $p < 0,0005$ ) entre los pacientes CCR sin tratamiento y el grupo control, con una concentración dos veces superior al grupo control.

**Tabla XVII.** Concentración de MDA como indicador del daño a lípidos medido en linfocitos en una población con cáncer colorrectal sin tratamiento respecto a grupo control.

	Control	CCR sin tratamiento	$p$
MDA-linfocitos (nM)	36,6 ± 9,09	72,5 ± 16,6	<0,0005***

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$  cuando se compara CCR sin tratamiento vs control.



**Figura 45.** Indicadores del daño a lípidos medidos en linfocitos en una población con cáncer colorrectal sin tratamiento respecto a grupo control. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$ .

### b. Proteínas

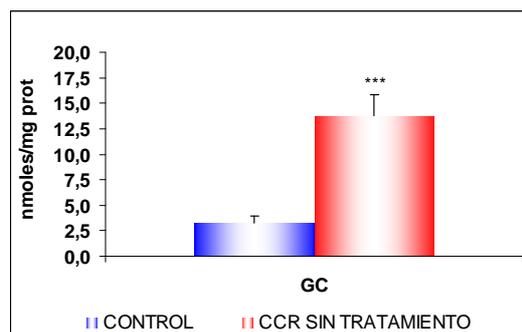
Como parámetros indicativos del daño oxidativo a proteínas se han determinado los niveles de grupos carbonilo (GC) en plasma y en linfocitos.

Tanto en el caso de la determinación en plasma (Tabla XVIII y Figura 46) como en linfocitos (Tabla XIX y Figura 47), los resultados muestran diferencias altamente significativas ( $p < 0,0005$ ) entre la población con cáncer colorrectal y el grupo control.

**Tabla XVIII.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en plasma en una población con cáncer colorrectal sin tratamiento respecto a grupo control.

	Control	CCR sin tratamiento	$p$
GC-plasma (nmoles/mg proteína)	3,18 ± 0,779	13,7 ± 2,02	<0,0005***

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$  cuando se compara CCR sin tratamiento vs control.

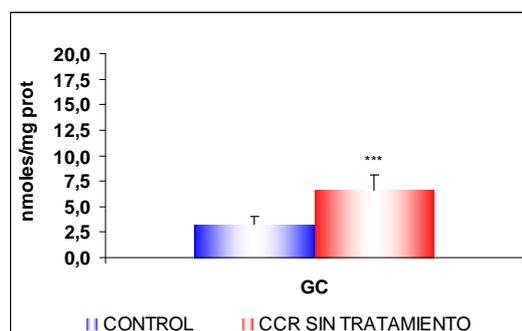


**Figura 46.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en plasma en una población con cáncer colorrectal sin tratamiento respecto a grupo control. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$ .

**Tabla XIX.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en linfocitos en una población con cáncer colorrectal sin tratamiento respecto a grupo control.

	Control	CCR sin tratamiento	$p$
GC-linfocitos (nmoles/mg proteína)	3,24 ± 0,819	6,60 ± 1,45	<0,0005***

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$  cuando se compara CCR sin tratamiento vs control.



**Figura 47.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en linfocitos en una población con cáncer colorrectal sin tratamiento respecto a grupo control. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$ .

Destacar que en el caso del plasma, la concentración de grupos carbonilo de la población con cáncer es cuatro veces superior al grupo control, y sólo 2 veces cuando la determinación se realiza en linfocitos.

#### 4.3.1.4. Estado Redox

Para el estudio del estado redox se midió la concentración del tripéptido glutation (GSH), tanto en plasma como en linfocitos, y de la tiorredoxina (Trx). Además, se estudió la actividad de la enzima tiorredoxina reductasa (TrxR).

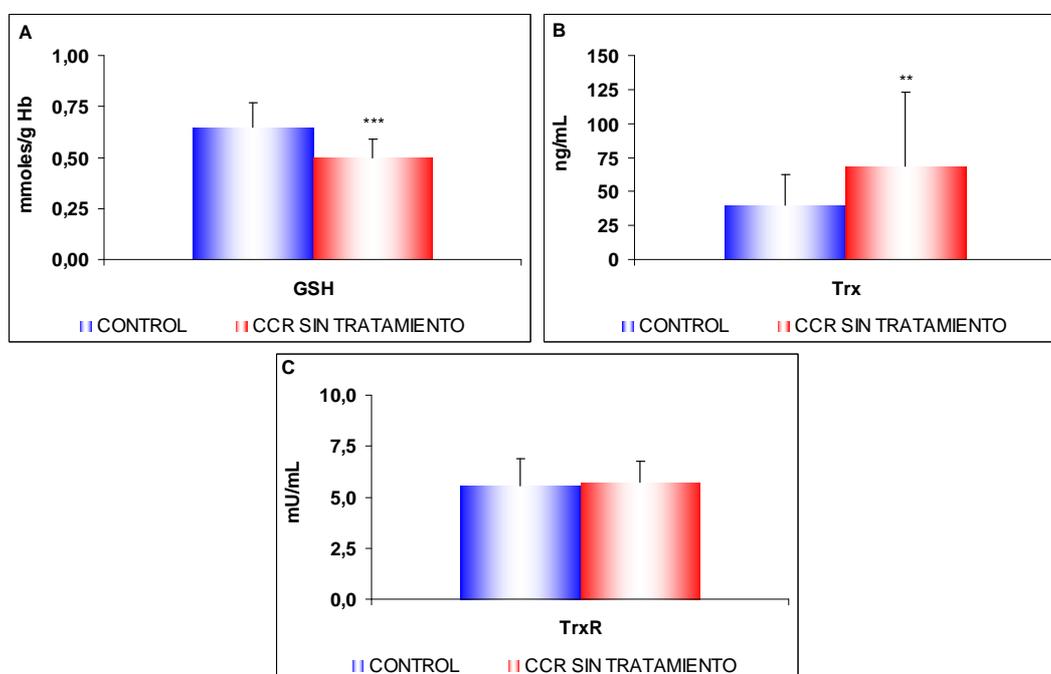
En la Tabla XX y en la figura adjunta (Figura 48) se resumen los resultados del estado redox en plasma. Así, en el caso del GSH se detectan cambios muy significativos ( $p < 0,0005$ ) entre los dos grupos estudiados ( $0,649 \pm 0,119$  y  $0,496 \pm 0,092$  en el grupo control y en la población con cáncer, respectivamente).

**Tabla XX.** Estado redox medido en plasma en una población con cáncer colorrectal sin tratamiento respecto a grupo control.

	Control	CCR sin tratamiento	<i>p</i>
GSH-plasma ( $\mu\text{moles/g Hb}$ )	$0,649 \pm 0,119$	$0,496 \pm 0,092$	$<0,0005^{***}$
Trx (ng/mL)	$40,1 \pm 22,0$	$68,70 \pm 54,5$	$0,0015^{**}$
TrxR (mU/mL)	$5,54 \pm 1,36$	$5,71 \pm 1,07$	$0,6567$

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. \*\* y \*\*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,005$  y  $p < 0,0005$  respectivamente cuando se compara CCR sin tratamiento vs control.

En cuanto al sistema tiorredoxina, no se encuentran diferencias significativas de la actividad de la enzima tiorredoxina reductasa en el grupo CCR respecto al grupo control, pero sí cuando el estudio se refiere a la concentración de tiorredoxina.



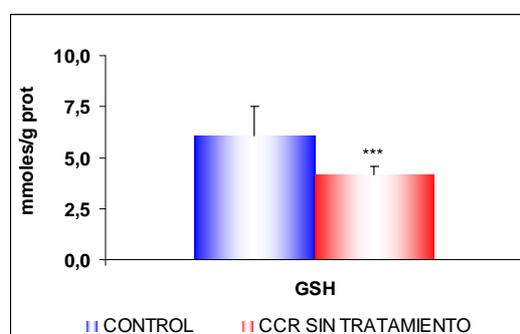
**Figura 48.** Estado redox medido en plasma mediante concentración de GSH (A), Trx (B) y actividad TrxR (C) en una población con cáncer colorrectal sin tratamiento respecto a grupo control. \*\* y \*\*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,005$  y  $p < 0,0005$  respectivamente.

Respecto al resultado de las mediciones realizadas de GSH en linfocitos (Tabla XXI y Figura 49), al igual que ocurre en plasma, se detectan cambios muy significativos ( $p < 0,0005$ ) entre la población formada por los pacientes con CCR con respecto al grupo control.

**Tabla XXI.** Estado redox medido en linfocitos en una población con cáncer colorrectal sin tratamiento respecto a grupo control.

	Control	CCR sin tratamiento	$p$
GSH-linfocitos ( $\mu\text{moles/g proteína}$ )	$6,04 \pm 1,46$	$4,15 \pm 0,401$	$<0,0005^{***}$

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$  cuando se compara CCR sin tratamiento vs control.



**Figura 49.** Estado redox medido en linfocitos en una población con cáncer colorrectal sin tratamiento respecto a grupo control. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$ .

#### **4.3.2. Estudio del estrés oxidativo asociado al tratamiento quimioterápico en pacientes con cáncer colorrectal**

Algunos de los fármacos o tratamientos antineoplásicos empleados en el cáncer colorrectal basan su mecanismo de acción en cambios en los niveles de oxidación provocando la puesta en marcha de diferentes procesos que desencadenan apoptosis o bien detienen la promoción y la progresión de la enfermedad carcinogénica. Por otra parte, otros fármacos, aunque su mecanismo de acción no está directamente vinculado a estrés oxidativo, de forma indirecta producen también cambios en el estado redox.

Por todo esto, se ha hecho necesario estudiar cómo afecta a los niveles de estrés oxidativo el tratamiento quimioterápico, así como comprobar si existen diferencias entre el empleo de un tipo de fármacos u otros.

#### 4.3.2.1. Estudio del estrés oxidativo en pacientes con cáncer colorrectal asociado al tratamiento quimioterápico

En esta primera parte, se ha abordado el estudio de cómo puede afectar al estrés oxidativo el tratamiento quimioterápico, para lo que se ha contado con una población con cáncer colorrectal sin tratamiento quimioterápico y otro grupo que sí está recibiendo quimioterapia. De esta forma, se pueden estudiar los niveles de estrés que son causados sólo y exclusivamente al tratamiento, ya que ambas poblaciones parten de un nivel de oxidación similar debido a la enfermedad.

##### 4.3.2.1.1. Capacidad antioxidante total del plasma

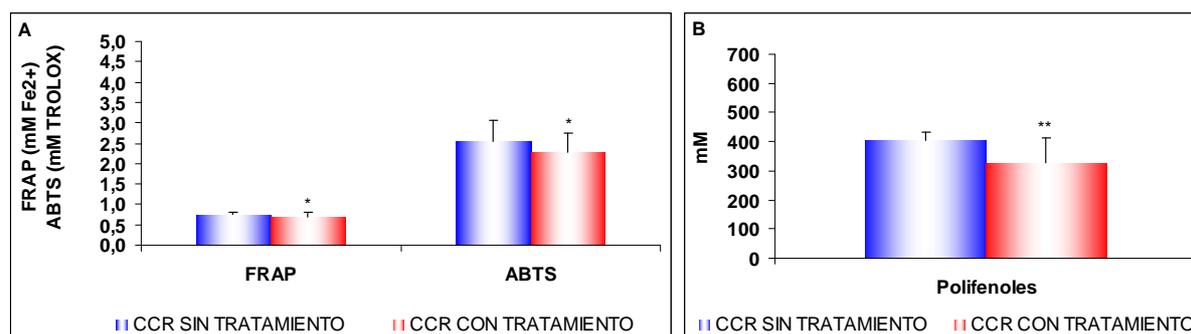
La Tabla XXII y la figura adjunta (Figura 50) recogen el valor promedio obtenido de la determinación de los parámetros indicadores de la capacidad antioxidante total del plasma.

**Tabla XXII.** Capacidad antioxidante total del plasma asociado al tratamiento en una población con CCR.

	CCR Sin Tratamiento	CCR Con Tratamiento	<i>p</i>
FRAP (mM Fe <sup>2+</sup> )	0,748 ± 0,048	0,689 ± 0,110	0,0463*
ABTS (mM TROLOX)	2,56 ± 0,506	2,27 ± 0,487	0,0482*
Polifenoles (mM)	404 ± 29,3	329 ± 83,0	0,0014**

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \* y \*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  y  $p < 0,005$  respectivamente cuando se compara CCR con tratamiento vs sin tratar.

Los resultados muestran que existe una capacidad antioxidante significativamente mayor en el grupo de sujetos sin tratamiento respecto a la población en tratamiento. Destacar que esta mayor capacidad, aun siendo significativa, es de un 10%, cuando se valora a través del método FRAP y de un 12% empleando el método ABTS.



**Figura 50.** Capacidad antioxidante total del plasma mediante método FRAP y ABTS (A) y polifenoles (B) asociado al tratamiento en una población con CCR. \* y \*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  y  $p < 0,005$  respectivamente.

#### 4.3.2.1.2. Biomarcadores de óxido nítrico en plasma

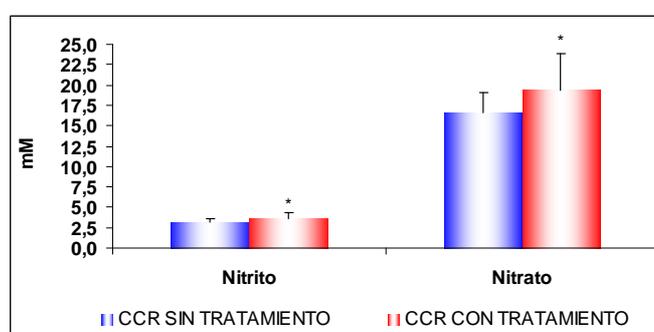
Los resultados de los niveles de nitrito y nitrato como indicadores de óxido nítrico en plasma se muestran en la Tabla XXIII y en la Figura 51.

**Tabla XXIII.** Concentración de indicadores de óxido nítrico en plasma asociado al tratamiento en una población con CCR.

	CCR Sin Tratamiento	CCR Con Tratamiento	$p$
Nitrito ( $\mu\text{M}$ )	$3,16 \pm 0,522$	$3,59 \pm 0,768$	0,0432*
Nitrato ( $\mu\text{M}$ )	$16,7 \pm 2,47$	$19,4 \pm 4,39$	0,0225*

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$  cuando se compara CCR con tratamiento vs sin tratar.

La población en tratamiento quimioterápico presenta unos valores promedio para el nitrito ( $3,59 \pm 0,768$ ) y el nitrato ( $19,4 \pm 4,39$ ) significativamente superiores a los encontrados en los enfermos de CCR que todavía no han comenzado el tratamiento ( $3,16 \pm 0,522$  y  $16,7 \pm 2,47$ , respectivamente)



**Figura 51.** Concentración de indicadores de óxido nítrico en plasma asociado al tratamiento en una población con CCR. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

4.3.2.1.3. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas**a. Lípidos**

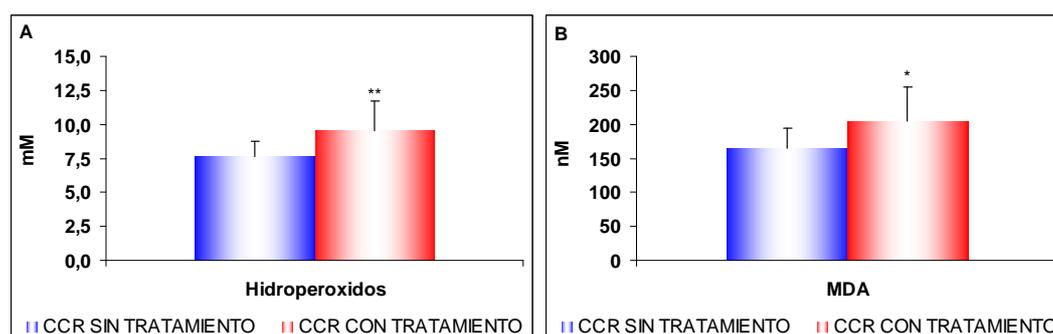
Como parámetros indicativos del daño oxidativo a lípidos se han determinado en plasma los niveles de MDA y la concentración de hidroperóxidos mientras que en linfocitos sólo se ha cuantificado el MDA.

Los resultados en plasma muestran (Tabla XXIV y Figura 52) que existen diferencias significativas en cuanto a los niveles de hidroperóxidos y MDA, entre los dos grupos de población. Así, el grupo sin tratamiento, en base a los valores de los biomarcadores, presentaría menor daño lipídico que los pacientes que están en régimen quimioterápico.

**Tabla XXIV.** Concentración de indicadores del daño a lípidos medido en plasma asociado al tratamiento en una población con CCR.

	CCR Sin Tratamiento	CCR Con Tratamiento	<i>p</i>
Hidroperóxidos ( $\mu\text{M}$ )	7,67 $\pm$ 1,13	9,51 $\pm$ 2,24	0,0026**
MDA-plasma (nM)	164 $\pm$ 30,0	205 $\pm$ 50,3	0,0116*

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. \* y \*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  y  $p < 0,005$  respectivamente cuando se compara CCR con tratamiento vs sin tratar.



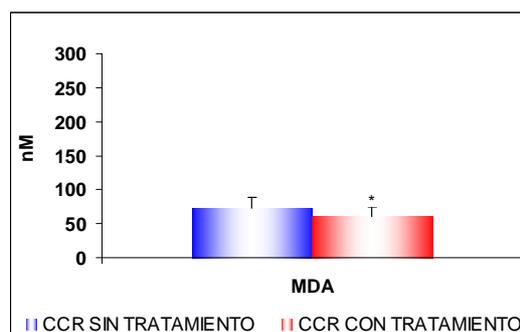
**Figura 52.** Indicadores del daño a lípidos, mediante medida de concentración de hidroperóxidos (A) y MDA (B) medidos en plasma asociado al tratamiento en una población con CCR. \* y \*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  y  $p < 0,005$  respectivamente.

Sin embargo, al determinar la concentración de MDA en linfocitos (Tabla XXV y Figura 53), se encuentra un resultado contrario al que cabría esperar, ya que en este caso, la mayor concentración de MDA está presente en el grupo de enfermos sin tratar.

**Tabla XXV.** Concentración de MDA como indicador del daño a lípidos medido en linfocitos asociado al tratamiento en una población con CCR.

	CCR Sin Tratamiento	CCR Con Tratamiento	<i>p</i>
MDA-linfocitos (nM)	72,5 ± 16,6	60,6 ± 13,6	0,0316*

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$  cuando se compara CCR con tratamiento vs sin tratar.



**Figura 53.** Concentración de MDA como indicador del daño a lípidos medido en linfocitos asociado al tratamiento en una población con CCR. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

### b. Proteínas

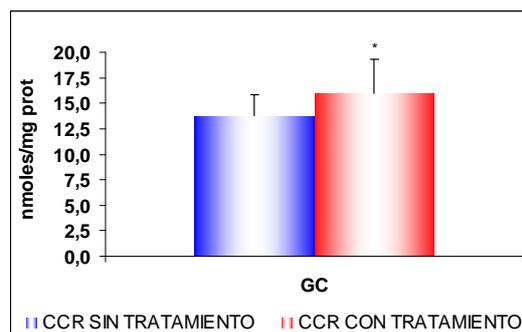
Como parámetros indicativos del daño oxidativo a proteínas se han determinado los niveles de grupos carbonilo (GC) en plasma y en linfocitos.

Tanto en el caso de la determinación en plasma (Tabla XXVI y Figura 54) como en linfocitos (Tabla XXVII y Figura 55), los resultados muestran diferencias significativas entre el grupo de pacientes sin y con tratamiento.

**Tabla XXVI.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en plasma asociado al tratamiento en una población con CCR.

	CCR Sin Tratamiento	CCR Con Tratamiento	<i>p</i>
GC-plasma (nmoles/mg proteína)	13,8 ± 2,02	16,0 ± 3,34	0,0164*

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$  cuando se compara CCR con tratamiento vs sin tratar.



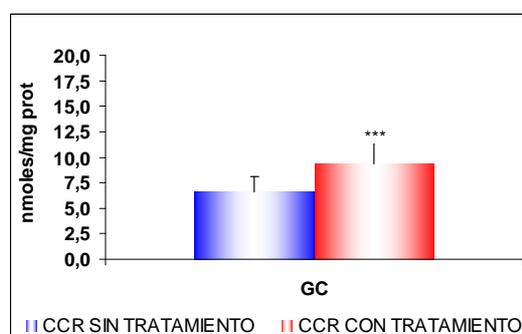
**Figura 54.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en plasma asociado al tratamiento en una población con CCR. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Destacar que en linfocitos se detectan mayores diferencias de concentración de grupos carbonilo (42% de incremento) y con mayor nivel de significancia ( $p < 0,0005$ ) frente al 16% de incremento detectado en plasma ( $p = 0,0164$ ).

**Tabla XXVII.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en linfocitos asociado al tratamiento en una población con CCR.

	CCR Sin Tratamiento	CCR Con Tratamiento	$p$
GC-linfocitos (nmoles/mg proteína)	6,60 ± 1,45	9,37 ± 2,13	<0,0005***

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$  cuando se compara CCR con tratamiento vs sin tratar.



**Figura 55.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en linfocitos asociado al tratamiento en una población con CCR. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$ .

#### 4.3.2.1.4. Estado Redox

Para el estudio del estado redox se midió en plasma y en linfocitos la concentración del glutatión (GSH) y solo en plasma el sistema tiorredoxina, formado por la tiorredoxina (Trx) y la tiorredoxina reductasa (TrxR).

En la Tabla XXVIII y en la figura adjunta (Figura 56) se resumen los resultados del estado redox en plasma. Así, en el caso del glutatión se detectan cambios

significativos ( $p=0,0388$ ) entre los dos grupos estudiados ( $0,496 \pm 0,092$  y  $0,423 \pm 0,119$  en pacientes sin y con tratamiento, respectivamente).

**Tabla XXVIII.** Estado redox medido en plasma asociado al tratamiento en una población con CCR.

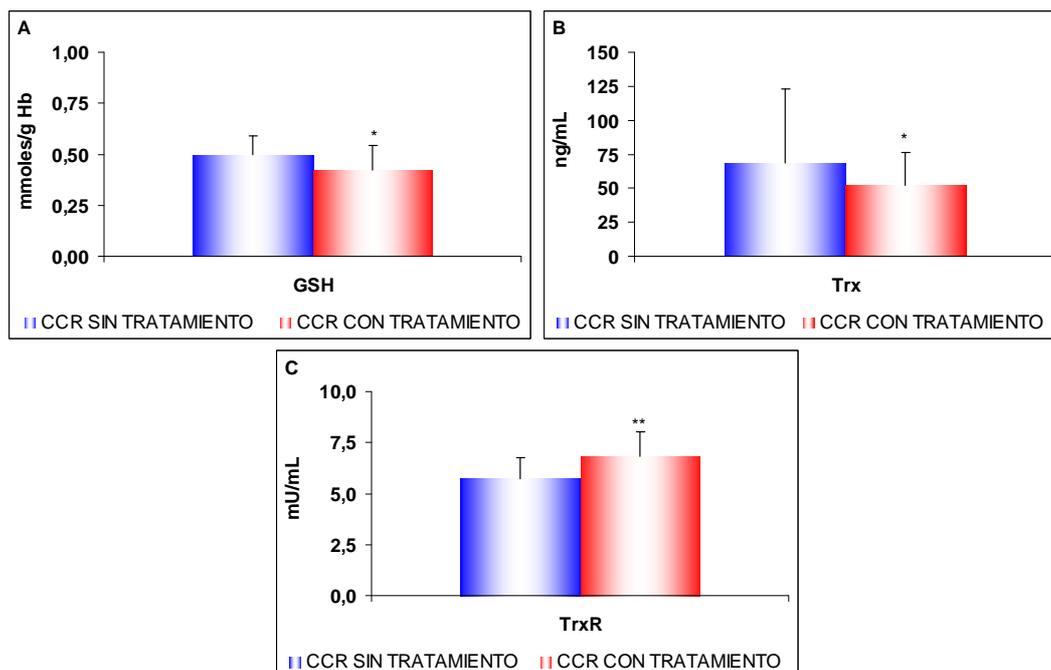
	CCR Sin Tratamiento	CCR Con Tratamiento	$p$
GSH-plasma ( $\mu$ moles/g Hb)	$0,496 \pm 0,092$	$0,423 \pm 0,119$	$0,0388^*$
Trx (ng/mL)	$68,7 \pm 54,5$	$51,8 \pm 24,7$	$0,0382^*$
TrxR (mU/mL)	$5,71 \pm 1,07$	$6,81 \pm 1,24$	$0,0020^{**}$

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. \* y \*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  y  $p < 0,005$  respectivamente cuando se compara CCR con tratamiento vs sin tratar.

En cuanto al sistema tiorredoxina, también se encuentran diferencias significativas tanto en la tiorredoxina como en la tiorredoxina reductasa en la población de pacientes tratados respecto al grupo sin tratar.

Así, los pacientes que se encuentran en tratamiento poseen un 20% más actividad enzimática de la tiorredoxina reductasa que los que no están sometidos a quimioterapia.

En el caso de la tiorredoxina los niveles de concentración son mayores en la población que no está en tratamiento. No obstante, destacar que el nivel de significancia es de  $p=0,0382$  y la dispersión de los datos alta ( $68,7 \pm 54,5$  y  $51,8 \pm 24,7$  para el grupo de población sin tratar y los pacientes en tratamiento, respectivamente), por lo que la interpretación de este resultado debe realizarse con cierta precaución.



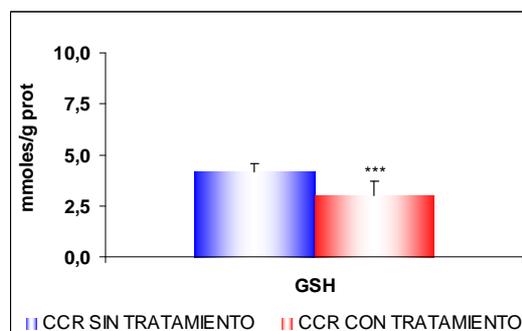
**Figura 56.** Estado redox medido en plasma mediante concentración de GSH (A), Trx (B) y actividad TrxR (C) asociado al tratamiento en una población con CCR. \* y \*\*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  y  $p < 0,005$  respectivamente.

Respecto a las mediciones realizadas de GSH en linfocitos (Tabla XXIX y Figura 57), al igual que ocurre en plasma, se detectan cambios muy significativos ( $p < 0,0005$ ) entre el grupo de pacientes sin tratar ( $4,15 \pm 0,401$ ) y los tratados ( $3,01 \pm 0,675$ ).

**Tabla XXIX.** Estado redox medido en linfocitos asociado al tratamiento en una población con CCR.

	CCR Sin Tratamiento	CCR Con Tratamiento	$p$
GSH-linfocitos ( $\mu\text{moles/g prote\u00edna}$ )	$4,15 \pm 0,401$	$3,01 \pm 0,675$	$<0,0005^{***}$

Los resultados est\u00e1n expresados en media  $\pm$  desviaci\u00f3n est\u00e1ndar. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$  cuando se compara CCR con tratamiento vs sin tratar.



**Figura 57.** Estado redox medido en linfocitos asociado al tratamiento en una poblaci\u00f3n con CCR. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$ .

#### **4.3.2.2. Estudio del estrés oxidativo en pacientes con cáncer colorrectal asociado al tipo de tratamiento quimioterápico**

En esta segunda parte, se ha abordado el estudio de cómo se ven afectados los niveles de estrés oxidativo en función del tipo de tratamiento quimioterápico, y que grupo de fármacos confieren menor o mayor estrés o bien median y utilizan la oxidación en su mecanismo de acción.

Así, para la realización de este análisis, se han agrupado los tratamientos que habitualmente se emplean en el tratamiento del cáncer colorrectal en tres grupos, tal y como recoge la Tabla III. De esta forma, el grupo T<sub>1</sub> estaría formado por los pacientes que están recibiendo fluoropirimidinas (5-fluorouracilo o capecitabina) solas (7% de la población en tratamiento) o bien acompañadas de oxaliplatino o irinotecan (40% de la población en tratamiento).

En el grupo T<sub>2</sub> (37% de población en tratamiento) estarían encuadrados los pacientes que junto a algún tipo de fluoropirimidina y oxaliplatino o irinotecan están siendo tratados con alguno de los anticuerpos monoclonales, bien anti-EGFR (cetuximab o panitumumab) o anti-VEGF (bevacizumab). Por último, existe un grupo de pacientes que están recibiendo un tipo de tratamiento que no responde a ninguno de los criterios establecidos anteriormente, por lo que se han agrupado bajo el epígrafe de T<sub>3</sub> u otros tratamientos. En este grupo (16% de los tratamientos) hay una gran heterogeneidad, fundamentada en la existencia de algún efecto adverso o toxicidad a los tratamientos más habituales, tipo de metástasis menos común, requiriendo otro tipo de fármacos o idiosincrasia o resistencia individual que condiciona la diferente prescripción.

Por último, para el correcto análisis de los resultados se ha contado con un grupo de pacientes, denominado T<sub>0</sub>, que actúa como control ya que no ha recibido ningún tipo de tratamiento.

4.3.2.2.1. Capacidad antioxidante total del plasma

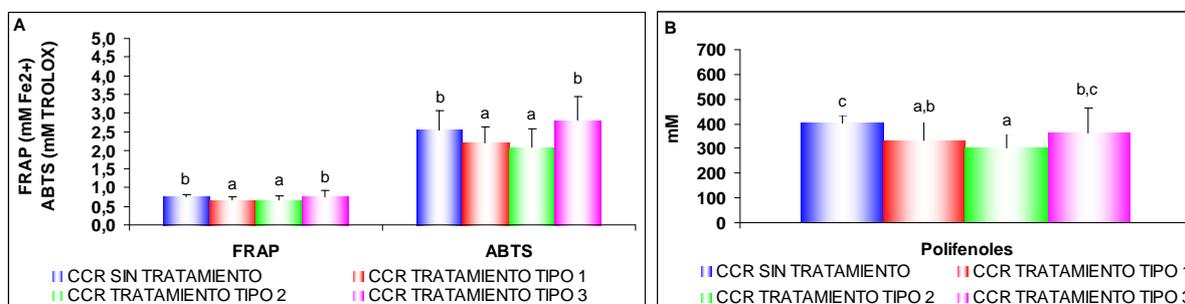
La Tabla XXX y la Figura 58 adjunta recogen el valor promedio obtenido de la determinación de los parámetros indicadores de la capacidad antioxidante total del plasma.

**Tabla XXX.** Capacidad antioxidante total del plasma asociado al tipo de tratamiento en una población con CCR.

	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
FRAP (mM Fe <sup>2+</sup> )	0,748 ± 0,048 <sup>b</sup>	0,677 ± 0,082 <sup>a</sup>	0,659 ± 0,111 <sup>a</sup>	0,759 ± 0,163 <sup>b</sup>
ABTS (mM TROLOX)	2,56 ± 0,506 <sup>b</sup>	2,20 ± 0,423 <sup>a</sup>	2,09 ± 0,475 <sup>a</sup>	2,80 ± 0,636 <sup>b</sup>
Polifenoles (mM)	404 ± 29,3 <sup>c</sup>	331 ± 78,1 <sup>a,b</sup>	303 ± 57,4 <sup>a</sup>	363 ± 101 <sup>b,c</sup>

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Los resultados muestran que existe una capacidad antioxidante significativamente mayor en el grupo de sujetos sin tratamiento respecto a la población con tratamiento tipo T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>. Sin embargo, el grupo T<sub>3</sub> se comporta de la misma forma que los pacientes sin tratar.



**Figura 58.** Capacidad antioxidante total del plasma mediante método FRAP y ABTS (A) y polifenoles (B) asociado al tipo de tratamiento en una población con CCR. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

En cuanto a la concentración de polifenoles, el grupo de los pacientes T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> difiere significativamente de los pacientes sin tratar, pero T<sub>3</sub> muestra una concentración de polifenoles intermedia entre T<sub>0</sub> y T<sub>1</sub>, no significativamente diferente, pero que le posiciona en un nivel intermedio de oxidación.

#### 4.3.2.2.2. Biomarcadores de óxido nítrico en plasma

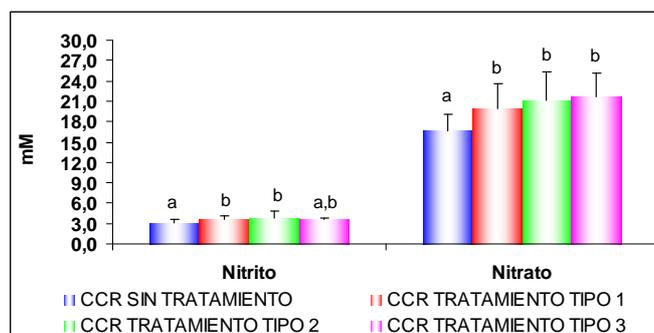
Los resultados de los niveles de nitrito y nitrato como indicadores de óxido nítrico en plasma se muestran en la Tabla XXXI y en la Figura 59.

**Tabla XXXI.** Concentración de indicadores de óxido nítrico en plasma asociado al tipo de tratamiento en una población con CCR.

	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
Nitrito (μM)	3,16 ± 0,522 <sup>a</sup>	3,65 ± 0,573 <sup>b</sup>	3,84 ± 0,975 <sup>b</sup>	3,61 ± 0,275 <sup>a,b</sup>
Nitrato (μM)	16,7 ± 2,47 <sup>a</sup>	20,0 ± 3,58 <sup>b</sup>	21,2 ± 4,19 <sup>b</sup>	21,7 ± 3,34 <sup>b</sup>

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Al igual que en el estudio de la capacidad antioxidante, los niveles de nitrito y nitrato son significativamente diferentes en el caso de la población sometida al tratamiento T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> respecto a los pacientes sin tratar. Asimismo, el grupo de pacientes T<sub>3</sub> se posiciona de nuevo en un nivel intermedio, de forma que tiene una concentración intermedia de nitrito, a pesar de no ser significativa la diferencia ni con el grupo T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> ni con el T<sub>0</sub>. Sin embargo, al estudiar la concentración de nitrato, sí existen diferencias con el grupo de los pacientes sin tratar.



**Figura 59.** Concentración de indicadores de óxido nítrico en plasma asociado al tipo de tratamiento en una población con CCR. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

#### 4.3.2.2.3. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas

##### **a. Lípidos**

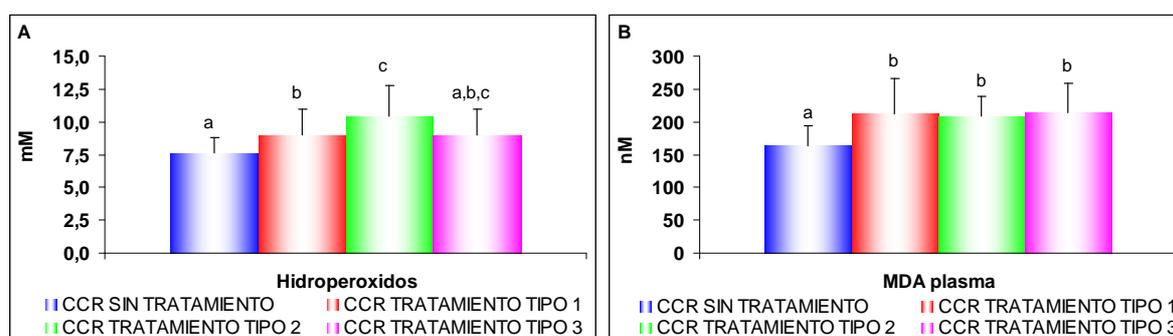
Como parámetros indicativos del daño oxidativo a lípidos se han determinado en plasma los niveles de MDA y la concentración de hidroperóxidos mientras que en linfocitos sólo se ha cuantificado la concentración de MDA.

Los resultados en plasma indican (Tabla XXXII y Figura 60) que la concentración de hidroperóxidos aumenta de forma significativa según el tipo de tratamiento ( $T_0$ ,  $T_1$  y  $T_2$ ). Sin embargo, el grupo de pacientes  $T_3$ , con una concentración intermedia, no presenta ninguna diferencia significativa con ninguno de los tipos de población.

**Tabla XXXII.** Concentración de indicadores del daño a lípidos medido en plasma asociado al tipo de tratamiento en una población con CCR.

	$T_0$	$T_1$	$T_2$	$T_3$
Hidroperóxidos ( $\mu\text{M}$ )	$7,67 \pm 1,13^a$	$8,94 \pm 2,06^b$	$10,5 \pm 2,32^c$	$9,02 \pm 1,98^{a,b,c}$
MDA-plasma (nM)	$164 \pm 30,0^a$	$212 \pm 54,3^b$	$208 \pm 30,5^b$	$214 \pm 45,0^b$

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .



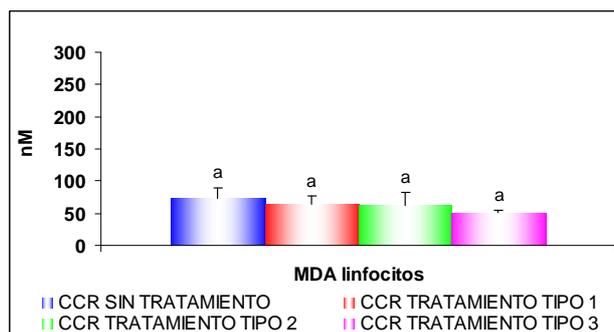
**Figura 60.** Indicadores del daño a lípidos, mediante medida de concentración de hidroperóxidos (A) y MDA (B) medidos en plasma asociado al tipo de tratamiento en una población con CCR. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Por otra parte, al estudiar la concentración de MDA, en el caso del plasma, sólo se presentan diferencias significativas entre el grupo de pacientes sin tratar con respecto al conjunto de los grupos en tratamiento, mientras que en linfocitos (Tabla XXXIII y Figura 61) las diferencias de concentración no resultan significativas en ninguno de los grupos estudiados.

**Tabla XXXIII.** Concentración de MDA como indicador del daño a lípidos medido en linfocitos asociado al tipo de tratamiento en una población con CCR.

	$T_0$	$T_1$	$T_2$	$T_3$
MDA-linfocitos (nM)	$72,5 \pm 16,6^a$	$63,4 \pm 14,2^a$	$62,7 \pm 19,1^a$	$50,7 \pm 3,69^a$

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .



**Figura 61.** Concentración de MDA como indicador del daño a lípidos medido en linfocitos asociado al tipo de tratamiento en una población con CCR. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

### b. Proteínas

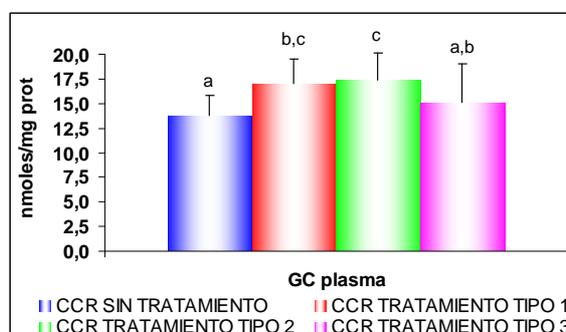
Como parámetros indicativos del daño oxidativo a proteínas se han determinado los niveles de grupos carbonilo (GC) en plasma y en linfocitos.

En el caso de la determinación en plasma (Tabla XXXIV y Figura 62) los resultados muestran que existen diferencias significativas entre la población de los pacientes sin tratar y el grupo T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> en su conjunto, pero de nuevo T<sub>3</sub> se posiciona en un nivel intermedio, sin mostrar diferencias significativas ni con T<sub>0</sub> ni con T<sub>1</sub>, aunque sí con T<sub>2</sub>.

**Tabla XXXIV.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en plasma asociado al tipo de tratamiento en una población con CCR.

	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
GC-plasma (nmoles/mg proteína)	13,8 ± 2,02 <sup>a</sup>	17,0 ± 2,53 <sup>b,c</sup>	17,3 ± 2,79 <sup>c</sup>	15,1 ± 4,00 <sup>a,b</sup>

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .



**Figura 62.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en plasma asociado al tipo de tratamiento en una población con CCR. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

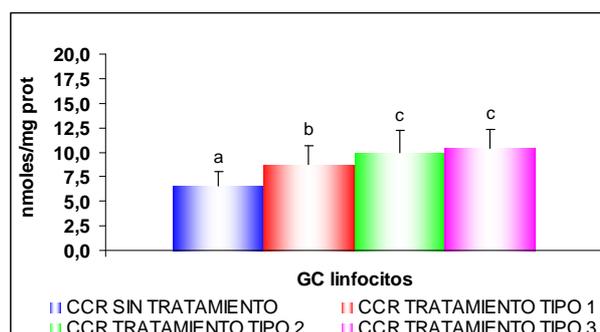
Al realizar el estudio en linfocitos (Tabla XXXV y Figura 63), se detecta como se produce un incremento en la concentración de GC según el tipo de tratamiento ( $T_0$ ,  $T_1$  y  $T_2$ ) y que este incremento lleva asociado diferencias significativas entre un grupo y otro.

**Tabla XXXV.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en linfocitos asociado al tipo de tratamiento en una población con CCR.

	$T_0$	$T_1$	$T_2$	$T_3$
GC-linfocitos (nmoles/mg proteína)	$6,60 \pm 1,45^a$	$8,73 \pm 1,93^b$	$9,92 \pm 2,27^c$	$10,4 \pm 1,90^c$

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Por otra parte, el grupo de pacientes  $T_3$  es el que tiene mayor nivel de oxidación, en cuanto a concentración de grupos carbonilo se refiere, presentando diferencias significativas con el grupo  $T_0$  y  $T_1$  pero no con la población enmarcada en el grupo  $T_2$ .



**Figura 63.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en linfocitos asociado al tipo de tratamiento en una población con CCR. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

#### 4.3.2.2.4. Estado Redox

Para el estudio del estado redox se midió en plasma y en linfocitos la concentración del glutatión (GSH) y en plasma el sistema tiorredoxina, formado por la tiorredoxina (Trx) y la tiorredoxina reductasa (TrxR).

En la Tabla XXXVI y en la figura adjunta (Figura 64) se resumen los resultados del estado redox en plasma.

**Tabla XXXVI.** Estado redox medido en plasma asociado al tipo de tratamiento en una población con CCR.

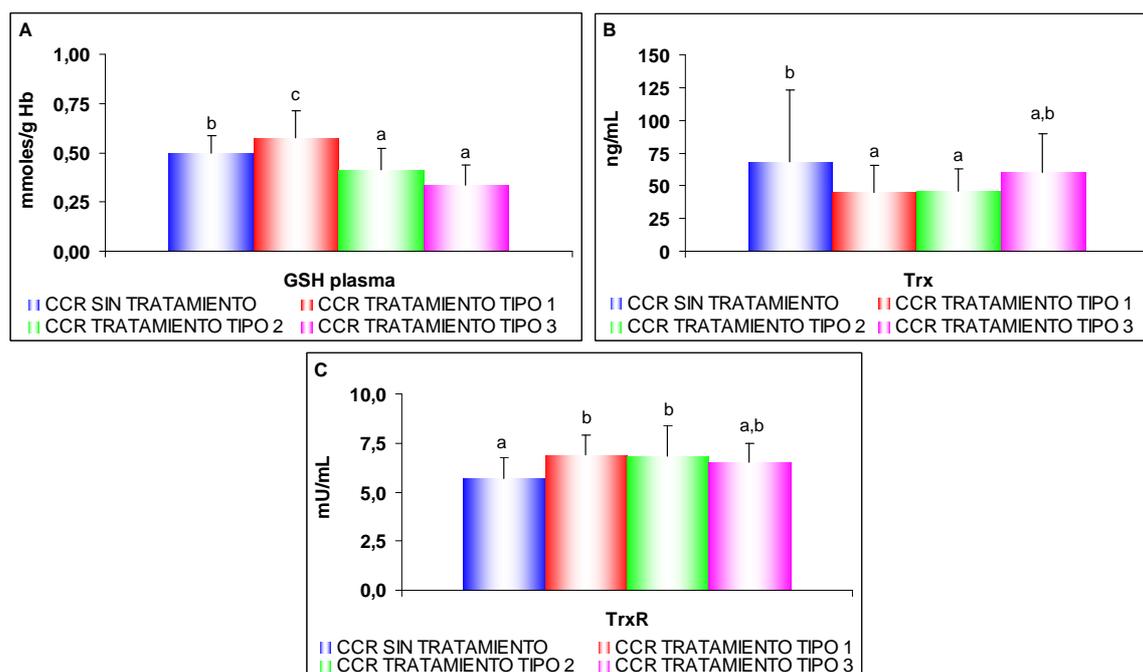
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
GSH-plasma (μmoles/g Hb)	0,496 ± 0,092 <sup>b</sup>	0,576 ± 0,139 <sup>c</sup>	0,414 ± 0,105 <sup>a</sup>	0,336 ± 0,099 <sup>a</sup>
Trx (ng/mL)	68,7 ± 54,5 <sup>b</sup>	45,2 ± 20,2 <sup>a</sup>	45,5 ± 17,4 <sup>a</sup>	60,2 ± 29,3 <sup>a,b</sup>
TrxR (mU/mL)	5,71 ± 1,07 <sup>a</sup>	6,89 ± 1,04 <sup>b</sup>	6,83 ± 1,56 <sup>b</sup>	6,51 ± 0,96 <sup>a,b</sup>

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Así, en el caso del GSH la población que está recibiendo el tratamiento T<sub>1</sub> presenta la mayor concentración del tripéptido antioxidante (0,576 ± 0,139), seguido de la población sin tratar (0,496 ± 0,092) y del grupo T<sub>2</sub> (0,414 ± 0,105), siendo esta diferencia significativa entre estos tres grupos de población. Por último, la población de pacientes T<sub>3</sub>, presenta el menor valor de concentración (0,336 ± 0,099), sin presentar diferencias significativas con el grupo T<sub>2</sub>.

En cuanto al sistema tiorredoxina, al igual que ocurre en el apartado anterior (CCR sin y con tratamiento), es en la población T<sub>0</sub> donde se detectan los niveles más elevados (68,7 ± 54,5), siendo esta diferencia significativa al comparar con los grupos T<sub>1</sub> (45,2 ± 20,2) y T<sub>2</sub> (45,5 ± 17,4) y no con T<sub>3</sub> (60,2 ± 29,3). Las poblaciones T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> no muestran cambios significativos ni entre ellas ni con la población T<sub>3</sub>.

Asimismo, la tiorredoxina reductasa presenta los mayores niveles de actividad en las poblaciones T<sub>1</sub> (6,89 ± 1,04) y T<sub>2</sub> (6,83 ± 1,56), presentando cambios significativos respecto al grupo de pacientes sin tratar (5,71 ± 1,07). De nuevo, la población T<sub>3</sub> (6,51 ± 0,96) no presenta diferencias significativas con ninguno de los tres grupos estudiados.



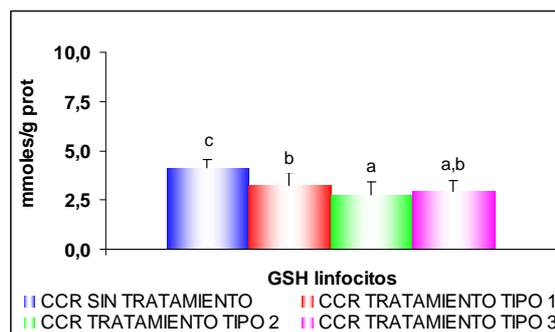
**Figura 64.** Estado redox medido en plasma mediante concentración de GSH (A), Trx (B) y actividad TrxR (C) asociado al tipo de tratamiento en una población con CCR. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Respecto al resultado de las mediciones realizadas de GSH en linfocitos (Tabla XXXVII y Figura 65), sorprende que no siga el mismo comportamiento que en plasma, ya que en este caso, el grupo que presenta la mayor concentración de GSH es el de los pacientes sin tratar, seguido del grupo  $T_1$  y  $T_2$ , mostrando diferencias significativas entre estos tres grupos de población. Por otra parte, la población  $T_3$  no presenta cambios significativos con ninguno de los grupos de los pacientes en tratamiento, aunque sí con la población  $T_0$ .

**Tabla XXXVII.** Estado redox medido en linfocitos asociado al tipo de tratamiento en una población con CCR.

	$T_0$	$T_1$	$T_2$	$T_3$
GSH-linfocitos ( $\mu$ moles/g proteína)	$4,15 \pm 0,401^c$	$3,21 \pm 0,694^b$	$2,76 \pm 0,631^a$	$2,93 \pm 0,536^{a,b}$

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .



**Figura 65.** Estado redox medido en linfocitos asociado al tipo de tratamiento en una población con CCR. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

### **4.3.3. Estudio del estrés oxidativo asociado a metástasis en pacientes con cáncer colorrectal**

A lo largo de la revisión bibliográfica se ha ido plasmando como los procesos de metástasis y el estrés oxidativo pueden estar estrechamente relacionados, por lo que en el desarrollo de este trabajo ha merecido especial atención el estudio de ambos fenómenos y su interrelación en los pacientes con cáncer colorrectal.

#### **4.3.3.1. Estudio del estrés oxidativo en cáncer colorrectal asociado a metástasis en un grupo de pacientes sin tratamiento quimioterápico**

Para el inicio de este estudio, se ha hecho relevante conocer si la metástasis por sí misma, está asociada a alteraciones de los niveles de estrés, para lo que se ha contado con dos grupo de pacientes, uno con metástasis ( $M_1$ ) y otro grupo sin metástasis ( $M_0$ ), que todavía no han comenzado ningún tipo de tratamiento quimioterápico, y por tanto no han contado con una causa adicional importante que pueda también afectar a sus niveles de oxidorreducción celular.

##### **4.3.3.1.1. Capacidad antioxidante total del plasma**

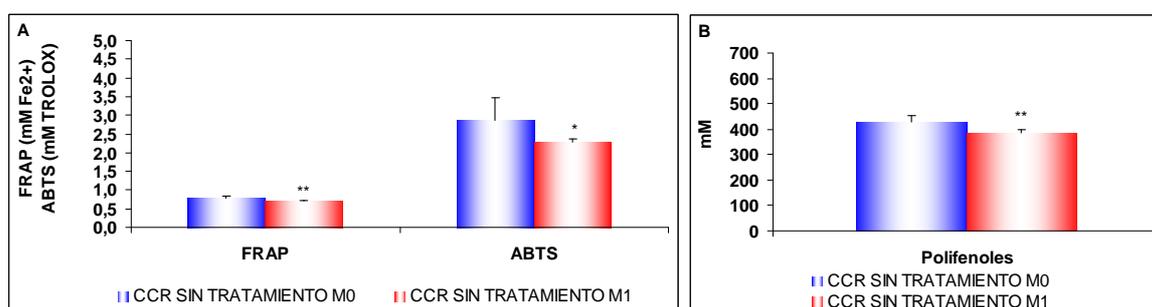
La Tabla XXXVIII y la figura adjunta (Figura 66) recogen el valor promedio obtenido de la determinación de los parámetros indicadores de la capacidad antioxidante total del plasma.

**Tabla XXXVIII.** Capacidad antioxidante total del plasma asociado a metástasis en una población con CCR sin tratamiento quimioterápico.

	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	<i>p</i>
FRAP (mM Fe <sup>2+</sup> )	0,786 ± 0,046	0,715 ± 0,008	0,0009**
ABTS (mM TROLOX)	2,87 ± 0,613	2,28 ± 0,088	0,0189*
Polifenoles (mM)	430 ± 23,3	385 ± 14,1	0,0007**

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \* y \*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  y  $p < 0,005$  respectivamente cuando se compara población con metástasis vs sin metástasis.

Los resultados muestran que existe una capacidad antioxidante significativamente mayor en el grupo de sujetos sin metástasis respecto a la población con metástasis. Destacar que esta capacidad antioxidante es un 10% mayor, cuando se valora a través del método FRAP ( $p=0,0009$ ) y de un 26% cuando es empleando el método ABTS, aunque con un menor nivel de significancia ( $p=0,0189$ ).



**Figura 66.** Capacidad antioxidante total del plasma mediante método FRAP y ABTS (A) y polifenoles (B) asociado a metástasis en una población con CCR sin tratamiento quimioterápico. \* y \*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  y  $p < 0,005$  respectivamente.

La concentración de polifenoles en el grupo de pacientes sin metástasis es un 12% mayor respecto a la población con metástasis.

#### 4.3.3.1.2. Biomarcadores de óxido nítrico en plasma

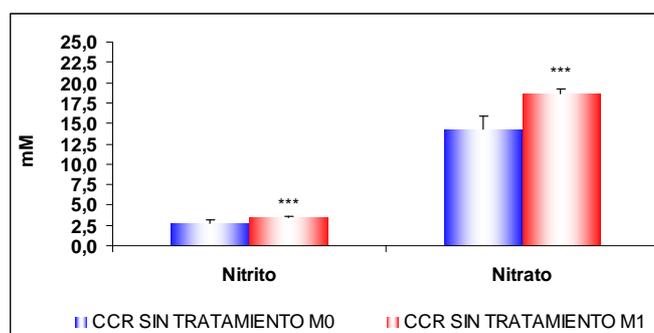
Los resultados de los niveles de nitrito y nitrato como indicadores de óxido nítrico en plasma se muestran en la Tabla XXXIX y en la Figura 67.

**Tabla XXXIX.** Concentración de indicadores de óxido nítrico en plasma asociado a metástasis en una población con CCR sin tratamiento quimioterápico.

	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	p
Nitrito (μM)	2,72 ± 0,452	3,54 ± 0,114	<0,0005***
Nitrato (μM)	14,4 ± 1,53	18,7 ± 0,485	<0,0005***

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$  cuando se compara población con metástasis vs sin metástasis.

La población con metástasis presenta unos valores promedio para el nitrito (3,54 ± 0,114) y el nitrato (18,7 ± 0,485) significativamente superiores a los encontrados en los enfermos de CCR sin metástasis (2,72 ± 0,452 y 14,4 ± 1,53, respectivamente).



**Figura 67.** Concentración de indicadores de óxido nítrico en plasma asociado a metástasis en una población con CCR sin tratamiento quimioterápico. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$ .

#### 4.3.3.1.3. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas

##### **a. Lípidos**

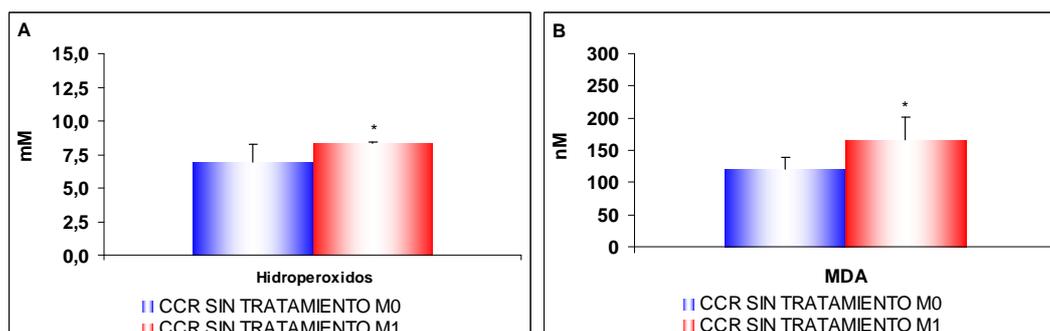
Como parámetros indicativos del daño oxidativo a lípidos se han determinado en plasma los niveles de MDA y la concentración de hidroperóxidos mientras que en linfocitos sólo se ha cuantificado el MDA.

Los resultados en plasma muestran (Tabla XL y Figura 68) que existen diferencias significativas en cuanto a los niveles de hidroperóxidos y MDA, entre los dos grupos de población. Así, el grupo sin metástasis, en base a los valores de los biomarcadores, presentaría menor daño lipídico que los pacientes que tienen algún tipo de metástasis.

**Tabla XL.** Concentración de indicadores del daño a lípidos medido en plasma asociado a metástasis en una población con CCR sin tratamiento quimioterápico.

	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	<i>p</i>
Hidroperóxidos (μM)	6,95 ± 1,34	8,30 ± 0,161	0,0140*
MDA-plasma (nM)	120 ± 18,8	166 ± 35,2	0,0462*

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$  cuando se compara población con metástasis vs sin metástasis.



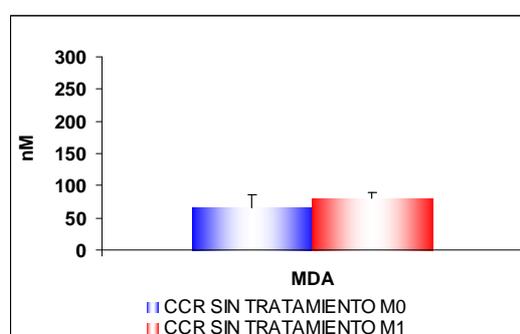
**Figura 68.** Indicadores del daño a lípidos, mediante medida de concentración de hidroperóxidos (A) y MDA (B) medidos en plasma asociado a metástasis en una población con CCR sin tratamiento quimioterápico. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Sin embargo, al evaluar el daño a lípidos en linfocitos (Tabla XLI y Figura 69) a través de la concentración de MDA, no se encuentran diferencias significativas en ambos grupos de población.

**Tabla XLI.** Concentración de MDA como indicador del daño a lípidos medido en linfocitos asociado a metástasis en una población con CCR sin tratamiento quimioterápico.

	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	<i>p</i>
MDA-linfocitos (nM)	65,9 ± 19,2	80,5 ± 9,13	0,1552

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar.  $p > 0,05$  indica que no existen diferencias significativas cuando se compara población con metástasis vs sin metástasis.



**Figura 69.** Concentración de MDA como indicador del daño a lípidos medido en linfocitos asociado a metástasis en una población con CCR sin tratamiento quimioterápico.  $p > 0,05$  indica que no existen diferencias significativas.

### b. Proteínas

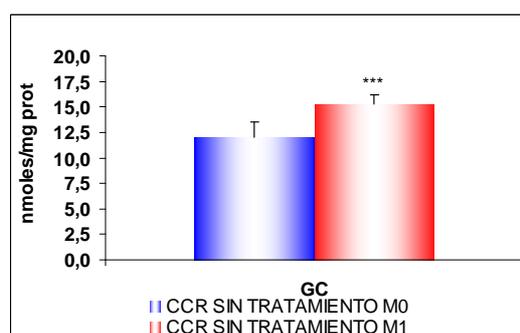
Como parámetros indicativos del daño oxidativo a proteínas se han determinado los niveles de grupos carbonilo (GC) en plasma y en linfocitos.

Tanto en el caso de la determinación en plasma (Tabla XLII y Figura 70) como en linfocitos (Tabla XLIII y Figura 71), los resultados muestran diferencias significativas entre los grupos de población estudiados.

**Tabla XLII.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en plasma asociado a metástasis en una población con CCR sin tratamiento quimioterápico.

	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	p
GC-plasma (nmoles/mg proteína)	12,1 ± 1,46	15,2 ± 0,991	<0,0005***

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$  cuando se compara población con metástasis vs sin metástasis.



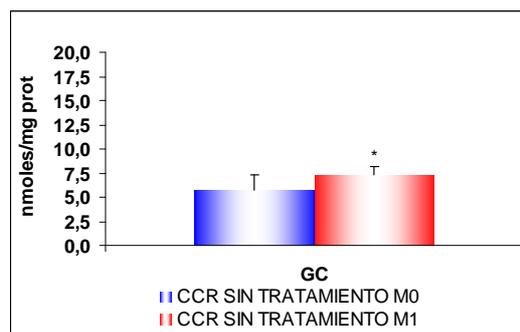
**Figura 70.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en plasma asociado a metástasis en una población con CCR sin tratamiento quimioterápico. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$ .

Destacar que las diferencias detectadas tanto en plasma como en linfocitos, son similares en cuanto a incremento de concentración de GC (26% y 28%, respectivamente), pero el nivel de significancia que presenta en plasma es mucho mayor ( $p < 0,0005$ ).

**Tabla XLIII.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en linfocitos asociado a metástasis en una población con CCR sin tratamiento quimioterápico.

	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	p
GC-linfocitos (nmoles/mg proteína)	5,69 ± 1,58	7,27 ± 0,942	0,0374*

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$  cuando se compara población con metástasis vs sin metástasis.



**Figura 71.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en linfocitos asociado a metástasis en una población con CCR sin tratamiento quimioterápico. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

#### 4.3.3.1.4. Estado Redox

Para el estudio del estado redox se midió en plasma y en linfocitos la concentración del glutatión (GSH) y en plasma la tiorredoxina (Trx) y la tiorredoxina reductasa (TrxR).

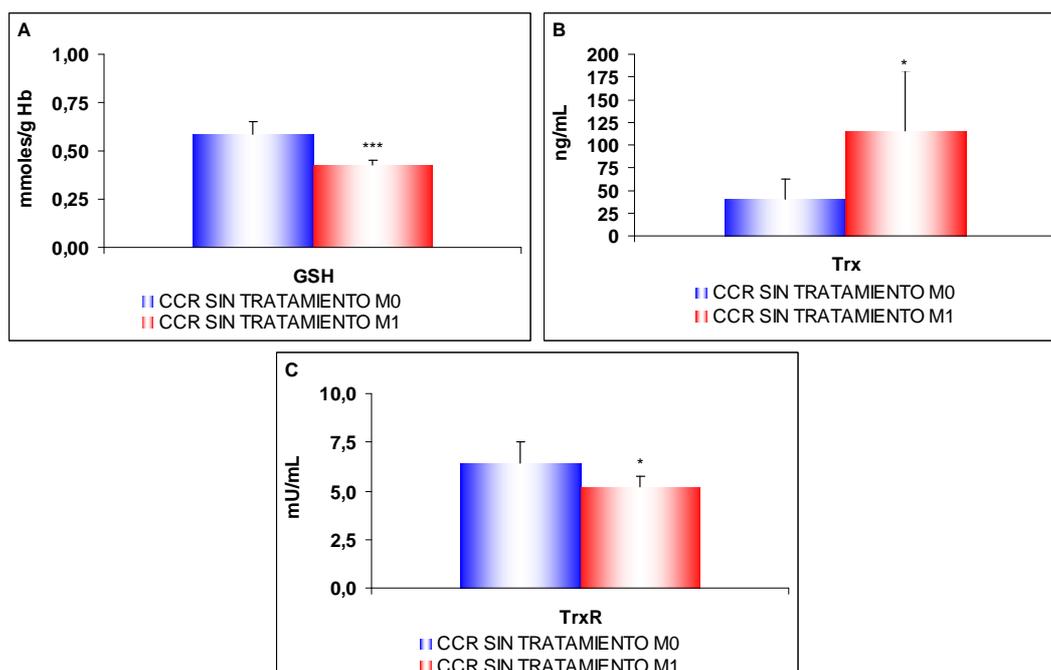
En la Tabla XLIV y en la figura adjunta (Figura 72) se resumen los resultados del estado redox en plasma. Así, en el caso del GSH se detectan cambios altamente significativos ( $p < 0,0005$ ) entre los dos grupos estudiados ( $0,587 \pm 0,064$  y  $0,428 \pm 0,024$  en pacientes sin y con metástasis, respectivamente).

**Tabla XLIV.** Estado redox medido en plasma asociado a metástasis en una población con CCR sin tratamiento quimioterápico.

	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	$p$
GSH-plasma ( $\mu$ moles/g Hb)	$0,587 \pm 0,064$	$0,428 \pm 0,024$	$<0,0005^{***}$
Trx (ng/mL)	$40,4 \pm 22,2$	$115 \pm 66,4$	$0,0439^*$
TrxR (mU/mL)	$6,41 \pm 1,13$	$5,21 \pm 0,553$	$0,0298^*$

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. \* y \*\*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  y  $p < 0,0005$  respectivamente cuando se compara población con metástasis vs sin metástasis.

En cuanto al sistema tiorredoxina, también se encuentran diferencias significativas en ambos parámetros para los dos grupos de población. Así, los pacientes que presentan metástasis poseen una concentración de tiorredoxina hasta casi 3 veces mayor que la población M<sub>0</sub>. En el caso de la tiorredoxina reductasa, y contrario a lo que cabría esperar, es el grupo el grupo M<sub>0</sub> el que tiene mayor actividad enzimática.



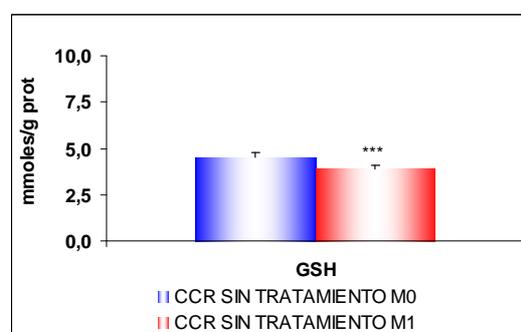
**Figura 72.** Estado redox medido en plasma mediante concentración de GSH (A), Trx (B) y actividad TrxR (C) asociado a metástasis en una población con CCR sin tratamiento quimioterápico. \* y \*\*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  y  $p < 0,0005$  respectivamente.

Respecto al resultado de las mediciones realizadas de GSH en linfocitos (Tabla XLV y Figura 73), al igual que ocurre en plasma, se detectan cambios muy significativos ( $p < 0,0005$ ) entre el grupo de pacientes sin ( $4,52 \pm 0,275$ ) y con metástasis ( $3,87 \pm 0,183$ ).

**Tabla XLV.** Estado redox medido en linfocitos asociado a metástasis en una población con CCR sin tratamiento quimioterápico.

	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	<i>p</i>
GSH-linfocitos ( $\mu\text{moles/g proteína}$ )	$4,52 \pm 0,275$	$3,87 \pm 0,183$	$<0,0005^{***}$

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$  cuando se compara población con metástasis vs sin metástasis.



**Figura 73.** Estado redox medido en linfocitos asociado a metástasis en una población con CCR sin tratamiento quimioterápico. \*\*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,0005$ .

#### 4.3.3.2. Estudio del estrés oxidativo en cáncer colorrectal asociado a metástasis en un grupo de pacientes en tratamiento quimioterápico

Una vez conocido como el estrés oxidativo y los procesos metastáticos están íntimamente relacionados, se ha continuado con el estudio contando, en este caso, con una población de pacientes con CCR en tratamiento quimioterápico, analizando cómo se ven afectados los niveles de oxidación en los grupos sin y con metástasis respecto al grupo control.

##### 4.3.3.2.1. Capacidad antioxidante total del plasma

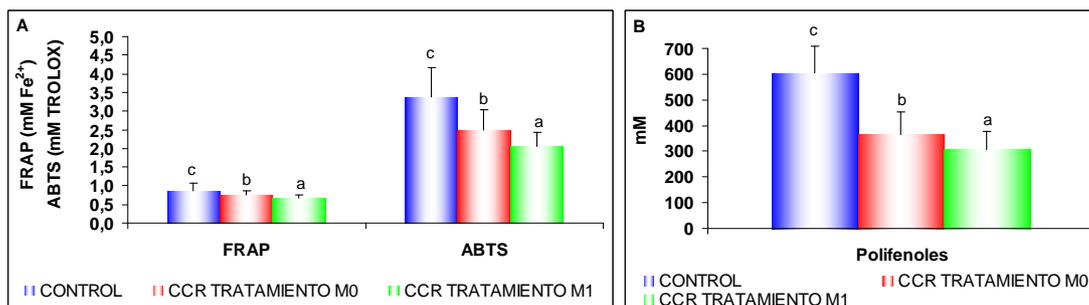
La Tabla XLVI y la figura adjunta (Figura 74) recogen el valor promedio obtenido de la determinación de los parámetros indicadores de la capacidad antioxidante total del plasma.

**Tabla XLVI.** Capacidad antioxidante total del plasma asociado a metástasis respecto a grupo control en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	Control	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>
FRAP (mM Fe <sup>2+</sup> )	0,879 ± 0,197 <sup>c</sup>	0,742 ± 0,129 <sup>b</sup>	0,655 ± 0,092 <sup>a</sup>
ABTS (mM TROLOX)	3,37 ± 0,789 <sup>c</sup>	2,49 ± 0,547 <sup>b</sup>	2,04 ± 0,398 <sup>a</sup>
Polifenoles (mM)	603 ± 105 <sup>c</sup>	364 ± 86,9 <sup>b</sup>	305 ± 71,4 <sup>a</sup>

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Los resultados muestran que existe una capacidad antioxidante significativamente menor en el grupo de pacientes sin y con metástasis respecto al grupo de sujetos control, mostrándose también diferencias significativas entre las dos poblaciones con CCR.



**Figura 74.** Capacidad antioxidante total del plasma mediante método FRAP y ABTS (A) y polifenoles (B) asociado a metástasis respecto a grupo control en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Así, utilizando el método FRAP, se observa que respecto a la población control, existe un descenso de la capacidad antioxidante de un 19% en el grupo de pacientes sin metástasis y de un 34% en el grupo M<sub>1</sub>. Asimismo, cuando se emplea el método ABTS, esta diferencia se hace todavía más acusada, ya que se detectan descensos respecto a la población control de un 35%, en el caso del grupo M<sub>0</sub> y hasta de un 65% cuando la población estudiada corresponde a pacientes con metástasis.

#### 4.3.3.2.2. Biomarcadores de óxido nítrico en plasma

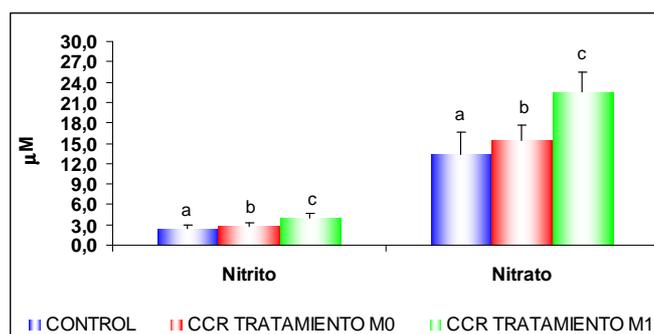
Los resultados de los niveles de nitrito y nitrato como indicadores de óxido nítrico en plasma se muestran en la Tabla XLVII y en la Figura 75.

**Tabla XLVII.** Concentración de indicadores de óxido nítrico en plasma asociado a metástasis respecto a grupo control en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	Control	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>
Nitrito ( $\mu\text{M}$ )	2,42 $\pm$ 0,479 <sup>a</sup>	2,72 $\pm$ 0,658 <sup>b</sup>	4,01 $\pm$ 0,583 <sup>c</sup>
Nitrato ( $\mu\text{M}$ )	13,3 $\pm$ 3,36 <sup>a</sup>	15,5 $\pm$ 2,19 <sup>b</sup>	22,5 $\pm$ 2,94 <sup>c</sup>

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Las poblaciones con CCR presentan concentraciones tanto de nitrito como de nitrato significativamente superiores al grupo control. Además, esta diferencia de concentración también se hace significativa entre las dos poblaciones con CCR. El incremento de concentración respecto al grupo control, en el caso del nitrito, es de un 12% en la población M<sub>0</sub> y de un 66% para el grupo M<sub>1</sub>. Asimismo, el incremento detectado para el nitrato, es de un 16% para la población sin metástasis y de un 69% para el grupo M<sub>1</sub>.



**Figura 75.** Concentración de indicadores de óxido nítrico en plasma asociado a metástasis respecto a grupo control en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

#### 4.3.3.2.3. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas

##### **a. Lípidos**

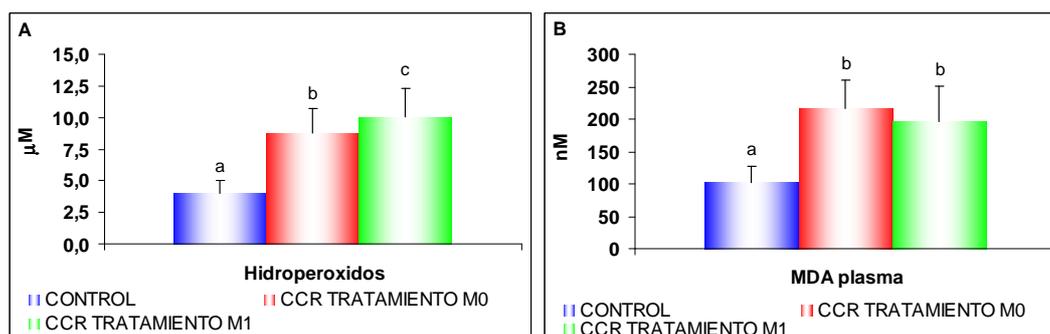
Como parámetros indicativos del daño oxidativo a lípidos se han determinado en plasma los niveles de MDA y la concentración de hidroperóxidos mientras que en linfocitos sólo se ha cuantificado el MDA.

Los resultados en plasma muestran (Tabla XLVIII y Figura 76) que existen diferencias significativas en cuanto a los niveles de hidroperóxidos, entre los dos grupos con CCR ( $M_0$  y  $M_1$ ) y a su vez respecto al grupo control.

**Tabla XLVIII.** Concentración de indicadores del daño a lípidos medido en plasma asociado a metástasis respecto a grupo control en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	Control	$M_0$	$M_1$
Hidroperóxidos ( $\mu\text{M}$ )	$4,03 \pm 0,986^a$	$8,74 \pm 2,00^b$	$10,1 \pm 2,25^c$
MDA-plasma (nM)	$101 \pm 25,3^a$	$216 \pm 44,1^b$	$196 \pm 54,1^b$

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .



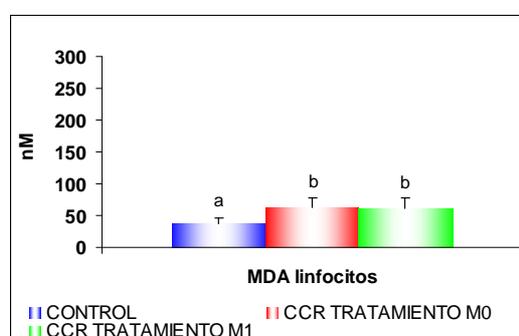
**Figura 76.** Indicadores del daño a lípidos, mediante medida de concentración de hidroperóxidos (A) y MDA (B) medidos en plasma asociado a metástasis respecto a grupo control en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Sin embargo, al medir concentración de MDA, solo se detectan cambios significativos con la población control, tanto en plasma como en linfocitos (Tabla XLIX y Figura 77) y no entre los dos grupos de pacientes con CCR.

**Tabla XLIX.** Concentración de MDA como indicador del daño a lípidos medido en linfocitos asociado a metástasis respecto a grupo control en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	Control	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>
MDA-linfocitos (nM)	36,6 ± 9,09 <sup>a</sup>	62,8 ± 14,4 <sup>b</sup>	61,5 ± 16,7 <sup>b</sup>

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .



**Figura 77.** Concentración de MDA como indicador del daño a lípidos medido en linfocitos asociado a metástasis respecto a grupo control en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

### **b. Proteínas**

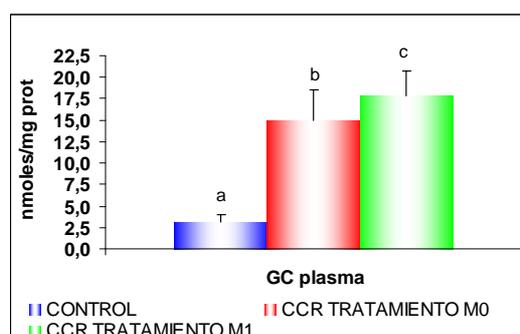
Como parámetros indicativos del daño oxidativo a proteínas se han determinado los niveles de grupos carbonilo (GC) en plasma y en linfocitos.

Tanto en el caso de la determinación en plasma (Tabla L y Figura 78) como en linfocitos (Tabla LI y Figura 79), los resultados muestran diferencias significativas entre los grupos de población estudiados.

**Tabla L.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en plasma asociado a metástasis respecto a grupo control en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	Control	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>
GC-plasma (nmoles/mg proteína)	3,18 ± 0,779 <sup>a</sup>	15,0 ± 3,48 <sup>b</sup>	17,9 ± 2,82 <sup>c</sup>

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .



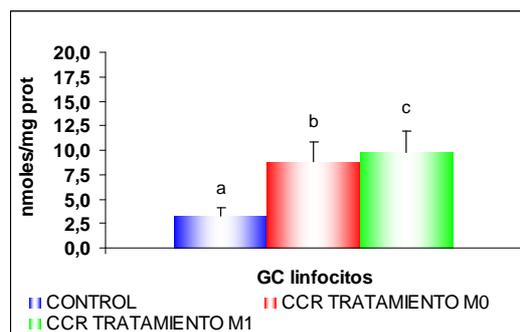
**Figura 78.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en plasma asociado a metástasis respecto a grupo control en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Destacar que las diferencias detectadas son mayores en plasma que en linfocitos, en cuanto a incremento de concentración de GC respecto al grupo control. Así, en plasma se detectan incrementos de concentración de hasta casi 5 veces para el grupo M<sub>0</sub> y de hasta de 5,6 veces para la población M<sub>1</sub>. Sin embargo, las diferencias detectadas en linfocitos son 2,7 veces para M<sub>0</sub> y 3 veces mayores para la población M<sub>1</sub>.

**Tabla LI.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en linfocitos asociado a metástasis respecto a grupo control en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	Control	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>
GC-linfocitos (nmoles/mg proteína)	3,24 ± 0,819 <sup>a</sup>	8,81 ± 2,02 <sup>b</sup>	9,81 ± 2,13 <sup>c</sup>

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .



**Figura 79.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en linfocitos asociado a metástasis respecto a grupo control en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

#### 4.3.3.2.4. Estado Redox

Para el estudio del estado redox se midió la concentración del glutatión (GSH) tanto en plasma como en linfocitos y en plasma se cuantificó la tiorredoxina (Trx) y la tiorredoxina reductasa (TrxR).

En la Tabla LII y en la figura adjunta (Figura 80) se resumen los resultados del estado redox en plasma. Cabe destacar como sólo se detectan diferencias significativas cuando hay metástasis, es decir, los cambios de concentración de los parámetros indicadores del estado redox no son significativos entre la población control y el grupo  $M_0$ , pero sí con la población  $M_1$ .

**Tabla LII.** Estado redox medido en plasma asociado a metástasis respecto a grupo control en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

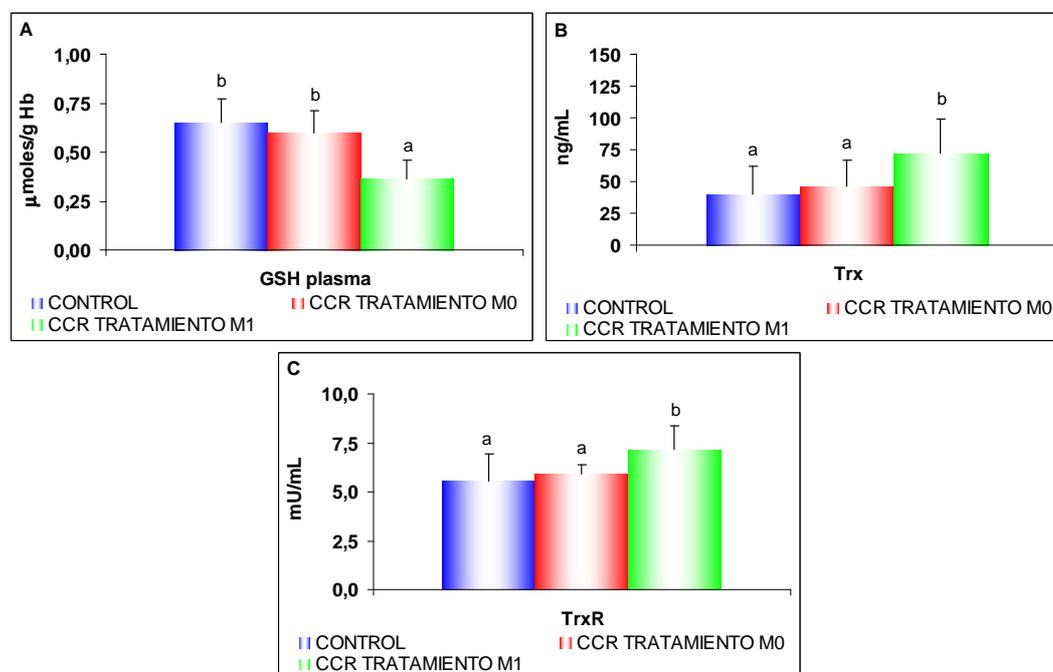
	Control	$M_0$	$M_1$
GSH-plasma ( $\mu$ moles/g Hb)	$0,649 \pm 0,119^b$	$0,596 \pm 0,114^b$	$0,364 \pm 0,093^a$
Trx (ng/mL)	$40,1 \pm 22,0^a$	$46,3 \pm 20,0^a$	$72,0 \pm 26,7^b$
TrxR (mU/mL)	$5,54 \pm 1,36^a$	$5,88 \pm 0,505^a$	$7,15 \pm 1,22^b$

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Así, en el caso del GSH el grupo control presenta la concentración mayor ( $0,649 \pm 0,119$ ), seguido de  $M_0$  ( $0,596 \pm 0,114$ ) y por último de la población  $M_1$  ( $0,364 \pm 0,093$ ).

En cuanto al sistema tiorredoxina, por una parte, la tiorredoxina presenta en el grupo de pacientes  $M_1$  los mayores niveles de concentración, mientras que la

tiorredoxina reductasa, y de forma contraria a lo que cabría esperar de acuerdo a los resultados del estudio anterior, también presenta en la población M<sub>1</sub> los mayores niveles de actividad.



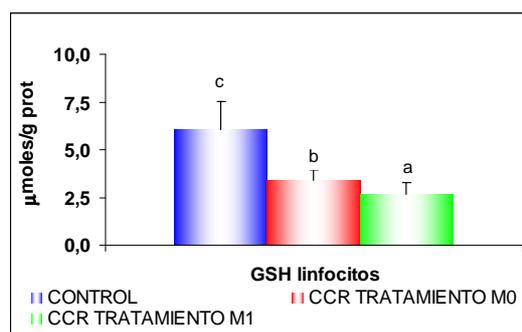
**Figura 80.** Estado redox medido en plasma mediante concentración de GSH (A), Trx (B) y actividad TrxR (C) asociado a metástasis respecto a grupo control en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Respecto al resultado de las mediciones realizadas de GSH en linfocitos (Tabla LIII y Figura 81) sí se detectan cambios significativos entre las tres poblaciones estudiadas, de forma que la mayor concentración se encuentra en el grupo control ( $6,04 \pm 1,46$ ), seguido de M<sub>0</sub> ( $3,40 \pm 0,582$ ) y por último del grupo de pacientes M<sub>1</sub> ( $2,68 \pm 0,572$ ).

**Tabla LIII.** Estado redox medido en linfocitos asociado a metástasis respecto a grupo control en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	Control	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>
GSH-linfocitos (μmoles/g proteína)	$6,04 \pm 1,46^c$	$3,40 \pm 0,582^b$	$2,68 \pm 0,572^a$

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .



**Figura 81.** Estado redox medido en linfocitos asociado a metástasis respecto a grupo control en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

#### 4.3.3.3. Estudio del estrés oxidativo en cáncer colorrectal asociado al tipo de metástasis en un grupo de pacientes en tratamiento quimioterápico

Por último, se ha realizado el análisis del estrés oxidativo asociado al tipo de metástasis en una población con CCR y en tratamiento quimioterápico. Para ello, los tipos de metástasis se han clasificado en tres grupos, hepáticas, la más comúnmente asociada al CCR, no hepáticas y hepáticas más otras, asociadas éstas últimas a estadios más avanzados de la enfermedad.

##### 4.3.3.3.1. Capacidad antioxidante total del plasma

La Tabla LIV y la Figura 82 adjunta recogen el valor promedio obtenido de la determinación de los parámetros indicadores de la capacidad antioxidante total del plasma.

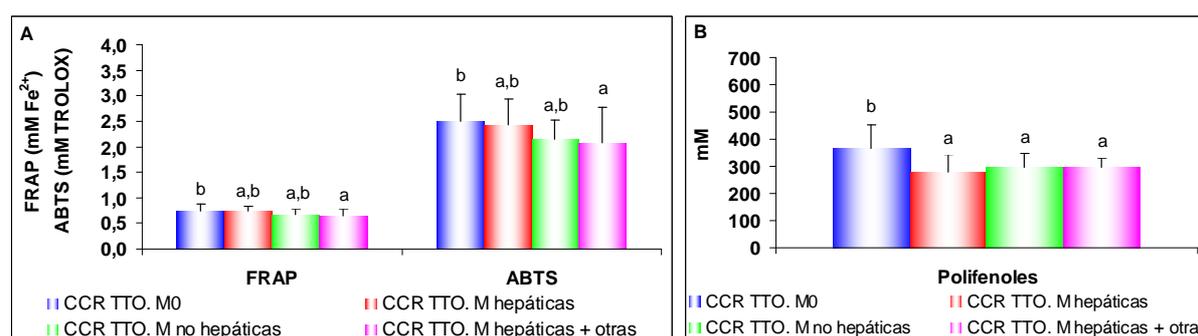
**Tabla LIV.** Capacidad antioxidante total del plasma asociado al tipo de metástasis en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub> hepáticas	M <sub>1</sub> no hepáticas	M <sub>1</sub> hepáticas + otras
FRAP (mM Fe <sup>2+</sup> )	0,742 ± 0,129 <sup>b</sup>	0,736 ± 0,094 <sup>a,b</sup>	0,673 ± 0,124 <sup>a,b</sup>	0,653 ± 0,142 <sup>a</sup>
ABTS (mM TROLOX)	2,49 ± 0,547 <sup>b</sup>	2,42 ± 0,501 <sup>a,b</sup>	2,16 ± 0,369 <sup>a,b</sup>	2,08 ± 0,696 <sup>a</sup>
Polifenoles (mM)	364 ± 86,9 <sup>b</sup>	279 ± 64,6 <sup>a</sup>	294 ± 51,8 <sup>a</sup>	297 ± 32,5 <sup>a</sup>

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Los resultados muestran que existe una capacidad antioxidante significativamente menor en el grupo de pacientes cuya metástasis está en un

estado más avanzado. Los pacientes con metástasis hepática y no hepática se encontrarían en una situación intermedia entre el grupo M<sub>0</sub> y el de los pacientes con metástasis hepáticas y otras, sin que estas diferencias sean significativas ni entre ellos, ni entre los dos estados extremos, en el caso de la valoración de la capacidad antioxidante por el método FRAP y el ABTS. En cuanto a la concentración de polifenoles, solo se detectan diferencias significativas con respecto a la población sin metástasis.



**Figura 82.** Capacidad antioxidante total del plasma mediante método FRAP y ABTS (A) y polifenoles (B) asociado al tipo de metástasis en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

#### 4.3.3.3.2. Biomarcadores de óxido nítrico en plasma

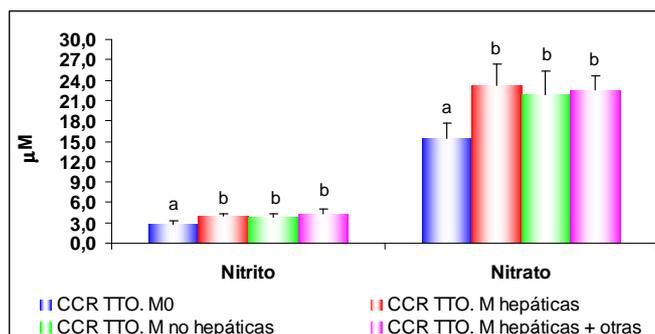
Los resultados de los niveles de nitrito y nitrato como indicadores de óxido nítrico en plasma se muestran en la Tabla LV y en la Figura 83.

**Tabla LV.** Concentración de indicadores de óxido nítrico en plasma asociado al tipo de metástasis en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub> hepáticas	M <sub>1</sub> no hepáticas	M <sub>1</sub> hepáticas + otras
Nitrito (μM)	2,72 ± 0,658 <sup>a</sup>	3,91 ± 0,375 <sup>b</sup>	3,85 ± 0,445 <sup>b</sup>	4,30 ± 0,808 <sup>b</sup>
Nitrato (μM)	15,5 ± 2,19 <sup>a</sup>	23,2 ± 3,14 <sup>b</sup>	21,9 ± 3,40 <sup>b</sup>	22,5 ± 2,18 <sup>b</sup>

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Las poblaciones con metástasis presentan concentraciones tanto de nitrito como de nitrato significativamente superiores al grupo sin metástasis. A pesar de que los niveles de concentración de estas especies varían según el tipo de metástasis, no se detectan diferencias significativas entre los diferentes tipos estudiados.



**Figura 83.** Concentración de indicadores de óxido nítrico en plasma asociado al tipo de metástasis en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

#### 4.3.3.3.3. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas

##### **a. Lípidos**

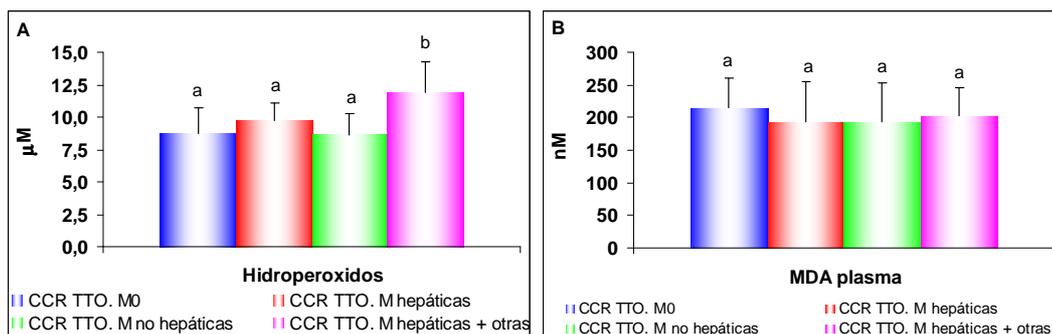
Como parámetros indicativos del daño oxidativo a lípidos se han determinado en plasma los niveles de MDA y la concentración de hidroperóxidos mientras que en linfocitos sólo se ha cuantificado el MDA.

Los resultados relativos a la concentración de hidroperóxidos en plasma muestran (Tabla LVI y Figura 84) que sólo existe diferencia significativa cuando el tipo de metástasis corresponde a un estado de enfermedad más avanzado.

**Tabla LVI.** Concentración de indicadores del daño a lípidos medido en plasma asociado al tipo de metástasis en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub> hepáticas	M <sub>1</sub> no hepáticas	M <sub>1</sub> hepáticas + otras
Hidroperóxidos (mM)	8,74 ± 2,00 <sup>a</sup>	9,72 ± 1,39 <sup>a</sup>	8,64 ± 1,65 <sup>a</sup>	11,9 ± 2,35 <sup>b</sup>
MDA-plasma (nM)	216 ± 44,1 <sup>a</sup>	193 ± 60,8 <sup>a</sup>	194 ± 60,1 <sup>a</sup>	202 ± 44,6 <sup>a</sup>

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .



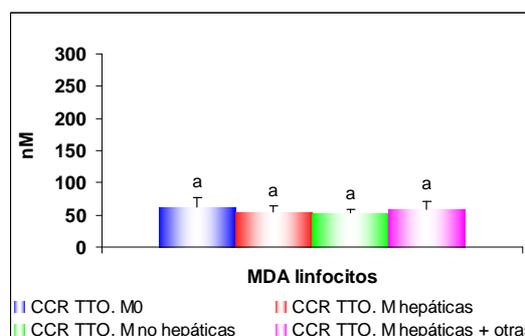
**Figura 84.** Indicadores del daño a lípidos, mediante medida de concentración de hidroperóxidos (A) y MDA (B) medidos en plasma asociado al tipo de metástasis en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

En cuanto a los niveles de MDA, medidos tanto en plasma como en linfocitos (Tabla LVII y Figura 85), no se detectan diferencias significativas entre ninguna de las poblaciones estudiadas.

**Tabla LVII.** Concentración de MDA como indicador del daño a lípidos medido en linfocitos asociado al tipo de metástasis en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub> hepáticas	M <sub>1</sub> no hepáticas	M <sub>1</sub> hepáticas + otras
MDA-linfocitos (nM)	62,8 ± 14,5 <sup>a</sup>	54,3 ± 9,09 <sup>a</sup>	53,2 ± 5,12 <sup>a</sup>	58,5 ± 11,9 <sup>a</sup>

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .



**Figura 85.** Concentración de MDA como indicador del daño a lípidos medido en linfocitos asociado al tipo de metástasis en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

### b. Proteínas

Como parámetros indicativos del daño oxidativo a proteínas se han determinado los niveles de grupos carbonilo (GC) en plasma y en linfocitos.

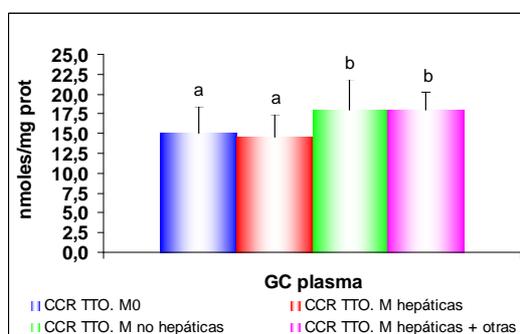
Tanto en el caso de la determinación en plasma (Tabla LVIII y Figura 86) como en linfocitos (Tabla LIX y Figura 87), los resultados muestran diferencias

significativas entre la población sin metástasis o bien con metástasis hepáticas respecto a los pacientes pertenecientes a los grupos con metástasis no hepáticas o con un mayor avance de la enfermedad (hepáticas + otras).

**Tabla LVIII.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en plasma asociado al tipo de metástasis en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub> hepáticas	M <sub>1</sub> no hepáticas	M <sub>1</sub> hepáticas + otras
GC-plasma (nmoles/mg proteína)	15,0 ± 3,48 <sup>a</sup>	14,5 ± 2,84 <sup>a</sup>	17,9 ± 3,93 <sup>b</sup>	18,0 ± 2,20 <sup>b</sup>

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

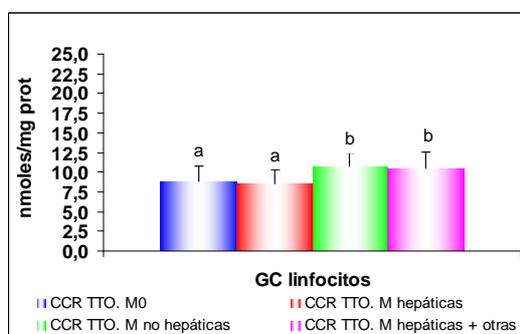


**Figura 86.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en plasma asociado al tipo de metástasis en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

**Tabla LIX.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en linfocitos asociado al tipo de metástasis en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub> hepáticas	M <sub>1</sub> no hepáticas	M <sub>1</sub> hepáticas + otras
GC-linfocitos (nmoles/mg proteína)	8,81 ± 2,02 <sup>a</sup>	8,57 ± 1,76 <sup>a</sup>	10,8 ± 1,69 <sup>b</sup>	10,5 ± 2,13 <sup>b</sup>

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .



**Figura 87.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en linfocitos asociado al tipo de metástasis en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

#### 4.3.3.3.4. Estado Redox

Para el estudio del estado redox se midió en plasma y en linfocitos la concentración del glutatión (GSH) y en plasma la tiorredoxina (Trx) y la tiorredoxina reductasa (TrxR).

En las Tabla LX y en la figura adjunta (Figura 88) se resumen los resultados del estado redox en plasma.

**Tabla LX.** Estado redox medido en plasma asociado al tipo de metástasis en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

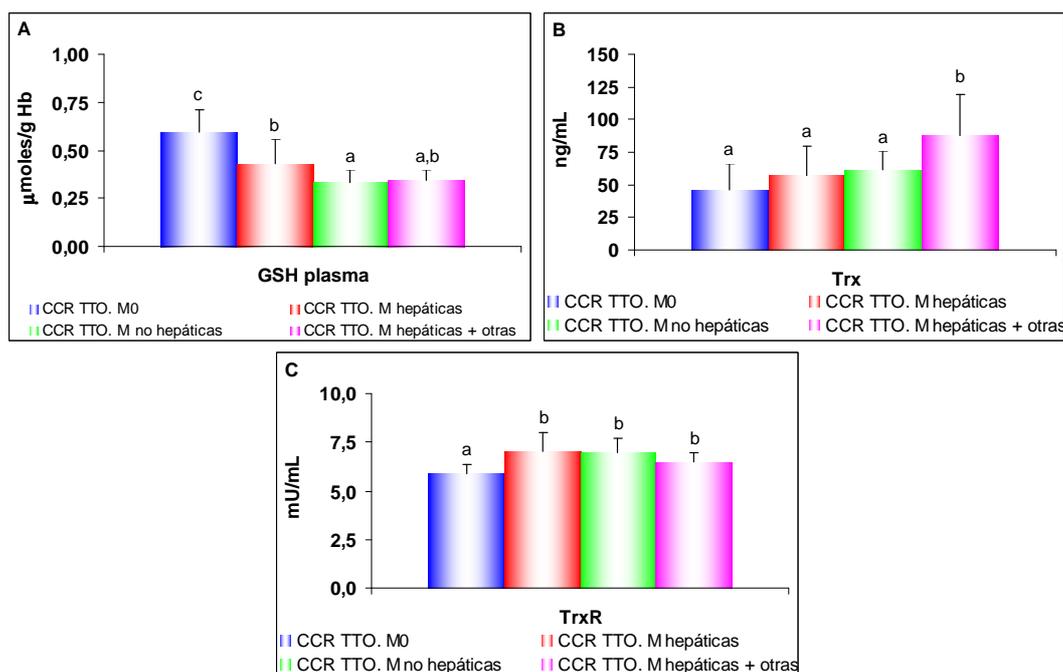
	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub> hepáticas	M <sub>1</sub> no hepáticas	M <sub>1</sub> hepáticas + otras
GSH-plasma ( $\mu$ moles/g Hb)	0,596 $\pm$ 0,114 <sup>c</sup>	0,432 $\pm$ 0,127 <sup>b</sup>	0,331 $\pm$ 0,070 <sup>a</sup>	0,347 $\pm$ 0,055 <sup>a,b</sup>
Trx (ng/mL)	46,3 $\pm$ 20,0 <sup>a</sup>	57,3 $\pm$ 22,0 <sup>a</sup>	61,0 $\pm$ 15,0 <sup>a</sup>	87,7 $\pm$ 31,9 <sup>b</sup>
TrxR (mU/mL)	5,88 $\pm$ 0,505 <sup>a</sup>	7,03 $\pm$ 0,950 <sup>b</sup>	6,96 $\pm$ 0,721 <sup>b</sup>	6,50 $\pm$ 0,450 <sup>b</sup>

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Respecto al GSH en plasma, se detectan cambios significativos entre la población M<sub>0</sub> y los grupos de pacientes que presentan diferentes tipos de metástasis. No obstante, la diferente concentración de GSH existente de un tipo de metástasis a otra, no es significativa entre el grupo de pacientes con enfermedad más avanzada (metástasis hepática + otras) con respecto a las poblaciones con metástasis hepática o no hepática.

En cuanto a la tiorredoxina, el grupo con metástasis hepática + otras presenta la concentración más elevada (87,7  $\pm$  31,9) y es el único que tiene diferencias significativas con respecto al resto de poblaciones estudiadas.

Por otra parte, el grupo sin metástasis (M<sub>0</sub>) presenta el menor valor de actividad de la tiorredoxina reductasa, siendo esta diferencia significativa respecto al resto de grupos estudiados.



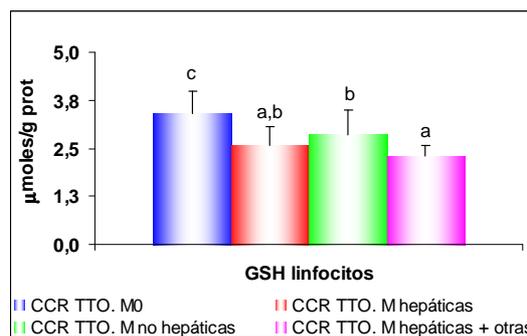
**Figura 88.** Estado redox medido en plasma mediante concentración de GSH (A), Trx (B) y actividad TrxR (C) asociado a metástasis respecto a grupo control en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. Letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

Respecto al resultado de las mediciones realizadas de GSH en linfocitos (Tabla LXI y Figura 89) se detectan cambios significativos entre los grupos  $M_0$  ( $3,40 \pm 0,582$ ), la población con metástasis no hepáticas ( $2,86 \pm 0,624$ ) y los pacientes con metástasis hepáticas + otras ( $2,31 \pm 0,258$ ). La población formada por el grupo de pacientes con metástasis hepáticas ( $2,59 \pm 0,492$ ) no presenta diferencias con las otras dos poblaciones con metástasis pero sí con el grupo  $M_0$ .

**Tabla LXI.** Estado redox medido en linfocitos asociado al tipo de metástasis en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	$M_0$	$M_1$ hepáticas	$M_1$ no hepáticas	$M_1$ hepáticas + otras
GSH-linfocitos (μmoles/g proteína)	$3,40 \pm 0,582^c$	$2,59 \pm 0,492^{a,b}$	$2,86 \pm 0,624^b$	$2,31 \pm 0,258^a$

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .



**Figura 89.** Estado redox medido en linfocitos asociado al tipo de metástasis en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. Filas con letras distintas indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

#### **4.3.4. Estudio del estrés oxidativo asociado a concentración de los marcadores tumorales CEA y Ca 19.9 en pacientes con cáncer colorrectal**

A continuación se recoge el estudio realizado sobre las diferencias existentes en los niveles de estrés oxidativo entre dos poblaciones con cáncer colorrectal, sometidas a tratamiento quimioterápico, y con concentraciones igual o mayor y menor, respectivamente, del límite patológico de dos de los marcadores tumorales más ampliamente empleados en la monitorización de esta enfermedad, CEA y Ca 19.9. El análisis de estos resultados permitirá evaluar como se relaciona la concentración de los marcadores tumorales, como indicadores de evolución de enfermedad, con el nivel de estrés oxidativo existente en los grupos de población con CCR.

##### **4.3.4.1. Estudio del estrés oxidativo en cáncer colorrectal asociado a concentración de CEA en un grupo de pacientes en tratamiento quimioterápico**

En el caso del estudio correspondiente al marcador CEA (antígeno carcinoembrionario) se ha contado con un grupo de pacientes con cáncer colorrectal y en régimen quimioterápico, los cuales se han clasificado en dos poblaciones, tomando para ello el límite marcado por el laboratorio de referencia, valor a partir del cual se sospecha de la existencia de algún proceso patológico ( $\geq 5$  ng/mL), fundamentalmente de tipo tumoral.

#### 4.3.4.1.1. Capacidad antioxidante total del plasma

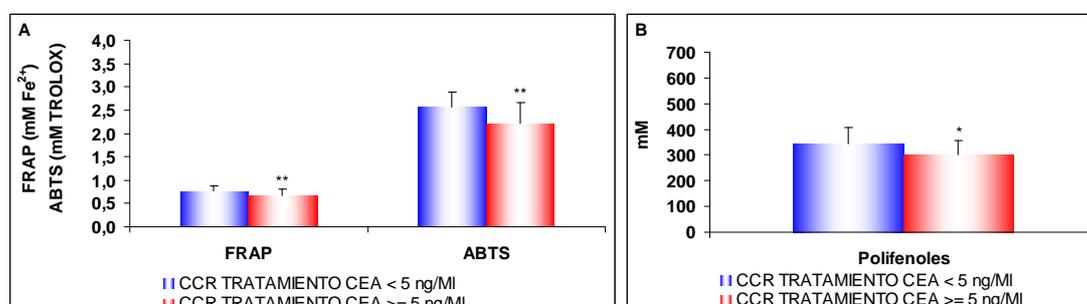
La Tabla LXII y la figura adjunta (Figura 90) recogen el valor promedio obtenido de la determinación de los parámetros indicadores de la capacidad antioxidante total del plasma.

**Tabla LXII.** Capacidad antioxidante total del plasma asociado a concentración de CEA en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	CEA < 5 ng/mL	CEA ≥ 5 ng/mL	<i>p</i>
FRAP (mM Fe <sup>2+</sup> )	0,767 ± 0,100	0,679 ± 0,126	0,0037**
ABTS (mM TROLOX)	2,57 ± 0,330	2,23 ± 0,430	0,0025**
Polifenoles (mM)	342 ± 65,5	303 ± 53,0	0,0266*

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \* y \*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  y  $p < 0,005$  respectivamente cuando se compara población con CEA ≥ 5 ng/mL vs CEA < 5 ng/mL.

Los resultados muestran que existe una capacidad antioxidante significativamente mayor en el grupo de sujetos cuya concentración de CEA es menor de 5 ng/mL respecto a la población con valores mayores de marcador.



**Figura 90.** Capacidad antioxidante total del plasma mediante método FRAP y ABTS (A) y polifenoles (B) asociado a concentración de CEA en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. \* y \*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  y  $p < 0,005$  respectivamente.

Destacar que esta mayor capacidad antioxidante es similar (incremento de en torno a un 15%), cuando se valora a través del método FRAP ( $p=0,0037$ ) que cuando es empleando el método ABTS ( $p=0,0025$ ), y con parecidos niveles de significancia. Asimismo, la concentración de polifenoles en el grupo de pacientes con CEA menor es un 13% mayor respecto a la población con valores de CEA ≥ 5 ng/mL.

#### 4.3.4.1.2. Biomarcadores de óxido nítrico en plasma

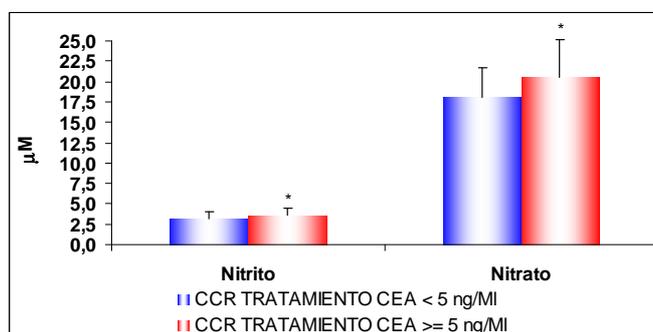
Los resultados de los niveles de nitrito y nitrato como indicadores de óxido nítrico en plasma se muestran en la Tabla LXIII y en la Figura 91.

**Tabla LXIII.** Concentración de indicadores de óxido nítrico en plasma asociado a concentración de CEA en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	CEA < 5 ng/mL	CEA ≥ 5 ng/mL	P
Nitrito (μM)	3,19 ± 0,801	3,64 ± 0,826	0,0349*
Nitrato (μM)	18,1 ± 3,60	20,5 ± 4,66	0,0273*

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$  cuando se compara población con CEA ≥ 5 ng/mL vs CEA < 5 ng/mL.

La población con niveles más altos de marcador tumoral (≥ 5 ng/mL) presenta unos valores promedio para el nitrito (3,64 ± 0,826) y el nitrato (20,5 ± 4,66) significativamente superiores a los encontrados en los enfermos de CCR con concentraciones inferiores a 5 mg/mL (3,19 ± 0,801 y 18,1 ± 3,60, respectivamente).



**Figura 91.** Concentración de indicadores de óxido nítrico en plasma asociado a concentración de CEA en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

#### 4.3.4.1.3. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas

##### **a. Lípidos**

Como parámetros indicativos del daño oxidativo a lípidos se han determinado en plasma los niveles de MDA y la concentración de hidroperóxidos, mientras que en linfocitos sólo se ha cuantificado el MDA.

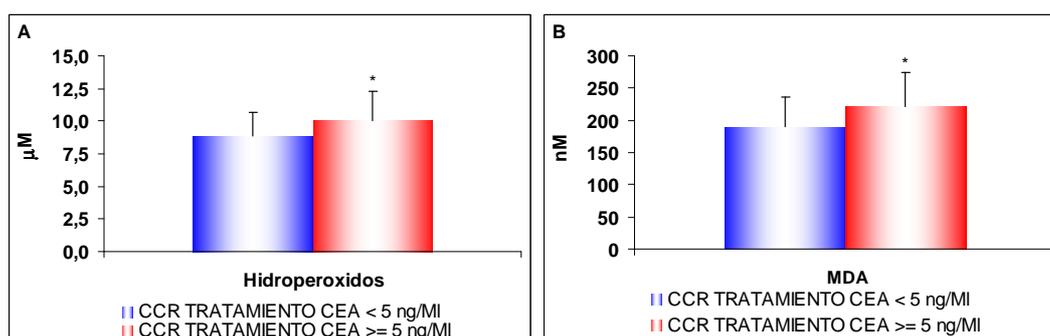
Los resultados en plasma muestran (Tabla LXIV y Figura 92) que existen diferencias significativas en cuanto a los niveles de hidroperóxidos y MDA, entre los dos grupos de población.

**Tabla LXIV.** Concentración de indicadores del daño a lípidos medido en plasma asociado a concentración de CEA en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	CEA < 5 ng/mL	CEA ≥ 5 ng/mL	<i>p</i>
Hidroperóxidos (μM)	8,83 ± 1,86	10,0 ± 2,23	0,0215*
MDA-plasma (nM)	191 ± 44,4	222 ± 52,6	0,0226*

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$  cuando se compara población con CEA ≥ 5 ng/mL vs CEA < 5 ng/mL.

Así, el grupo cuya concentración de CEA es menor que 5 ng/mL, presentaría menor daño lipídico que los pacientes que tienen valores del marcador tumoral por encima del límite referenciado.



**Figura 92.** Indicadores del daño a lípidos, mediante medida de concentración de hidroperóxidos (A) y MDA (B) medidos en plasma asociado a concentración de CEA en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

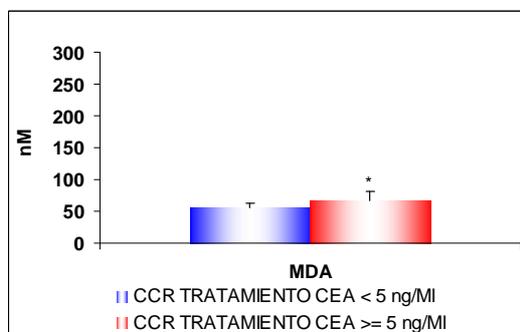
Al evaluar el daño a lípidos en linfocitos (Tabla LXV y Figura 93) a través de la concentración de MDA, también se encuentran diferencias significativas entre los dos grupos estudiados.

**Tabla LXV.** Concentración de MDA como indicador del daño a lípidos medido en linfocitos asociado a concentración de CEA en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	CEA < 5 ng/mL	CEA ≥ 5 ng/mL	<i>p</i>
MDA-linfocitos (nM)	55,2 ± 8,48	67,5 ± 14,1	0,0299*

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$  cuando se compara población con CEA ≥ 5 ng/mL vs CEA < 5 ng/mL.

Destacar que el incremento de concentración de MDA medido entre las dos poblaciones estudiadas es mayor en linfocitos (22%) que en plasma (16%), aunque el nivel de significancia es similar en ambos medios.



**Figura 93.** Concentración de MDA como indicador del daño a lípidos medido en linfocitos asociado a concentración de CEA en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

### b. Proteínas

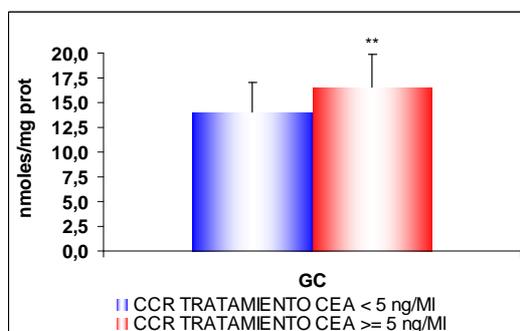
Como parámetros indicativos del daño oxidativo a proteínas se han determinado los niveles de grupos carbonilo (GC) en plasma y en linfocitos.

Tanto en el caso de la determinación en plasma (Tabla LXVI y Figura 94) como en linfocitos (Tabla LXVII y Figura 95), los resultados muestran diferencias significativas entre los grupos de población estudiados.

**Tabla LXVI.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en plasma asociado a concentración de CEA en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	CEA < 5 ng/mL	CEA $\geq$ 5 ng/mL	$p$
GC-plasma (nmoles/mg proteína)	14,1 $\pm$ 2,92	16,6 $\pm$ 3,31	0,0036**

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. \*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,005$  cuando se compara población con CEA  $\geq$  5 ng/mL vs CEA < 5 ng/mL.



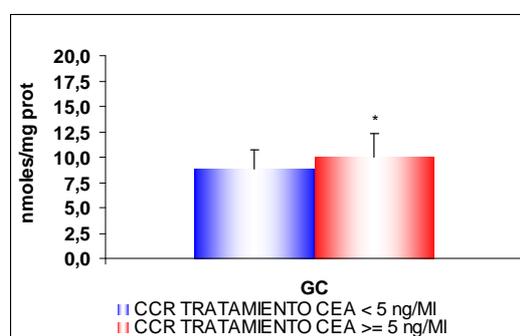
**Figura 94.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en plasma asociado a concentración de CEA en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. \*\* indica diferencias significativas con  $p < 0,005$ .

Destacar que las diferencias detectadas son mayores en plasma (18%) que en linfocitos (13%), en cuanto a incremento de concentración de GC, y además en plasma esta diferencia presenta mayor nivel de significancia.

**Tabla LXVII.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en linfocitos asociado a concentración de CEA en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	CEA < 5 ng/mL	CEA ≥ 5 ng/mL	<i>p</i>
GC-linfocitos (nmoles/mg proteína)	8,86 ± 1,83	10,0 ± 2,32	0,0374*

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$  cuando se compara población con CEA ≥ 5 ng/mL vs CEA < 5 ng/mL.



**Figura 95.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en linfocitos asociado a concentración de CEA en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

#### 4.3.4.1.4. Estado Redox

Para el estudio del estado redox se midió la concentración del glutatión (GSH), tanto en plasma como en linfocitos, y en plasma se valoró el sistema tiorredoxina, formado por la tiorredoxina (Trx) y la tiorredoxina reductasa (TrxR).

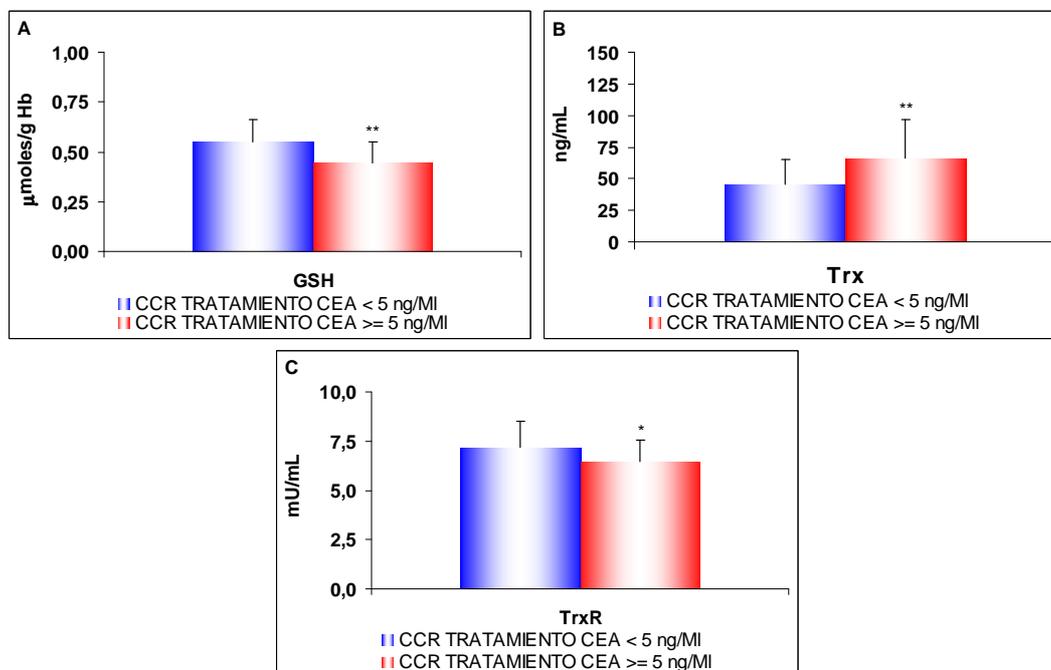
En la Tabla LXVIII y en la figura adjunta (Figura 96) se resumen los resultados del estado redox en plasma.

**Tabla LXVIII.** Estado redox medido en plasma asociado a concentración de CEA en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	CEA < 5 ng/mL	CEA ≥ 5 ng/mL	<i>p</i>
GSH-plasma (μmoles/g Hb)	0,550 ± 0,110	0,443 ± 0,108	0,0039**
Trx (ng/mL)	45,8 ± 19,2	66,0 ± 31,2	0,0042**
TrxR (mU/mL)	7,21 ± 1,28	6,47 ± 1,05	0,0145*

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \* y \*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  y  $p < 0,005$  respectivamente cuando se compara población con CEA ≥ 5 ng/mL vs CEA < 5 ng/mL.

Así, en el caso del GSH se detectan cambios significativos ( $p=0,0039$ ) entre los dos grupos estudiados ( $0,550 \pm 0,110$  y  $0,443 \pm 0,108$  en pacientes con CEA menor de 5 ng/mL y con CEA mayor o igual que 5 ng/mL, respectivamente).



**Figura 96.** Estado redox medido en plasma mediante concentración de GSH (A), Trx (B) y actividad TrxR (C) asociado a concentración de CEA en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. \* y \*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  y  $p < 0,005$  respectivamente.

En cuanto al sistema tiorredoxina, también se encuentran diferencias significativas en ambos parámetros para los dos grupos estudiados. Así, los pacientes que tienen valores de CEA iguales o por encima de 5 ng/mL, poseen una concentración de tiorredoxina mayor ( $66,0 \pm 31,2$ ) que la población con valores más bajos de marcador ( $45,8 \pm 19,2$ ). En el caso de la tiorredoxina reductasa, es el grupo con valores bajos de CEA (< 5 ng/mL) el que presenta mayor actividad enzimática.

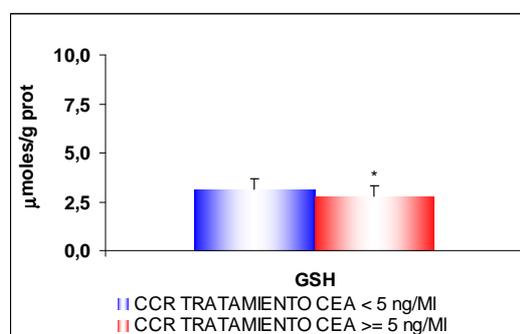
Respecto al resultado de las mediciones realizadas de GSH en linfocitos (Tabla LXIX y Figura 97), al igual que ocurre en plasma, se detectan cambios significativos ( $p=0,0342$ ) entre el grupo de pacientes con CEA menor de 5 ng/mL ( $3,10 \pm 0,594$ ) y el grupo de población con concentraciones de marcador por encima de los límites de referencia ( $2,75 \pm 0,543$ ).

**Tabla LXIX.** Estado redox medido en linfocitos asociado a concentración de CEA en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	CEA < 5 ng/mL	CEA ≥ 5 ng/mL	<i>p</i>
GSH-linfocitos (μmoles/g proteína)	3,10 ± 0,594	2,75 ± 0,543	0,0342*

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$  cuando se compara población con CEA ≥ 5 ng/mL vs CEA < 5 ng/mL.

Cabe destacar, que la diferencia detectada, en cuanto a incremento de concentración de GSH es, además de más significativa, más acusada en el caso de las mediciones realizadas en plasma (24%) respecto al resultado obtenido en linfocitos (13%).



**Figura 97.** Estado redox medido en linfocitos asociado a concentración de CEA en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. \* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

#### **4.3.4.2. Estudio del estrés oxidativo en cáncer colorrectal asociado a concentración de Ca 19.9 en un grupo de pacientes en tratamiento quimioterápico**

En el caso del estudio correspondiente al marcador Ca 19.9, se ha contado con un grupo de pacientes con cáncer colorrectal y bajo tratamiento quimioterápico, clasificándoles en dos poblaciones, tomando para ello el límite marcado por el laboratorio de referencia, valor a partir del cual se sospecha de la existencia de algún proceso patológico ( $\geq 37$  U/mL), fundamentalmente de tipo tumoral.

##### **4.3.4.2.1. Capacidad antioxidante total del plasma**

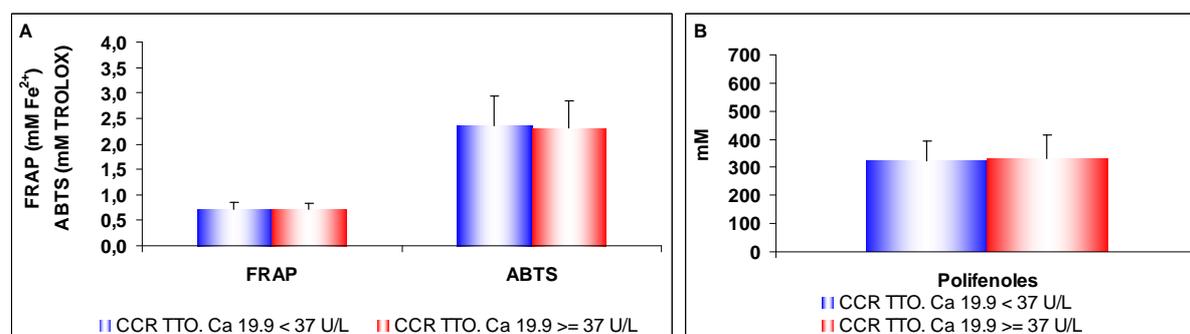
La Tabla LXX y la Figura 98 adjunta recogen el valor promedio obtenido de la determinación de los parámetros indicadores de la capacidad antioxidante total del plasma.

**Tabla LXX.** Capacidad antioxidante total del plasma asociado a concentración de Ca 19.9 en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	Ca 19.9 < 37 U/mL	Ca 19.9 ≥ 37 U/mL	<i>p</i>
FRAP (mM Fe <sup>2+</sup> )	0,714 ± 0,132	0,706 ± 0,121	0,8311
ABTS (mM TROLOX)	2,37 ± 0,569	2,31 ± 0,534	0,6684
Polifenoles (mM)	321 ± 73,3	332 ± 82,2	0,5596

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. *p* > 0,05 indica que no hay diferencias significativas cuando se compara población con Ca 19.9 ≥ 37 U/mL vs Ca 19.9 < 37 U/mL.

Los resultados muestran que no existe diferencia en cuanto a capacidad antioxidante, en base a los resultados de los parámetros medidos, entre ambos grupos de población.



**Figura 98.** Capacidad antioxidante total del plasma mediante método FRAP y ABTS (A) y polifenoles (B) asociado a concentración de Ca 19.9 en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

#### 4.3.4.2.2. Biomarcadores de óxido nítrico en plasma

Los resultados de los niveles de nitrito y nitrato como indicadores de óxido nítrico en plasma se muestran en la Tabla LXXI y en la Figura 99.

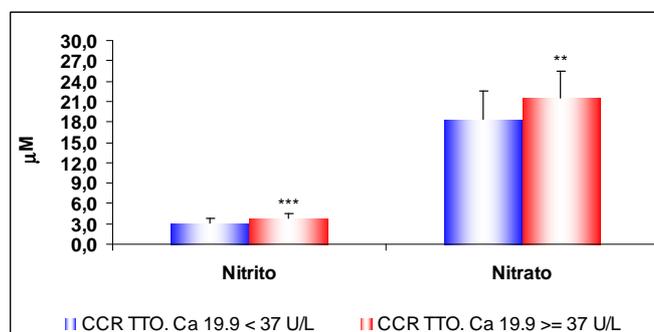
**Tabla LXXI.** Concentración de indicadores de óxido nítrico en plasma asociado a concentración de Ca 19.9 en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	Ca 19.9 < 37 U/mL	Ca 19.9 ≥ 37 U/mL	<i>p</i>
Nitrito (μM)	3,09 ± 0,744	3,82 ± 0,695	<0,0005***
Nitrato (μM)	18,3 ± 4,22	21,5 ± 4,00	0,0051**

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. \*\* y \*\*\* indican diferencias significativas con *p* < 0,005 y *p* < 0,0005 respectivamente cuando se compara población con Ca 19.9 ≥ 37 U/mL vs Ca 19.9 < 37 U/mL.

La población con concentración de Ca 19.9 superior al límite referenciado (≥ 37 U/mL) presenta unos valores promedio para el nitrito (3,82 ± 0,695) y el nitrato (21,5

$\pm 4,00$ ) significativamente superiores a los encontrados en los enfermos de CCR con concentraciones inferiores a 37 U/mL ( $3,09 \pm 0,744$  y  $18,3 \pm 4,22$ , respectivamente).



**Figura 99.** Concentración de indicadores de óxido nítrico en plasma asociado a concentración de Ca 19.9 en una población con CCR en tratamiento quimioterápico. \*\* y \*\*\* indican diferencias significativas con  $p < 0,005$  y  $p < 0,0005$  respectivamente.

#### 4.3.4.2.3. Biomarcadores de daño oxidativo a biomoléculas

##### **a. Lípidos**

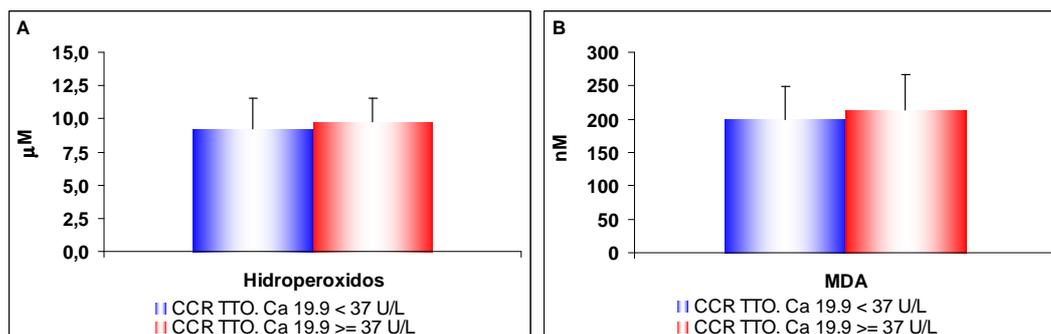
Como parámetros indicativos del daño oxidativo a lípidos se han determinado en plasma los niveles de MDA y la concentración de hidroperóxidos, mientras que en linfocitos sólo se ha cuantificado el MDA.

Los resultados en plasma muestran (Tabla LXXII y Figura 100) que las diferencias de concentración detectadas no son significativas en cuanto a los niveles de hidroperóxidos y MDA, entre los dos grupos de población.

**Tabla LXXII.** Concentración de indicadores del daño a lípidos medido en plasma asociado a concentración de Ca 19.9 en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	Ca 19.9 < 37 U/mL	Ca 19.9 ≥ 37 U/mL	<i>p</i>
Hidroperóxidos (µM)	9,21 ± 2,30	9,79 ± 1,72	0,2868
MDA-plasma (nM)	200 ± 47,9	213 ± 54,4	0,3877

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar.  $p > 0,05$  indica que no hay diferencias significativas cuando se compara población con Ca 19.9  $\geq$  37 U/mL vs Ca 19.9 < 37 U/mL.



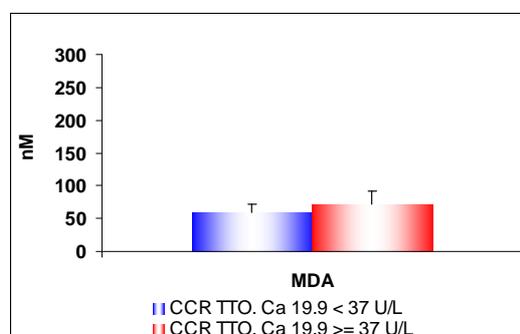
**Figura 100.** Indicadores del daño a lípidos, mediante medida de concentración de hidroperóxidos (A) y MDA (B) medidos en plasma asociado a concentración de Ca 19.9 en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

Al evaluar el daño a lípidos en linfocitos (Tabla LXXIII y Figura 101) a través de la concentración de MDA, tampoco se encuentra que la diferencia sea significativa entre los dos grupos estudiados.

**Tabla LXXIII.** Concentración de MDA como indicador del daño a lípidos medido en linfocitos asociado a concentración de Ca 19.9 en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	Ca 19.9 < 37 U/mL	Ca 19.9 ≥ 37 U/mL	<i>p</i>
MDA-linfocitos (nM)	59,0 ± 12,9	72,2 ± 19,4	0,0646

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar.  $p > 0,05$  indica que no hay diferencias significativas cuando se compara población con Ca 19.9 ≥ 37 U/mL vs Ca 19.9 < 37 U/mL.



**Figura 101.** Concentración de MDA como indicador del daño a lípidos medido en linfocitos asociado a concentración de Ca 19.9 en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

### b. Proteínas

Como parámetros indicativos del daño oxidativo a proteínas se han determinado los niveles de grupos carbonilo (GC) en plasma y en linfocitos.

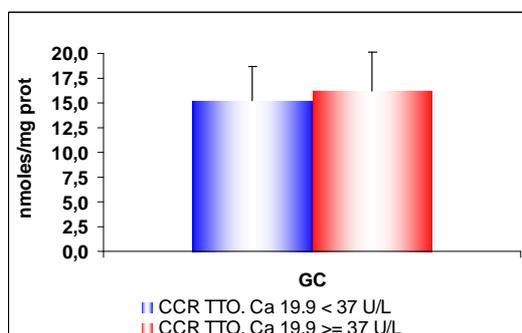
Tanto en el caso de la determinación en plasma (Tabla LXXIV y Figura 102) como en linfocitos (Tabla LXXV y Figura 103), los resultados muestran que las

diferencias detectadas no son significativas entre los grupos de población estudiados.

**Tabla LXXIV.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en plasma asociado a concentración de Ca 19.9 en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	Ca 19.9 < 37 U/mL	Ca 19.9 ≥ 37 U/mL	<i>p</i>
GC-plasma (nmoles/mg proteína)	15,3 ± 3,43	16,2 ± 3,83	0,3120

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. *p* > 0,05 indica que no hay diferencias significativas cuando se compara población con Ca 19.9 ≥ 37 U/mL vs Ca 19.9 < 37 U/mL.

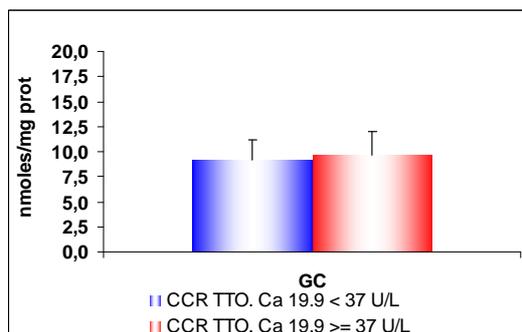


**Figura 102.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en plasma asociado a concentración de Ca 19.9 en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

**Tabla LXXV.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en linfocitos asociado a concentración de Ca 19.9 en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	Ca 19.9 < 37 U/mL	Ca 19.9 ≥ 37 U/mL	<i>p</i>
GC-linfocitos (nmoles/mg proteína)	9,19 ± 2,01	9,67 ± 2,31	0,3835

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar. *p* > 0,05 indica que no hay diferencias significativas cuando se compara población con Ca 19.9 ≥ 37 U/mL vs Ca 19.9 < 37 U/mL.



**Figura 103.** Concentración de GC como indicador del daño a proteínas medido en linfocitos asociado a concentración de Ca 19.9 en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

## 4.3.4.2.4. Estado Redox

Para el estudio del estado redox se midió en plasma y en linfocitos la concentración del glutatión (GSH), y en plasma se cuantificó el sistema tiorredoxina, formado por la tiorredoxina (Trx) y la tiorredoxina reductasa (TrxR).

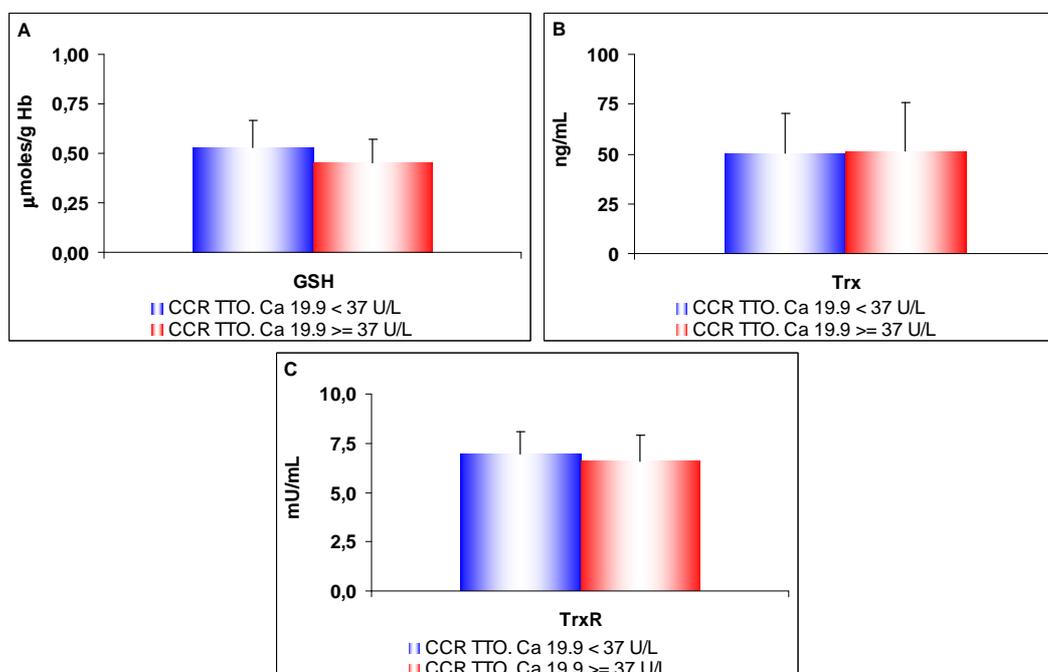
En las Tablas LXXVI y LXXVII y en las figuras adjuntas (Figura 104 y Figura 105) se resumen los resultados del estado redox en plasma y en linfocitos.

**Tabla LXXVI.** Estado redox medido en plasma asociado a concentración de Ca 19.9 en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	Ca 19.9 < 37 U/mL	Ca 19.9 ≥ 37 U/mL	<i>p</i>
GSH-plasma ( $\mu$ moles/g Hb)	0,532 $\pm$ 0,135	0,454 $\pm$ 0,114	0,0630
Trx (ng/mL)	50,3 $\pm$ 20,0	51,6 $\pm$ 24,1	0,8385
TrxR (mU/mL)	6,93 $\pm$ 1,18	6,59 $\pm$ 1,33	0,2723

Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar. *p* > 0,05 indica que no hay diferencias significativas cuando se compara población con Ca 19.9  $\geq$  37 U/mL vs Ca 19.9 < 37 U/mL.

Así, en el caso del GSH no se detectan cambios significativos entre los dos grupos estudiados, tanto en plasma como en linfocitos.



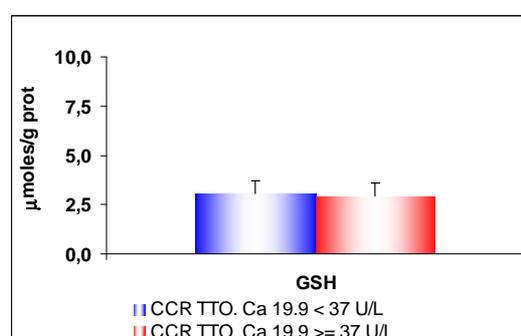
**Figura 104.** Estado redox medido en plasma mediante concentración de GSH (A), Trx (B) y actividad TrxR (C) asociado a concentración de Ca 19.9 en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

Por otra parte, en cuanto al sistema tiorredoxina, no se encuentran diferencias significativas ni en la tiorredoxina ni en la actividad de la tiorredoxina reductasa para los dos grupos de población clasificados en función de la concentración del marcador tumoral Ca 19.9.

**Tabla LXXVII.** Estado redox medido en linfocitos asociado a concentración de Ca 19.9 en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.

	Ca 19.9 < 37 U/mL	Ca 19.9 ≥ 37 U/mL	<i>p</i>
GSH-linfocitos (μmoles/g proteína)	3,04 ± 0,691	2,94 ± 0,659	0,5780

Los resultados están expresados en media ± desviación estándar.  $p > 0,05$  indica que no hay diferencias significativas cuando se compara población con Ca 19.9 ≥ 37 U/mL vs Ca 19.9 < 37 U/mL.



**Figura 105.** Estado redox medido en linfocitos asociado a concentración de Ca 19.9 en una población con CCR en tratamiento quimioterápico.  $p > 0,05$  indica que no hay diferencias significativas.

#### **4.3.5. Estudio del estrés oxidativo asociado a otras patologías en pacientes con cáncer colorrectal**

Con objeto de conocer que niveles de estrés se podrían asociar a una determinada patología de base, se ha planteado el estudio inferencial en dos grupos de población con CCR y en tratamiento quimioterápico con y sin una serie de enfermedades tales como hipertensión arterial (HTA), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), lipidemia, diabetes y otras neoplasias anteriores. Por otra parte, a través de este estudio también se podría poner de manifiesto que parte del estrés oxidativo que presentan los pacientes con cáncer colorrectal podría ser debido a estas patologías de base y no sólo a la neoplasia estudiada.

Los resultados de este estudio se recogen la Tabla LXXVIII, donde quedan reflejadas sólo las enfermedades junto con los parámetros de estrés oxidativo que muestran diferencias significativas entre las dos poblaciones estudiadas.

**Tabla LXXVIII.** Estudio del estrés oxidativo asociado a patologías de base en pacientes con CCR y en tratamiento quimioterápico.

	ABTS	MDA-linfocitos	GC-plasma	GC-linfocitos	Trx	GSH-linfocitos
HTA	--	$p=0,0048$	$p=0,0190$	$p=0,0418$	$p=0,0308$	$p=0,0199$
Lipidemias	$p=0,0459$	--	--		$p=0,0253$	--

Valores de  $p < 0,05$  indican diferencias significativas cuando se compara población con HTA o lipidemia vs sin dicha enfermedad.

Cabe destacar que los pacientes con EPOC, diabetes o que han tenido con anterioridad otra neoplasia diferente del CCR, no presentan diferencias en ninguno de los parámetros asociados a estrés oxidativo respecto al grupo de población que no ha tenido ninguna de estas patologías.

Los pacientes que tienen alguna alteración en su perfil lipídico respecto a los que no, solo presentan diferencias significativas en su capacidad antioxidante, medida a través del método ABTS y en los niveles de tiorredoxina.

Asimismo, el grupo de pacientes con HTA respecto a la población sin esta enfermedad presenta diferencias significativas en cuanto se refiere al daño oxidativo a lípidos (MDA-linfocitos), daño oxidativo a proteínas (GC-plasma y linfocitos) y estado redox (Trx y GSH-linfocitos), siendo además la HTA la enfermedad que presenta mayores diferencias de estrés respecto a las otras patologías estudiadas.

#### **4.3.6. Estudio de las correlaciones entre los diferentes marcadores de estrés oxidativo en pacientes con cáncer colorrectal**

La relación entre los cambios en los diferentes parámetros analizados en este estudio se evalúa mediante el establecimiento de correlaciones paramétricas. La tabla LXXIX resume las correlaciones biparamétricas estadísticamente significativas del grupo control y de los pacientes con cáncer colorrectal.

Cuando se analizan las correlaciones obtenidas entre el grupo control y el de los pacientes con cáncer colorrectal, destacan los resultados obtenidos al analizar los marcadores de capacidad antioxidante total y el estado redox como el GSH o el sistema tiorredoxina Trx/TrxR, así como las detectadas al estudiar el biomarcador de daño a proteínas en ambos grupos de población.

**Tabla LXXIX.** Correlaciones biparamétricas entre los diferentes marcadores de estrés oxidativo en grupo control y en pacientes con cáncer colorrectal.

GRUPO CONTROL														
	FRAP	ABTS	PF	Nitritos	Nitratos	HP	MDA	GC	GSH	TRx	TRxR	GC(I)	GSH(I)	MDA(I)
FRAP	-	ns	0.241 0.043	0.351 0.016	ns	ns	ns	ns	0.570 0.001	0.282 0.04	ns	ns	ns	-0.454 0.006
ABTS	ns	-	0.418 0.001	ns	ns	ns	ns	-0.363 0.007	ns	0.332 0.006	0.301 0.028	-0.478 0.015	ns	ns
PF	ns	ns	-	ns	ns	ns	ns	-0.327 0.005	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Nitritos	-0.250 0.031	ns	-0.302 0.009	-	ns	ns	0.283 0.040	ns	ns	ns	ns	0.387 0.021	ns	0.389 0.021
Nitratos	-0.314 0.005	-0.355 0.002	-0.445 0.008	ns	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
HP	ns	ns	-0.360 0.001	ns	ns	-	ns	ns	ns	ns	ns	0.404 0.015	ns	ns
MDA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
GC	-0.268 0.017	-0.328 0.004	ns	ns	ns	ns	0.322 0.037	-	-0.269 0.051	-0.349 0.010	ns	0.340 0.045	ns	0.490 0.003
GSH	ns	ns	ns	ns	-0.271 0.035	ns	ns	ns	-	ns	ns	ns	ns	ns
TRX	ns	ns	ns	ns	ns	0.314 0.005	ns	ns	ns	-	ns	ns	ns	ns
TRxR	ns	ns	ns	-0.329 0.032	ns	0.332 0.031	ns	ns	ns	ns	-	ns	ns	ns
GC (I)	ns	ns	-0.347 0.003	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-	ns	ns
GSH (I)	ns	ns	0.456 0.008	-0.367 0.002	-0.466 0.005	-0.462 0.004	ns	ns	ns	ns	ns	-0.151 0.001	-	ns
MDA (I)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-

GRUPO CON CANCER COLORRECTAL

Valores de la parte superior de la celda corresponden al coeficiente de correlación a un nivel de significancia de  $p < 0,05$ , dato recogido en la inferior de la misma. ns indica que la correlación no es significativa.

En el grupo control los parámetros de capacidad antioxidante FRAP y ABTS se correlacionan positivamente con el marcador de antioxidantes exógeno polifenoles. Cuando se compara con los marcadores del estado redox observamos que FRAP se correlaciona de forma directa con ambos tioles, GSH y Trx, y el ABTS se correlaciona con la Trx y la TrxR, pero no con el GSH. Sin embargo, en los pacientes con CCR no se obtuvieron correlaciones entre estos grupos.

En relación a las correlaciones entre capacidad antioxidante total medida por el método FRAP y los nitritos, como biomarcador de óxido nítrico, se obtuvo una correlación directa en el grupo control, estableciendo una relación entre la capacidad reductora del plasma y los niveles de óxido nítrico. Sin embargo, en el grupo de pacientes con CCR, se establece una relación inversa y mucho más estrecha entre la capacidad antioxidante total, a través de los tres parámetros ABTS, FRAP y polifenoles, y los niveles de óxido nítrico.

En lo que respecta al daño oxidativo a biomoléculas, destacan los resultados al estudiar las correlaciones establecidas entre los GC, como indicador de daño a proteínas, y los diferentes parámetros de estrés oxidativo. Asimismo, en el grupo control, los GC de plasma se correlacionan negativamente con los resultados de las medidas realizadas de la capacidad antioxidante a través del método ABTS y con los polifenoles así como con los tioles GSH y Trx encargados del estado redox. Por otra parte, se establece una correlación positiva con los indicadores de daño a biomoléculas de linfocitos, tanto con los GC como con el MDA. Sin embargo, en el grupo de pacientes con CCR, sólo se establecen correlaciones negativas con los parámetros indicadores de capacidad antioxidante FRAP y ABTS y positivas con el marcador MDA de daño a lípidos en plasma, pero no con los parámetros del estado redox.

En lo que respecta a las correlaciones establecidas para el marcador de daño a proteínas (grupos carbonilo) en linfocitos de la población control, se establece una relación negativa con el ABTS pero positiva con otros marcadores de daño oxidativo plasmático como son nitritos, hidroperóxidos y grupos carbonilo de proteínas plasmáticas. Resultados similares para el indicador de daño a lípidos, MDA, donde la correlación es negativa con el marcador de capacidad antioxidante plasmático

FRAP y positiva con marcadores de daño oxidativo nitritos y grupos carbonilo plasmático. Sin embargo, en los pacientes con CCR no se obtuvieron correlaciones entre estos grupos.

En cuanto al estado redox y biomarcadores de daño oxidativo, solo se establece correlación en los grupos carbonilo, siendo inversa con ambas moléculas tiólicas, GSH y Trx en sujetos control, que nuevamente no se observa en el grupo de pacientes, donde sin embargo, las correlaciones directas se observan entre hidroperóxidos y el sistema Trx/TrxR.

Por otra parte, el GSH presente en linfocitos, que no se correlaciona en sujetos control, si va a ser un marcador importante en enfermos con CCR, ya que se correlaciona positivamente con polifenoles y negativamente con otros marcadores de daño oxidativo como los de óxido nítrico, los hidroperóxidos como indicadores de daño a lípidos y los grupo carbonilo como biomarcadores de daño a las proteínas presentes en linfocitos.

***DISCUSIÓN***



## 5. DISCUSION

El cáncer colorrectal representa uno de los mayores problemas de salud presente en las sociedades desarrolladas, estando ampliamente demostrado la estrecha relación existente entre los niveles de estrés oxidativo y los mecanismos de inicio, promoción y progresión de la carcinogénesis (Rainis et al., 2007), consecuencia de la constante exposición de ROS por parte de las células intestinales. Es bien conocido que el estrés oxidativo está asociado no solo con la iniciación sino también con la promoción y progresión del cáncer. La anormal producción de oxidantes celulares o del desequilibrio del sistema control de antioxidantes ha sido asociado a mutaciones inducidas por el daño oxidativo al DNA, así como modificaciones de la expresión génica. Algunas señales de transducción son también activadas por ROS y llevan a la transcripción de genes implicados en la regulación del crecimiento celular (Valko et al., 2006).

En base a la bibliografía revisada queda evidenciada la relación entre el estrés oxidativo y los diferentes procesos carcinogénicos. Pero el papel del estrés oxidativo en el cáncer es complejo ya que son múltiples las variables que pueden influir, no solo en el desarrollo si no también en la progresión y tratamiento del mismo. Por eso, en este trabajo se ha abordado el estudio del estrés oxidativo en pacientes con cáncer colorrectal, por ser uno de los de más incidencia en los países desarrollados, estratificando el estudio en base a aquellas fases en las cuales es sabido que está implicado el estrés oxidativo.

La ausencia de la existencia de estudios *in vivo* que revelen si existen diferencias en el nivel de estrés oxidativo entre diferentes neoplasias, nos ha llevado a realizar un primer estudio comparativo del estrés oxidativo en pacientes con cáncer colorrectal, con otros de menor incidencia en la población burgalesa como son el cáncer gástrico y un cáncer hematológico como el linfoma. Asimismo, varios estudios han propuesto como el estrés oxidativo provocado por ROS, también está implicado en los mecanismos de metástasis (Wu, 2006), tales como migración, invasión de células tumorales y angiogénesis.

Finalmente, y como parte central de este trabajo de investigación, nos hemos planteado también estudiar la relación entre estrés oxidativo y fármacos quimioterápicos. Son muchos los estudios, principalmente *in vitro*, que muestran esta relación (Rigas and Sun, 2008), ya que varios de los fármacos que forman parte de los diferentes grupos de tratamiento median parte de su mecanismo de acción a través de procesos redox, causando variaciones en los niveles del estrés oxidativo. Es sabido que el estrés oxidativo así como el estado redox celular determina la eficacia de ciertos agentes anticancerígenos cuyo mecanismo de acción puede ser modificado en función del estado celular o incluso por la presencia de antioxidantes (Arrigo, 1999; Valko et al., 2006). Antioxidantes como el GSH o la TRx, median la respuesta de los tratamientos quimioterapéuticos, la depleción de GSH incrementa la apoptosis inducida por cisplatino o por 5-fluorouracilo en células de carcinoma de colon y hepatocarcinoma. Grivicich y cols observaron que en el tratamiento con irinotecan en combinación con el 5-fluorouracilo se incrementaban los niveles de la enzima antioxidante superóxido dismutasa en células de carcinoma de colon HT-29 humano (Grivicich et al., 2005). También el estado redox puede modificar la acción de otro tipo de anticancerígenos como son los antiangiogénicos. Así estudios *in vitro* han demostrado un aumento de la eficacia de anticuerpos monoclonales como el bevacizumab (Avastin), o el cetuximab (Erbix) en combinación con otros fármacos antioxidantes (Brown et al., 2005).

Por tanto, con objeto de realizar un estudio completo y exhaustivo se ha determinado la capacidad antioxidante total, el daño a biomoléculas y la evaluación del estado redox, a través de la medida de diferentes parámetros. Para ello se han empleado los valores promedio resultantes de la medición de diferentes parámetros enmarcados en los siguientes tres grandes grupos, capacidad antioxidante total, daño a biomoléculas y estado redox.

La valoración de la capacidad antioxidante total se considera la acción conjunta de todos los antioxidantes presentes en el plasma, aportando un dato integral frente a los datos de medidas individuales de antioxidantes. Por lo tanto, la acción sinérgica de los diferentes compuestos que tengan capacidad antioxidante (endógenos como exógenos) está asegurada y da una idea del desequilibrio entre antioxidantes y oxidantes. Los antioxidantes pueden ser endógenos, resultado del

metabolismo como del ácido úrico, bilirrubina, albúmina, tioles, etc., o provenientes de fuentes exógenas introducidas en el organismo por una dieta rica en antioxidantes como las vitaminas y los polifenoles, que contribuyen al refuerzo de la capacidad antioxidante endógena. Son muchas las evidencias que muestran la importancia de la capacidad antioxidante total del plasma y sus modificaciones en situaciones de estrés oxidativo asociado a diferentes patologías. Por eso, en este estudio se ha abordado la determinación de la capacidad antioxidante total en plasma aplicando tres técnicas, la del ABTS como indicador de la capacidad estabilizadora de radicales libres, el FRAP como indicador del poder reductor, y la cuantificación de polifenoles totales como indicador de la contribución de compuestos antioxidantes presentes en la dieta.

Asimismo, niveles elevados de ROS y RNS producen un daño causado por la interacción de los radicales libres con distintas macromoléculas biológicas, como lípidos y proteínas, habiendo sido relacionado dicho daño con mecanismos de carcinogénesis (Ahmad et al., 2008; Cejas et al., 2004). Sin embargo, debido a la vida media tan corta de estas especies reactivas, se hace necesario valorar el daño a estas macromoléculas mediante el empleo de biomarcadores, que supongan un reflejo de las consecuencias del estrés oxidativo en los sistemas biológicos vivos.

De particular relevancia para el daño tisular destaca el daño oxidativo a lípidos, la peroxidación lipídica. El proceso de peroxidación lipídica engloba una serie de reacciones en cascada entre cuyos productos se encuentran hidroperóxidos y aldehidos, para los cuales existen diferentes ensayos para su cuantificación. La ausencia de un único marcador de peroxidación hace necesario el utilizar varios marcadores, por lo que en el presente estudio se han cuantificado los niveles de MDA y de hidroperóxidos lipídicos. Las proteínas son también susceptibles del daño oxidativo por ROS o RNS, y los productos formados como consecuencia de su oxidación son químicamente muy diversos. Entre las modificaciones originadas resultado de su oxidación una de las más comunes es la aparición de grupos carbonilo (Levine et al., 1990) siendo su acumulación considerado un marcador de daño oxidativo a proteínas en diferentes patologías (Valko et al., 2006).

Además, como prooxidante se han evaluado los niveles de óxido nítrico, producto de la acción de las óxido nítrico sintasas sobre la arginina, con importantes acciones vasodilatadoras, antiproliferativas, antitumorales, etc. (Lowenstein et al., 1994) que cuando se encuentra a concentraciones elevadas puede interaccionar con radicales como el superóxido y generar el radical peroxinitrito. Alteraciones en la síntesis y niveles elevados de óxido nítrico han sido constatados en diferentes patologías como el caso de pacientes con cáncer (Dincer et al., 2006; Halliwell, 1999). Dado que el NO es un compuesto lábil, éste se suelen cuantificar a través de la medida de sus metabolitos finales nitrito y/o nitrato. *In vivo*, casi todo el nitrito es oxidado a nitrato, por lo que ambos guardan una relación variable. En el presente estudio se ha cuantificado tanto nitrito como nitrato en plasma como indicadores de la concentración de óxido nítrico.

Por último, la determinación de concentración de GSH (en plasma y linfocitos) y la valoración del sistema tiorredoxina (Trx/TrxR) en plasma, permite evaluar el estado redox, el cual juega un papel crucial en la evolución de las células tumorales así como en el mecanismo de acción de determinados tratamientos quimioterápicos (Ceccarelli et al., 2008).

### **5.1. ESTUDIO COMPARATIVO DEL ESTADO OXIDATIVO SEGÚN EL TIPO DE CÁNCER**

En este primer apartado se analizarán los resultados obtenidos del estudio del estrés oxidativo de un grupo de pacientes con cáncer colorrectal comparándolos con los de una población con cáncer gástrico y otra con linfoma respecto a sujetos control.

Los cánceres gastrointestinales así como los linfomas son los más frecuentes en los países desarrollados. Los procesos inflamatorios presentes en ambos tipos de cánceres producen un estrés oxidativo por radicales libres derivados del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS). Este proceso de inflamación juega un papel importante en la carcinogénesis al generar compuestos carcinogénicos responsables del daño a distintas biomoléculas como lípidos, proteínas y DNA, causando la activación de la proliferación celular (Choi et al., 2002; Halliwell, 1999).

En base a los resultados obtenidos en el desarrollo de este estudio, se puede constatar que en cualquiera de los tres tipos de neoplasias estudiadas (CCR, CG y linfoma) hay alteración de los niveles de estrés de oxidativo respecto al grupo de sujetos control, afectando tanto a la capacidad antioxidante total como al estado redox quedando reflejado a través de los biomarcadores que indican daño a biomoléculas.

No obstante, destacar que se detectan diferencias en cuanto a la significancia de los valores promedio de algunos parámetros medidos entre las distintas neoplasias (CCR y CG) y linfoma. Sin embargo, estudiando detalladamente todos y cada uno de los resultados obtenidos, merece la pena destacar una serie de aspectos, que se comentan a continuación.

El papel del estado antioxidante del organismo relacionado con el tracto gastrointestinal, es un área de estudio emergente en el campo del estrés oxidativo. La importancia de este estudio radica en que los antioxidantes presentes en los alimentos, son absorbidos a través del tracto gastrointestinal al resto del organismo. Así, diferentes estudios epidemiológicos han mostrado una relación inversa entre el consumo de frutas y vegetales y algunos tipos de cáncer (van Duijnhoven et al., 2009). Uno de los posibles mecanismos de ese efecto es la capacidad antioxidante de compuestos bioactivos como son los polifenoles. Los resultados obtenidos muestran que la diferencia en cuanto a concentración de polifenoles en linfoma es de un 85% respecto a población control, sin embargo en el grupo de pacientes con CG y CCR este valor es de un 70 y 50% respectivamente. Este descenso significativamente marcado en comparación con el resto de neoplasias, puede ser debido a que los pacientes con CCR pueden tener alterados parte de los mecanismos de absorción de estos compuestos, bien por la propia enfermedad y/o por la cirugía a la que han sido sometidos. Así, determinados estudios constatan como parte de los polifenoles de la dieta escapan a su absorción en el intestino delgado, para posteriormente y previa transformación por parte de la microflora intestinal, presente fundamentalmente en la región colónica, entrar en la circulación enterohepática (Blaut et al., 2003).

Uno de los principales RNS, el cual es liberado por fagocitos que median en la respuesta inflamatoria, es el óxido nítrico (NO), un radical libre que se relaciona con diferentes tipos de cáncer, destacando los gastrointestinales (Cerutti and Trump, 1991). De los resultados obtenidos, observamos que la concentración de nitrito en la población con cáncer gástrico es similar al valor que presenta el grupo control y significativamente diferente a las otras dos neoplasias. Estos resultados discrepan con lo observado por otros autores donde han detectado concentraciones elevadas de nitrito y nitrato, productos finales de NO, en pacientes con CG respecto a controles. Además, estos niveles se han correlacionado con el grado de la enfermedad así como con una mayor concentración de VEGF (Dincer et al., 2006). Esto no ocurre con el nitrato, cuya concentración no presenta diferencias significativas con las otras dos poblaciones con enfermedad y sí con el grupo control, en consonancia con lo descrito en la bibliografía revisada.

En cuanto al daño oxidativo a lípidos y proteínas, existen numerosos trabajos que relacionan concentraciones elevadas de los biomarcadores de daño a biomoléculas, tales como hidroperóxidos, MDA y GC, con los tres tipos de cáncer estudiados (Brink et al., 2009; Di Giacomo et al., 2003; Eissa and Esmaeel, 2008; Khanzode et al., 2003; Morabito et al., 2004), tal y como muestran los resultados obtenidos en nuestro estudio. Además, en este caso, cabe destacar como el linfoma es la neoplasia que presenta de forma significativa el mayor daño oxidativo a lípidos, medido a través de los dos biomarcadores analizados (hidroperóxidos y MDA en plasma y linfocitos), aspecto no descrito hasta la fecha. Esto podría marcar la existencia de un hecho diferencial respecto a otras neoplasias pudiendo estar vinculado al propio mecanismo carcinogénico, abriendo así nuevas expectativas en la búsqueda de dianas terapéuticas.

Sin embargo, en cuanto al daño a proteínas, es el cáncer colorrectal la neoplasia que presenta la concentración de GC en plasma significativamente mayor, alcanzando valores de hasta 5 veces más concentración que el grupo control. Destacar cómo los valores de GC detectados en plasma son significativamente diferentes entre las tres enfermedades, aspecto que no se detecta en linfocitos, cuyas diferencias no son significativas entre ellas, pero sí respecto al control.

En cuanto al estado redox, entre las principales especies o sistemas antioxidantes estudiados destaca el glutathion, tiol tripeptídico (Estrela et al., 2006), y el sistema tiorredoxina, formado por la tiorredoxina y la tiorredoxina reductasa, jugando un papel fundamental en la regulación redox de multitud de procesos intracelulares (Valko et al., 2006).

Diversos estudios han reflejado como en pacientes con CCR hay una menor concentración del tripéptido estudiado respecto a sujetos control, debido al importante papel que juega en los procesos de detoxificación carcinogénica, tal y como muestran los resultados obtenidos en este estudio (Di Giacomo et al., 2003). En los casos de CG y de los pacientes con linfoma, también existen trabajos que reflejan una menor concentración en los pacientes con neoplasia respecto al grupo control (Meyer et al., 1998), a pesar de que en este trabajo, aun obteniendo diferencias, éstas no son significativas. Por otra parte, el análisis del GSH en linfocitos muestra el mismo comportamiento que el detectado en plasma, para todos los grupos estudiados respecto a la población control.

Por otra parte, en cuanto al sistema tiorredoxina, se ha encontrado una mayor actividad del sistema antioxidante, reflejado de forma significativa tanto en la tiorredoxina como en la tiorredoxina reductasa, en los tres tipos de cáncer respecto al grupo control. Esto puede responder a un mecanismo compensatorio al incremento de estrés oxidativo presente en los tres grupos de enfermedad y avalado por trabajos que recogen el mismo comportamiento de los sistemas antioxidantes celulares (Evens et al., 2008; Noda et al., 2000; Rainis et al., 2007), junto con la evidencia de que en el caso del sistema tiorredoxina es secretado al plasma tanto por las células cancerígenas como por las no tumorales (Soderberg et al., 2000).

Cabe destacar la elevada concentración de tiorredoxina detectada en los pacientes con linfoma, lo cual responde a la elevada variabilidad individual que tiene este parámetro, reflejado en la alta desviación estándar que presenta en la mayoría de los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo.

Se puede concluir, en base a los resultados discutidos en este estudio que los pacientes con cáncer presentan un nivel de estrés oxidativo significativamente mayor que el grupo control. Sin embargo, apenas se detectan diferencias

significativas entre los diferentes tipos de neoplasias. No obstante, merece la pena destacar la baja concentración de polifenoles en pacientes con CCR así como el mayor daño a lípidos en el grupo con linfoma respecto a las otras neoplasias estudiadas.

## **5.2. ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL**

A lo largo de la revisión bibliográfica realizada y del desarrollo de este trabajo, ha quedado claramente evidenciada la estrecha relación existente entre el cáncer y el estrés oxidativo, y más concretamente en el caso del cáncer colorrectal, objeto principal de estudio en esta Tesis Doctoral.

No obstante, son muchos los parámetros que reflejan el estado oxidativo y en la mayoría de los trabajos revisados hasta la fecha no están estudiados de forma conjunta e integral, de forma que se permita alcanzar un abordaje completo y global del estrés oxidativo en este tipo de enfermedad. Además, no sólo la propia enfermedad, sino los diferentes tratamientos quimioterápicos así como el grado de avance de la misma, se relacionan con diferentes estados de estrés oxidativo, aspectos no estudiados con el detalle necesario para establecer nuevas líneas de trabajo encaminadas a proporcionar estrategias terapéuticas alternativas así como marcadores indicadores del estado y evolución de la enfermedad.

Por tanto, a lo largo de la discusión planteada en este apartado, se recogerá el análisis de los resultados del estudio del estrés oxidativo en pacientes con cáncer colorrectal, abordando en un primer apartado el estrés asociado exclusivamente a la enfermedad, para continuar con la discusión de cómo podrían influir los diferentes tipos de tratamiento quimioterápicos en el estrés oxidativo. Por otra parte, se realizará el análisis de cómo el grado y tipo de metástasis se relacionan con el nivel y el estado redox celular. Destacar el estudio de resultados realizado en base a valores de los marcadores tumorales y otra serie de parámetros clínicos, para por último analizar el resultado de las correlaciones realizadas entre los diferentes parámetros de estrés oxidativo.

### **5.2.1. Estudio del estrés oxidativo asociado al cáncer colorrectal**

En una primera aproximación al estudio del estrés oxidativo en pacientes con cáncer colorrectal se ha hecho necesario conocer el nivel de estrés asociado sólo y exclusivamente a la enfermedad y no el derivado de otra serie de variables fundamentalmente consecuencia del tratamiento quimioterápico. En base a esta premisa, se ha planteado si se detectarían diferencias significativas en el grado de estrés y en el estado redox en un grupo de pacientes con CCR pero sin haber estado sometidos a tratamiento quimioterápico y cuya enfermedad se encuentre en estadios iniciales respecto a población control. Aunque el tamaño muestral que ha reunido estas características es pequeño, los resultados indican que efectivamente aunque en menor grado, sigue existiendo una diferencia significativamente importante entre el grupo con CCR y el control.

La primera barrera que dispone el organismo para combatir el estrés oxidativo es la capacidad antioxidante del plasma. Los resultados de este trabajo dejan claro que tanto la capacidad antioxidante del plasma para estabilizar radicales mediante la transferencia de protones (método ABTS), como por la capacidad reductora (método FRAP) está significativamente disminuida en los pacientes con CCR, lo que desequilibra la balanza a favor de los prooxidantes. Tal y como se ha comentado en el primer apartado, la disminución observada en el nivel de polifenoles totales, quizás sea una de las causas principales que contribuye a la disminución de la capacidad antioxidante total plasmática en este grupo de enfermos. La contribución del contenido de polifenoles sobre el inicio y evolución del CCR no está estudiado, sin embargo diferentes estudios epidemiológicos apoyan la idea de que existe una relación inversa entre consumo de polifenoles y cáncer de colon (van Duijnhoven et al., 2009).

Cabe destacar como se detectan incrementos significativos en cuanto a los niveles de óxido nítrico en plasma y al de biomarcadores de oxidación de proteínas y de lípidos, en plasma y en linfocitos. Respecto a las posibles elevaciones del nitrito y nitrato (hiperproducción de NO) puede ser debido a la liberación de NO como consecuencia de los procesos inflamatorios implicados en el desarrollo del proceso

de carcinogénesis (Weitzman and Gordon, 1990) lo que conllevaría un incremento de estrés oxidativo.

Por otra parte, cabe destacar que los biomarcadores (GC y MDA) que indican daño a proteínas y a lípidos medidos en cada uno de los apartados desarrollados en la Tesis Doctoral muestran mayor concentración en plasma que en linfocitos. Estos resultados están de acuerdo con lo observado por otros autores que detectaron incrementos en los niveles de oxidación lipídica tanto en plasma como en tejido de enfermos con CCR (Hendrickse et al., 1994). Desde el punto de vista del posible empleo de alguno de estos parámetros como indicador de evolución de enfermedad, esto sería muy positivo, ya que sería el plasma el medio elegido para la cuantificación de estos parámetros con posible valor diagnóstico y/o como indicadores de progresión, con ventajas sustanciales respecto a otros medios, por su facilidad para obtención, manipulación, requiriendo asimismo de técnicas de medida con menor sensibilidad. Por último, en el caso de los grupos carbonilo se detecta el doble de incremento de concentración en plasma que en linfocitos, comparando el grupo de pacientes con CCR respecto a población control, indicando por tanto que el estrés oxidativo asociado a la enfermedad produciría mayor daño a las proteínas plasmáticas y/o a las liberadas a plasma que a las que se encuentran en los linfocitos o bien que los mecanismos de reparación y/o compensación son mayores o más eficaces en las células del sistema inmune. Hasta ahora, y en base a la bibliografía consultada no se conoce ningún trabajo que estudie y/o justifique las diferencias detectadas entre los niveles de oxidación entre el plasma y los linfocitos, sin embargo la profundización de este aspecto podría sentar las bases para el inicio de una nueva estrategia terapéutica basado en una diferente especificidad en cuanto a oxidación de proteínas en diferentes medios biológicos.

Analizando el estado redox, y tal y como viene recogiendo la bibliografía (Soderberg et al., 2000), se ha detectado un aumento del sistema tiorredoxina en los pacientes con CCR respecto al grupo control, cuya función principal podría estar encaminada a compensar el estrés oxidativo presente en este grupo de población. No obstante, en el caso de la tiorredoxina reductasa, aún presentando mayor concentración no hay diferencia significativa entre los grupos estudiados, pudiendo indicar que alguno de los mecanismos antioxidantes compensatorios podría ponerse

en marcha en situaciones con mayor nivel de estrés oxidativo, como por ejemplo en presencia de fármacos antineoplásicos o estados más avanzados de la enfermedad. Esta aproximación estadística apoya las premisas planteadas al inicio de este apartado, permitiendo concluir que el simple estado de enfermedad neoplásica colónica está asociado a un mayor nivel de estrés oxidativo respecto a sujetos control y que el sistema tiorredoxina podría presentar mayor actividad a mayor nivel de oxidación, aspecto que será defendido en base a otra serie de resultados experimentales discutidos a lo largo de los siguientes apartados.

En cuanto a los niveles de GSH medidos en el estudio, éstos fueron significativamente menores en los pacientes con cáncer colorrectal que en el grupo control, a diferencia de lo observado con la Trx. Diversos autores han obtenido similares resultados, en los que se detecta disminución de los niveles de GSH en varios tipos de cáncer (Fiaschi et al., 2005; Sanchez et al., 2006). Estas diferencias detectadas entre los dos tipos de tioles, Trx y GSH, podría ser debido, tal y como ha propuesto Mansego y colaboradores (Mansego et al., 2007), a que la Trx podría ser activada por un aumento crónico de los niveles de estrés oxidativo, resultando por otra parte un mayor consumo de GSH provocado por las elevadas concentraciones de especies reactivas oxigénicas.

### ***5.2.2. Estudio del estrés oxidativo asociado al tratamiento quimioterápico en pacientes con cáncer colorrectal***

La quimioterapia en el cáncer tiene como objetivos retrasar la aparición de síntomas en el paciente asintomático, aumentar el periodo de supervivencia libre de la enfermedad en los pacientes tratados y aumentar la supervivencia global frente a los pacientes no tratados con una toxicidad aceptable para el paciente. En la actualidad, para el tratamiento del cáncer se aplican fármacos de forma individualizada o en combinación, cuyo mecanismo de acción es la inducción de apoptosis celular, inhibición de la angiogénesis e inhibición de factores de crecimiento celular. La eficacia de estos fármacos está relacionada con el estado antioxidante y el estado redox celular y en algunos casos los efectos citotóxicos de los fármacos están mediados de forma directa o indirecta por las especies reactivas oxidantes.

En este sentido, se ha estudiado el estrés oxidativo asociado al tratamiento quimioterápico, para lo cual se ha partido de un grupo de población con CCR sin tratamiento y otro en régimen quimioterápico, y con un nivel de estrés oxidativo similar en cuanto al asociado a la enfermedad. Es cierto que a nivel individual los pacientes pertenecientes a cada uno de los grupos de población presentan niveles de estrés diferentes debido al grado de avance o de estadio en el se encuentra la enfermedad, sin embargo, ambas poblaciones en su conjunto presentan un porcentaje de individuos similar en cuanto a grado de metástasis o estadio (53% de individuos con metástasis en el grupo de pacientes sin tratar y 57% en la población en tratamiento) haciendo que se pueda asumir que el incremento de estrés oxidativo entre ambas poblaciones esté asociado al tratamiento quimioterápico.

Según el análisis de los resultados basado en el estudio estadístico de las medidas de los diferentes parámetros realizadas en las dos poblaciones, y tal y como se conoce desde hace años (Masuda et al., 1994; Miyajima et al., 1997), el tratamiento quimioterápico produce un significativo aumento del estrés oxidativo en la población en tratamiento quimioterápico respecto al grupo de pacientes no tratados. Este aumento de estrés oxidativo se ve reflejado en la disminución de la capacidad antioxidante así como en el daño a lípidos y proteínas, tal y como muestran las elevadas concentraciones de MDA y GC, provocando así cambios en el estado redox tales como la disminución del nivel de Trx a pesar de que la actividad de la TrxR sea mayor en la población de pacientes en tratamiento.

En el caso de algunos fármacos quimioterápicos, el incremento del estado oxidativo está causado de una forma indirecta dado que interfieren con determinados mecanismos compensatorios del estrés oxidativo (Sun and Rigas, 2008; Tonissen and Di Trapani, 2009). Sin embargo, en otros casos, además y asociado a su mecanismo de acción se produce liberación de ROS, como anión superóxido y peróxido de hidrógeno, vinculado al mecanismo farmacodinámico de algunos compuestos derivados del platino y del irinotecan (Grivicich et al., 2005; Masuda et al., 1994; Masuda et al., 2001). No obstante, el estudio del estrés oxidativo asociado al tratamiento quimioterápico es mucho más complejo, ya que según la eficacia del tratamiento, la población de células tumorales irá disminuyendo, provocando que el balance neto del estado oxidativo no sólo dependa

del tratamiento, sino de la eficacia y respuesta del mismo, así como del grado y estadio de la enfermedad.

No obstante, según los resultados obtenidos, si se compara el incremento de estrés oxidativo asociado al tratamiento respecto al derivado exclusivamente al desarrollo de la propia enfermedad, se puede comprobar cómo en este último caso dicho incremento es casi el doble respecto al incremento experimentado entre la población en tratamiento frente al grupo sin tratar, lo que lleva a pensar que el desarrollo de la enfermedad en si misma es causa de más estrés que el debido exclusivamente al tratamiento quimioterápico, o bien, la eficacia del mismo hace disminuir el nivel de estrés en el grupo de pacientes tratados, disminuyendo por tanto el incremento de oxidación mostrado. Sin embargo, atendiendo a valores absolutos es en la población de pacientes en tratamiento donde se sigue encontrando mayor concentración de los parámetros indicadores de estrés oxidativo, a pesar de los incrementos detectados.

Es sabido que la eficacia del tratamiento en algunos casos está determinada por el estado antioxidante celular. Por un lado, si la acción de la droga neoplásica está mediada por ROS, los antioxidantes pueden interferir en su actividad disminuyendo su eficacia. Sin embargo, si los ROS que se generan son responsables de su efecto adverso, en este caso un estado antioxidante reduciría la severidad de tales efectos sin interferir con la actividad de las drogas antineoplásicas. Por lo tanto es importante evaluar el estado antioxidante como consecuencia del tratamiento.

En la actualidad está asumido que durante el tratamiento con agentes quimioterápicos el estado antioxidante está disminuido. A pesar de ello, no hay trabajos que hayan evaluado como la capacidad antioxidante del plasma, primera defensa del organismo, se ve afectada durante el tratamiento quimioterápico. Los resultados muestran que el estado antioxidante en los pacientes con tratamiento quimioterapéutico está disminuido, observándose una disminución del casi 50% de los niveles de polifenoles totales comparado con grupos de individuos sanos. Esta disminución está relacionada con el incremento de los niveles de daño oxidativo observado en lípidos y proteínas.

Por otra parte, en el caso del biomarcador de daño a proteínas y de GSH se ha observado mayor significancia en las diferencias detectadas de los resultados medidos en linfocitos que en las mediciones realizadas en el plasma, lo cual pondría de manifiesto una mayor implicación por parte de los linfocitos en respuesta al tratamiento quimioterápico. Resultados obtenidos por Rainis y colaboradores (Rainis et al., 2007) indican una posible contribución de linfocitos activados, presentes en mayor proporción en tejidos neoplásicos, al estrés oxidativo y por tanto una mayor implicación en la posible defensa contra el daño tisular.

Diversos estudios han puesto de manifiesto como determinados fármacos citostáticos, como el oxaliplatino, son capaces de inhibir la tiorredoxina reductasa mediante la unión a la selenocisteína presente en el centro activo del enzima (Witte et al., 2005). La inhibición de la TrxR permite la acumulación de la tiorredoxina oxidada provocando condiciones celulares que promueven la apoptosis. Sin embargo, en base a los resultados obtenidos, este efecto no es detectado, ya que la población sometida a tratamiento quimioterápico presenta en su conjunto mayor actividad de la tiorredoxina reductasa respecto al grupo de pacientes sin tratar. Esto puede ser debido, por una parte, a que prácticamente la mitad (40%) de la población en régimen quimioterápico no está siendo tratada con ningún derivado del platino y por otra parte, a pesar de que pueda existir inhibición, ésta no es suficiente como para compensar los niveles elevados de actividad asociados al estrés oxidativo derivado del propio proceso neoplásico y aumentado en parte por el empleo de fármacos quimioterápicos, tal y como ha quedado reflejado a lo largo de la discusión de resultados. No menos importante es el hecho de que se ha detectado sobreexpresión de tiorredoxina reductasa en algunos tipos de cáncer (Lincoln et al., 2003), caracterizados por su alta capacidad proliferativa, un bajo índice de apoptosis, un elevado potencial metastático y alta resistencia a los agentes antitumorales, resultado un fenotipo tumoral agresivo, pudiendo formar parte alguno de ellos de la población objeto de estudio.

Sin embargo, en el caso de la tiorredoxina, los resultados obtenidos muestran menor concentración en la población sometida a régimen quimioterápico respecto al grupo sin tratar. Por una parte, esta disminución asociada a los fármacos antineoplásicos podría llevar a pensar que el tratamiento muestra determinada

eficacia en el conjunto de la población, dado que los niveles de Trx se acercan a los del grupo control. Por otra parte, este efecto también podría ser debido a que la tiorredoxina es fuertemente oxidada por ROS, derivados de la propia enfermedad o bien consecuencia del tratamiento.

El estado redox celular en algunos tipos de cáncer, como el caso del CCR, puede determinar la eficacia de ciertos agentes anticancerígenos. De esta forma se ha relacionado al sistema tiorredoxina con la resistencia a citostáticos (Yokomizo et al., 1995). Asimismo, recientes estudios han puesto de manifiesto la posible relación entre el receptor tirosina quinasa Src, asociado con proliferación celular, progresión tumoral y metástasis, y el mecanismo de resistencia al tratamiento con oxaliplatino (Kopetz et al., 2009). Por otra parte, a pesar del importante papel detoxificador que presenta el glutatión, cuando éste se encuentra en concentraciones altas puede aumentar la resistencia a la quimioterapia en determinados tipos de tumores (Balendiran et al., 2004; Estrela et al., 2006). De esta forma, poder conocer en detalle las condiciones en las que el sistema tiorredoxina o el glutatión generan resistencia a determinados agentes quimioterápicos, ayudaría a definir la mejor estrategia terapéutica o bien añadir algún agente modulador que permitiera minimizar o eliminar este tipo de resistencia. En este sentido, ya existen diversos estudios que plantean una estrategia terapéutica basado en agentes prooxidantes, tales como inhibidores del sistema tiorredoxina o sustancias encaminadas a disminuir la concentración del GSH (Cabello et al., 2007; Wang and Yi, 2008).

En cuanto al estudio del estrés oxidativo asociado al tipo de tratamiento quimioterápico empleado, se han agrupado a los pacientes en cuatro poblaciones en base al tipo de tratamiento al que están siendo sometidos. En primer lugar, la población T<sub>0</sub> agrupa a pacientes que no estaban recibiendo ningún tratamiento quimioterápico, actuando como grupo control para el análisis de estos resultados. El grupo T<sub>1</sub> está formado por los pacientes que estaban recibiendo algún fármaco de la familia de las fluoropirimidinas (5-fluorouracilo o capecitabina) y/u oxaliplatino o irinotecan (47% de la población en tratamiento). Los pacientes que a este esquema quimioterápico se les ha añadido un anticuerpo monoclonal anti-EGFR (cetuximab o panitumumab) o anti-VEGF (bevacizumab) han sido agrupados bajo el epígrafe T<sub>2</sub> (37% de la población en tratamiento). Por último, el grupo T<sub>3</sub> está formado por

pacientes cuyo tratamiento no responde a ninguno de los criterios descritos anteriormente (16% de la población en tratamiento) (Tabla I), presentando una elevada variabilidad en cuanto a fármacos, estadio y tipo y grado de metástasis.

En líneas generales, tal y como era de esperar, los pacientes tratados con cualquier tipo de fármaco presentan más nivel de estrés que el grupo de pacientes sin tratar. No obstante, la población formada por el conjunto de tratamientos englobados bajo el epígrafe T<sub>3</sub> presenta un comportamiento en cuanto a estado de oxidación intermedio entre las otras poblaciones en régimen quimioterápico y el grupo sin tratamiento. En este sentido, destacar que no se detectan diferencias significativas en la mayoría de los parámetros medidos respecto al grupo sin tratar, sin quedar claramente demostrado si puede existir o no mayor daño a lípidos y proteínas, así como alteraciones del sistema tiorredoxina. Sin embargo, a diferencia del resto de parámetros, sí se ha detectado una disminución significativa de la concentración de GSH, tanto en plasma como en linfocitos, respecto al grupo T<sub>0</sub>, poniendo de manifiesto una vez más, el importante papel detoxificador que tiene esta molécula y la elevada sensibilidad que presenta a cambios en el nivel de oxidación (Ballatori et al., 2009). La elevada heterogeneidad que conforman los diferentes tratamientos así como los distintos estadios neoplásicos que presentan los pacientes que componen la muestra justifica este posicionamiento intermedio en el estado de oxidación del grupo de pacientes T<sub>3</sub>.

Por otra parte, respecto al GSH medido en plasma en el grupo de pacientes T<sub>1</sub>, se han detectado concentraciones significativamente mayores respecto al grupo sin tratar y al resto de los pacientes tratados. En principio, dado que la población T<sub>1</sub> presenta mayor estrés oxidativo que el grupo sin tratar, cabría esperar un comportamiento contrario, en base al papel antioxidante y detoxificador que tiene esta molécula. Sin embargo, al estudiar en detalle las características de la población T<sub>1</sub>, se observa que un 72% de los pacientes no presentan metástasis, frente al 47% de los pacientes sin tratar. Este hecho podría llevar a pensar, que a pesar de que el grupo T<sub>1</sub> presenta en su conjunto un mayor estado oxidativo, asociado a la enfermedad y al tratamiento quimioterápico, de alguna forma el GSH se podría relacionar con los procesos metastásicos, mostrando una mayor concentración en los pacientes sin metástasis. En este sentido, el valor de concentración de GSH que

presenta la población  $T_1$  ( $0,576 \pm 0,139$   $\mu\text{moles/g Hb}$ ) es similar al promedio obtenido en un grupo de pacientes sin tratar y sin metástasis ( $0,587 \pm 0,064$   $\mu\text{moles/g Hb}$ ), pero significativamente menor respecto al grupo de sujetos control ( $0,649 \pm 0,119$   $\mu\text{moles/g Hb}$ ), sugiriendo de nuevo que la concentración de GSH podría estar más condicionada a la metástasis que al tratamiento quimioterápico. El análisis en conjunto de los datos de GSH de los pacientes tratados no habría permitido detectar este aspecto, dado que se han compensado unos valores con otros. En el resto de los grupos de sujetos tratados ( $T_2$  y  $T_3$ ), la presencia de pacientes con metástasis es mayoritaria, asociado por tanto a niveles de GSH significativamente menores al grupo  $T_0$ , tal y como cabría esperar.

Continuando con la discusión de los resultados de los demás parámetros de estrés oxidativo asociados al tipo de tratamiento, no se encuentran diferencias significativas entre el grupo de pacientes  $T_1$  y  $T_2$ , cuya diferencia estriba en la adición de un anticuerpo monoclonal al esquema terapéutico, en lo que se refiere a capacidad antioxidante, niveles de nitritos y MDA. Sin embargo, sí se observan niveles significativamente más altos de hidroperóxidos y de GC en linfocitos en pacientes sometidos al tratamiento  $T_2$ . Estos niveles más elevados de hidroperóxidos lipídicos, productos primarios transitorios y deleteros derivados del ataque a lípidos por parte de radicales hidroxilo e hidroperoxilo, se asocian a pacientes clínicamente complicados, quedando evidenciado el estado metastático en esta serie de pacientes. En general esto confirma, de acuerdo a la bibliografía descrita (Veronese and O'Dwyer, 2004), que el mecanismo de acción de los anticuerpos anti-EGFR (cetuximab o panitumumab) o anti-VEGF (bevacizumab) no media a través de estrés oxidativo, a pesar de que si se ha relacionado a ROS con una mayor expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (North et al., 2005).

En una aproximación al estudio de cómo se vería afectado el estrés oxidativo por el empleo de un fármaco cuyo mecanismo de acción esté mediado a través de ROS (oxaliplatino e irinotecan), se ha realizado el estudio estadístico de dos poblaciones, una de ellas tratadas solo con fluoropirimidinas (7% de los pacientes tratados) y otra junto con oxaliplatino o irinotecan (40% de los pacientes tratados). Los resultados obtenidos de este estudio no han sido recogidos en el apartado de

resultados, dado que al ser el tamaño de muestra de los pacientes tratados sólo con fluoropirimidinas muy pequeño y la diferencia muestral con el otro grupo de pacientes muy grande, imposibilita la inferencia de los resultados. No obstante, desde un punto de vista descriptivo sí pone de manifiesto determinados efectos asociados al empleo de estos dos fármacos que merece la pena destacar.

En primer lugar, la población tratada con fluoropirimidinas junto con oxaliplatino o irinotecan presenta mayor estrés oxidativo, en cuanto se refiere a menor capacidad antioxidante, mayor daño a lípidos y proteínas y mayor concentración de los biomarcadores de óxido nítrico. Este hecho, ampliamente documentado (Grivicich et al., 2005; Masuda et al., 2001), vuelve a poner de manifiesto que el mecanismo de acción tanto del oxaliplatino como del irinotecan está asociado al estrés oxidativo.

En segundo lugar, en cuanto al sistema tiorredoxina, cabe destacar que la actividad de la tiorredoxina reductasa es muy similar en ambas poblaciones ( $6,89 \pm 1,04$  mU/mL en la población tratada con fluoropirimidinas y  $6,83 \pm 1,56$  mU/mL en el grupo tratado junto con oxaliplatino o irinotecan). Esto podría poner de manifiesto que parte de la tiorredoxina reductasa estaría inhibida por el oxaliplatino, tal y como está descrito en numerosos trabajos (Tonissen and Di Trapani, 2009; Witte et al., 2005), habiendo pasado este efecto inadvertido al analizar la población en su conjunto.

### ***5.2.3. Estudio del estrés oxidativo asociado a metástasis en pacientes con cáncer colorrectal***

Recientemente se ha puesto de manifiesto como las especies reactivas oxigénicas causantes del estrés oxidativo están implicadas en el desarrollo de metástasis (Nishikawa, 2008; Wu, 2006), complejo proceso que incluye transición epitelial-mesenquimal (EMT), migración, invasión de células tumorales y angiogénesis. La transición epitelial-mesenquimal es un programa de desarrollo celular que se caracteriza por la pérdida de adhesión celular, la represión de la expresión de E-cadherina (glicoproteína transmembrana mediadores de la adhesión célula-célula), y aumento en la movilidad celular. La EMT es esencial para

numerosos procesos de desarrollo, sin embargo, también está asociado a la metástasis tumoral.

Inicialmente, las células del tumor primario muestran transición epitelial-mesenquimal y migración en los tejidos circundantes, para posteriormente y gracias a la remodelación de la matriz extracelular realizada por las metaloproteasas de matriz (MMP), facilitar la intravasación de las células tumorales en la circulación. Las células tumorales que sobrevivan en sangre pueden entonces extravasarse llegando a órganos distales y finalmente proliferar causando un tumor secundario, soportado además por mecanismos angiogénicos facilitando su crecimiento (Eyries et al., 2004). Toda esta serie de procesos están mediados gracias a importantes vías de transducción de señales, cuyas cascadas de señalización han sido estrechamente relacionadas con ROS (Matsuzawa and Ichijo, 2005). Por tanto, esto pondría de manifiesto la estrecha relación existente entre los procesos de metástasis y el estrés oxidativo (Radisky et al., 2005; Storz, 2005), aspectos que tendremos lugar a profundizar en la discusión de resultados desarrollada a continuación.

En este sentido, se inicia el estudio contando con dos poblaciones (una sin y otra con metástasis) que no están en tratamiento quimioterápico, de forma que se pueda asociar el estrés oxidativo detectado exclusivamente a metástasis. A lo largo de la revisión bibliográfica realizada, no se han encontrado estudios que pongan de manifiesto un análisis concreto y detallado de la relación existente entre el estrés oxidativo y los procesos metastáticos a través de la medición de diferentes parámetros, no obstante, es ampliamente aceptado la estrecha relación existente entre ambos procesos. De hecho, existen varios datos experimentales que sugieren que la concentración de ROS varía durante el proceso de metástasis y que estas especies reactivas son generadas en los tejidos tumorales por las células cancerígenas (Szatrowski and Nathan, 1991).

De acuerdo a los resultados mostrados, se detecta mayor nivel de estrés oxidativo en los pacientes con metástasis respecto a la población que no la ha desarrollado. De nuevo este hecho es reflejado a través de los resultados obtenidos en todos y cada uno de los parámetros indicadores de estrés oxidativo empleados, tales como los relacionados con la capacidad antioxidante total y los asociados a

daño a proteínas y lípidos, cobrando especial relevancia la elevada significancia en cuanto se refiere a la oxidación de las proteínas detectado en plasma, aspecto ya destacado en apartados anteriores de la presente discusión. En cuanto a la concentración de MDA medida en linfocitos, no se muestran diferencias significativas entre ambas poblaciones, pudiendo ser debido a que valores tan elevados no permiten detectar diferencias, seguramente por estar en niveles próximos a umbrales de máxima oxidación.

Respecto al estado redox, en lo que se refiere a GSH, tal y como se anticipó al explicar el comportamiento de este tripéptido en los pacientes T<sub>1</sub> (tratados con fluoropirimidinas y/u oxaliplatino o irinotecan), se detectan concentraciones mayores en la población sin metástasis, aspecto asociado a menor estrés oxidativo y por tanto menor consumo de GSH por parte de ROS.

Asimismo, la población con metástasis presenta mayor concentración de tiorredoxina, estando asociada a mayor estrés oxidativo y de acuerdo con los resultados ya discutidos a lo largo de este trabajo.

La diferencia detectada entre los dos tipos de tioles, principales agentes detoxificadores de ROS, estaría causado por un mayor consumo de GSH y la activación de la Trx provocada por un aumento de los niveles de estrés oxidativo (Lincoln et al., 2003), puesto de manifiesto en la población de los pacientes con metástasis.

En cuanto a la tiorredoxina reductasa, los resultados obtenidos indican menor actividad en los pacientes con metástasis respecto a la población sin metástasis y a su vez al grupo de sujetos control. En principio no se ha encontrado hasta la fecha ningún estudio experimental que apoye este hecho. Así, en los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo y soportados en base a otros estudios experimentales recogidos en la bibliografía revisada, la actividad tiorredoxina reductasa se ve aumentada según se generan estados de mayor estrés oxidativo, asociados bien a la propia enfermedad cancerígena, al tratamiento quimioterápico, o bien al desarrollo del proceso metastásico.

Dado que el nivel de estrés oxidativo está determinado por el balance de la generación de ROS y los sistemas detoxificadores, cambios en alguno de estos sistemas provocan como resultado un aumento o disminución del estrés. Por otro lado, parte de los mecanismos asociados a metástasis están promovidos por ROS y el incremento de estas especies oxigénicas, que podrían poner en marcha y promocionar la migración y progresión tumoral, son generadas a partir de diferentes fuentes, tales como las propias células tumorales y/o a partir del tratamiento quimioterápico (Pelicano et al., 2004). Esto pone de manifiesto el interés que supone conocer la diferencia existente en cuanto a nivel de estrés oxidativo, entre dos grupos de población sometidos a quimioterapia pero en dos estados distintos de enfermedad, es decir, sin y con metástasis, y la diferencia respecto a un grupo de sujetos sanos o control.

En primer lugar, destacar que las diferencias detectadas a través de los resultados mostrados por los parámetros medidos estarían fundamentalmente asociadas al grado de avance de la enfermedad, ya que el porcentaje de pacientes tratados con oxaliplatino o irinotecan, fármacos especialmente relacionados con incrementos de estrés oxidativo, en las poblaciones con CCR es similar (80% en el población sin metástasis y 75% en el grupo con metástasis).

En base a los resultados obtenidos, se observa como la capacidad antioxidante disminuye de forma significativa a medida que progresa la enfermedad. Asimismo, la concentración de nitrito y nitrato, como biomarcadores de óxido nítrico, aumenta significativamente según se produce un mayor avance del CCR. En cuanto a la concentración de MDA medida en plasma y en linfocitos, al igual que ya ocurría en el análisis anterior, no se muestran diferencias significativas entre ambas poblaciones con CCR, pudiendo ser debido a que valores tan elevados no permiten detectar diferencias, seguramente por estar en niveles próximos a umbrales de máxima oxidación. Sin embargo, el aumento significativo de la concentración de hidroperóxidos no daría lugar a dudas del mayor daño a lípidos detectado en el grupo de pacientes con metástasis respecto al resto de grupos estudiados. Por otra parte, en línea con los resultados ya mostrados, también se detecta mayor estado oxidativo de las proteínas en la población con metástasis, volviendo a ser el medio

plasmático donde se muestra la mayor concentración de GC y el mayor incremento respecto a grupo control.

El análisis del conjunto de resultados sugiere por tanto, que existe mayor estrés oxidativo en la población con metástasis respecto al grupo de pacientes con menor grado de enfermedad. Tal y como Szatrowski y colaboradores ya habían puesto de manifiesto, las células tumorales son fuente de ROS, sustancias capaces de mediar en las diferentes etapas necesarias para que se produzca la migración y proliferación de la enfermedad metastásica.

En este sentido es fundamental conocer el estado de los sistemas detoxificadores, encargados de disminuir la concentración de ROS y por tanto decisivos en el avance de la enfermedad. En cuanto al GSH, al aumentar el estado oxidativo y por tanto el estado metastático, se detecta mayor consumo, reflejado tanto en plasma como en linfocitos. Cabe destacar que las concentraciones de GSH obtenidas de las mediciones realizadas tanto en plasma como en linfocitos en el grupo de pacientes con metástasis y en tratamiento quimioterápico ( $0,364 \pm 0,093$   $\mu\text{moles/g Hb}$  y  $2,68 \pm 0,572$   $\mu\text{moles/g proteína}$  respectivamente), son las más bajas detectadas a lo largo de todos los estudios realizados en la Tesis Doctoral. Estos valores corresponden al grupo de pacientes que presentan mayor nivel oxidativo, asociado a la participación de varias variables ya estudiadas y vinculadas a incrementos de ROS, tales como la propia enfermedad tumoral, el tratamiento quimioterápico y el desarrollo de metástasis y por tanto, relacionados con estados de mayor demanda detoxificadora del organismo.

En relación al sistema tiorredoxina, el efecto sobre la tiorredoxina y la tiorredoxina reductasa no es tan marcado como en el caso del GSH, a pesar de presentar las mismas condiciones de estrés oxidativo al tratarse de los mismos grupos de población. Esto es debido a que este sistema redox es especialmente complejo, dado que los factores o sustancias que intervienen en su control producen en muchos casos efectos opuestos en cuanto a su activación o aumento de concentración. Este complicado balance hace difícil predecir el comportamiento en base al estado oxidativo y hasta la fecha no existen estudios que aborden desde tan diferentes perspectivas el estado redox asociado a diferentes estados oxidativos.

En el caso de la tiorredoxina, se detecta de forma significativa mayor concentración en la población con metástasis tumoral ( $72,0 \pm 26,7$  ng/mL), tal y como cabría esperar y de acuerdo a los trabajos postulados con anterioridad (Lincoln et al., 2003). Sin embargo, no es en esta población en la que se detecta la mayor concentración de Trx medida en los diversos estudios realizados en este trabajo, si no que este valor corresponde a la población con metástasis pero sin tratamiento quimioterápico ( $115 \pm 66,4$  ng/mL). Este hecho valida la premisa de cómo el tratamiento afecta directamente a la tiorredoxina, ya que su empleo en un grupo de pacientes con metástasis supone un descenso drástico en la concentración de esta especie antioxidante (Sun and Rigas, 2008), tal y como muestran los resultados obtenidos.

Por otra parte, la tiorredoxina reductasa también presenta de forma significativa mayor actividad en el grupo de pacientes con metástasis. Asimismo, es también en esta población donde se ha encontrado la mayor actividad detectada en los diferentes estudios planteados en el desarrollo de este trabajo, tal y como ya había sido postulado con anterioridad.

Por tanto, el comportamiento del sistema tiorredoxina toma especial relevancia ya que elevadas concentraciones de ambas sustancias han sido relacionadas con un bajo nivel de apoptosis y un elevado potencial metastático, convirtiéndose en uno de los principales objetivos terapéuticos propuestos en la actualidad.

Por último, y en lo referente al estudio del estrés oxidativo asociado a metástasis, se ha abordado el análisis a partir de las diferentes localizaciones metastásicas. Dado que prácticamente la totalidad de los pacientes son intervenidos quirúrgicamente, de forma que se realiza una exéresis total de los trayectos y vías linfáticas correspondientes al segmento intestinal en que asienta el cáncer, queda la vía hemática como el principal camino de migración celular. De esta forma, la metástasis más comúnmente asociada al cáncer colorrectal es la hepática, gracias a mecanismos de metástasis hemática a través de la vena mesentérica y la porta hasta alcanzar el hígado. No obstante, también pueden existir otras localizaciones como el pulmón, las suprarrenales, huesos, riñones, peritoneo y cerebro, fundamentalmente.

En cuanto a los resultados obtenidos en el estudio, destacar que no se detectan diferencias especialmente marcadas entre un tipo de metástasis y otro, aunque sí se puede asociar menor capacidad antioxidante en el grupo de pacientes con un mayor avance de enfermedad, es decir, aquellos con metástasis hepática y en otra serie de localizaciones.

Asimismo, en el caso de los biomarcadores de óxido nítrico, también se detecta un comportamiento similar, de forma que no existen diferencias significativas entre los tres grupos de pacientes con enfermedad metastásica, a pesar de que los valores de concentración de nitrito y nitrato apuntan a un mayor estrés asociado a los pacientes con mayor progresión tumoral.

Los resultados de los parámetros indicadores del daño a lípidos, el MDA no refleja diferencias significativas entre las distintas poblaciones ni respecto al grupo de pacientes sin metástasis, tal y como ya se había puesto de manifiesto con anterioridad. Esto podría ser debido a que un estado oxidativo tan elevado como se detecta en base a los valores obtenidos, impediría reflejar las diferencias entre un grupo y otro. Sin embargo, los niveles de hidroperóxidos marcan la diferencia en estadios más avanzados, mostrándose nuevamente como un biomarcador asociado a estadios de enfermedad avanzada.

Por otra parte, en lo que respecta al daño a proteínas, sí se detecta de forma significativa un mayor estado de oxidación en el grupo de pacientes con mayor grado metastático respecto a los pacientes que presentan sólo metástasis hepática, consecuencia por tanto del alto nivel oxidativo asociado al grado de avance de la enfermedad.

En cuanto al estado redox, en primer lugar destacar que la concentración de GSH es menor a medida que progresa la enfermedad. Además, los grupos de población con metástasis no hepática y con metástasis hepática y otras, son los que presentan, tanto en plasma como en linfocitos, el menor valor de concentración de GSH detectado a lo largo de los diferentes estudios realizados. Esto hecho vuelve a sugerir que estos dos grupos de población se encuentran en elevados niveles de estrés oxidativo y por tanto requieren un mayor consumo de GSH.

El sistema tiorredoxina muestra el comportamiento esperado, de forma que se asocia mayor concentración de Trx y mayor actividad de TrxR a las poblaciones con mayor grado de enfermedad, a pesar de que las diferencias mostradas no son significativas en la mayoría de los casos.

En base a los resultados obtenidos, no parece claro que se pueda asociar de forma directa un estado oxidativo a un tipo u otro de metástasis, a pesar de que los datos pueden sugerir, aunque de forma no significativa en la mayoría de los casos, que el menor estado oxidativo se asocia con metástasis hepática, alcanzándose el mayor nivel de estrés en los pacientes que presentan metástasis múltiples incluidas las hepáticas y por tanto un mayor grado de enfermedad. La población con metástasis no hepática, se posiciona habitualmente en una situación intermedia entre estos dos últimos grupos, lo que indicaría un estado intermedio de estrés y por tanto de enfermedad neoplásica. En este sentido, destacar que no se han encontrado estudios experimentales realizados a este respecto, que puedan ayudar a corroborar los datos obtenidos en este estudio.

#### ***5.2.4. Estudio del estrés oxidativo asociado a concentración de los marcadores tumorales CEA y Ca 19.9 en pacientes con cáncer colorrectal***

Los marcadores tumorales surgieron como una gran esperanza para el diagnóstico del cáncer, pero su baja especificidad y/o sensibilidad y su variable aparición en función de diferentes factores demostró que no alcanzaban las expectativas que albergaban. No obstante, siguen desarrollando una labor fundamental como herramientas de monitorización del curso de la enfermedad neoplásica. Por tanto, resulta interesante estudiar si se puede establecer algún tipo de relación entre el valor alcanzado del marcador tumoral y el estrés oxidativo y por tanto de forma indirecta con el grado de avance de la enfermedad.

Los marcadores tumorales empleados de forma más habitual en la monitorización del cáncer colorrectal son el antígeno carcinoembrionario (CEA) y el antígeno Ca 19.9 (Ca 19.9). Sin embargo, la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) recoge en su guía sobre recomendaciones de uso de los marcadores tumorales (Locker et al., 2006) que no existen datos suficientes para

recomendar el marcador Ca 19.9 en screening, diagnóstico, estadiaje, supervivencia o monitorización del tratamiento en pacientes con cáncer colorrectal.

No obstante y con objeto de poder o no confirmar los hechos clínicos respecto al empleo de estos dos marcadores tumorales, se ha procedido a estudiar si existen diferencias en cuanto al estado oxidativo entre dos poblaciones con cáncer colorrectal, sometidas a tratamiento quimioterápico pero con mayor o menor concentración del límite establecido como patológico de los marcadores tumorales CEA y Ca 19.9.

En lo que respecta al antígeno carcinoembrionario, sí se detectan diferencias significativas en todos y cada uno de los parámetros estudiados entre las dos poblaciones con CCR. Así, el grupo de pacientes que presenta una concentración de CEA  $\geq 5$  ng/mL tiene asociado un mayor estado oxidativo respecto a la población cuyo marcador se encuentra por debajo del límite marcado como patológico según laboratorio de referencia. El análisis de correlaciones entre los diferentes parámetros de estrés oxidativo y estado redox con los niveles de CEA establecen sólo una correlación positiva entre este marcador tumoral y la TRx (0,5286,  $p < 0,005$ ).

Este hecho vuelve a poner de manifiesto, que a pesar de las limitaciones existentes en el empleo de este marcador tumoral (Chau et al., 2004; Macdonald, 1999; Palmqvist et al., 2003), si que existe un determinado nivel de asociación entre su concentración y el estado oxidativo y por ende del grado de progresión o presencia de enfermedad tumoral colorrectal.

Por otra parte, según ASCO, CEA es el marcador de elección para la monitorización de los pacientes durante el tratamiento quimioterápico, aconsejando su medida al inicio del tratamiento y cada de uno a tres meses durante el periodo que el paciente esté tratado. Sin embargo, Sorbye y colaboradores (Sorbye and Dahl, 2003, 2004) observaron que se pueden producir incrementos puntuales de la concentración de CEA durante las primeras de 4 a 6 semanas del inicio de una nueva terapia, especialmente con el empleo del oxaliplatino, pudiendo estar producido por cambios en la función hepática.

A la vista de este hecho y con objeto de validar las conclusiones derivadas de los datos empleados en el análisis realizado, se ha hecho otro estudio sin tener en cuenta los pacientes tratados con oxaliplatino, con objeto de verificar si los valores de CEA empleados podían estar distorsionados por el empleo de este fármaco, obteniendo sin embargo, que las diferencias mostradas entre las dos poblaciones estudiadas siguen siendo muy similares, poniendo por tanto de manifiesto que los valores de CEA que se han utilizado no se habían visto afectados por el empleo del oxaliplatino en su tratamiento quimioterápico.

En lo referente al marcador tumoral Ca 19.9, sólo se establecen diferencias significativas entre las dos poblaciones estudiadas ( $\text{Ca } 19.9 < 37 \text{ U/mL}$  y  $\text{Ca } 19.9 \geq 37 \text{ U/mL}$ ) en el caso de los biomarcadores de óxido nítrico. Este aspecto podría indicar la posibilidad de que este marcador se encuentre vinculado de alguna forma al óxido nítrico. Dado que este marcador se emplea en otra serie de procesos carcinogénicos como el cáncer gástrico o pancreático (Steinberg, 1990; Tempero et al., 1987), patologías asociadas con niveles elevados de óxido nítrico, estos resultados abren una nueva vía de trabajo con objeto de estudiar si existe algún tipo de asociación entre este marcador y el óxido nítrico o sus derivados nitrito y nitrato.

A pesar de no estar descrito en la literatura científica, el estudio de las diferencias de los niveles de oxidación sin tener en cuenta los pacientes tratados con oxaliplatino muestra el mismo resultado que el obtenido al estudiar las dos poblaciones en tratamiento quimioterápico.

Estos resultados contribuyen a reforzar la idea ya existente de la baja utilidad del marcador Ca 19.9 en cuanto a evolución y progresión de enfermedad, dado que en base a los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo, progresión corresponde a mayor grado de estrés oxidativo, asociación que no ha quedado puesta de manifiesto en este estudio. Asimismo se demuestra que valores de mayor concentración de CEA, asociados a progresión de enfermedad, se relacionan con mayor grado de estrés, corroborando de nuevo como el nivel oxidativo también puede ser un adecuado marcador en cuanto a inicio, promoción y progresión de enfermedad neoplásica colorrectal.

### **5.2.5. Estudio del estrés oxidativo asociado a otras patologías en pacientes con cáncer colorrectal**

Desde hace varios años, diversos estudios han puesto de manifiesto como el estrés oxidativo también está relacionado con otra serie de enfermedades tales como hipertensión arterial, diabetes, lipidemias y EPOC (Valko et al., 2007). En este sentido, como parte del estudio del estrés oxidativo asociado al cáncer colorrectal, resulta necesario conocer no sólo si parte de este estrés puede ser debido a estas patologías de base, sino también cómo estas enfermedades pueden conferir niveles de estrés adicionales a esta serie de pacientes.

A pesar de que dichas patologías han sido asociadas a estrés oxidativo, los resultados de los estudios realizados no muestran este efecto ni en los pacientes con EPOC, ni con diabetes, ni en los que ya han desarrollado otro tipo de neoplasia con anterioridad.

Por otra parte, los pacientes que presentan alguna alteración en su perfil lipídico respecto a los que no, apenas muestran alguna diferencia significativa, traduciéndose por tanto en que ambas poblaciones presentan similares niveles de estrés.

Sin embargo, el grupo de población con hipertensión arterial presenta mayor nivel de estrés oxidativo respecto al grupo sin HTA, explicitado a través de determinados parámetros relacionados con el daño oxidativo a lípidos y a proteínas y en lo que se refiere al estado redox, evidencias recogidas en diversos trabajos ya publicados con anterioridad (Kukreja and Hess, 1992; Molavi and Mehta, 2004). No obstante, a pesar de presentar cierto grado de significancia, la diferencia de estrés oxidativo entre ambas poblaciones no es suficientemente relevante como para que distorsione los resultados que han sido asociados al cáncer colorrectal y al tratamiento quimioterápico durante el desarrollo de este trabajo. Además, en cualquier caso, la distribución de los pacientes con HTA es muy homogénea en cualquiera de los grupos de población establecidos en los diferentes estudios realizados.

Asimismo, la ausencia o la baja significancia de estrés mostrada en las poblaciones con esta serie de patologías de base puede ser debido a que el fuerte estrés asociado al proceso neoplásico junto con el tratamiento quimioterápico enmascara los menores niveles de estrés que se relacionan con esta serie de enfermedades.

#### ***5.2.6. Estudio de las correlaciones entre los diferentes marcadores de estrés oxidativo en pacientes con cáncer colorrectal***

Para finalizar el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se ha considerado interesante el estudio de como se relacionan entre sí los diferentes parámetros indicadores del estrés oxidativo tanto en el grupo de sujetos control como en los pacientes con cáncer colorrectal así como el diferente comportamiento de las correlaciones establecidas entre ambos grupos de población. El análisis en detalle de las diferentes correlaciones que se establezcan podría permitir concluir si alguno de los parámetros estudiados destaca como un mejor biomarcador para el estudio del estrés oxidativo asociado al cáncer colorrectal.

En primer lugar, tal y como cabía esperar en el grupo de sujetos control, la correlación positiva que se establece entre la capacidad antioxidante total del plasma con las moléculas encargadas del mantenimiento del equilibrio redox pone de manifiesto el importante papel que juegan estos compuestos antioxidantes en el nivel oxidativo celular (Di Giacomo et al., 2003). Asimismo, debido posiblemente a los cambios que se producen en las moléculas de GSH y del sistema tiorredoxina en pacientes con cáncer colorrectal y asociados a la propia enfermedad no se obtuvieron correlaciones entre el estado redox y la capacidad antioxidante total.

El diferente comportamiento de las correlaciones establecidas entre los indicadores de óxido nítrico y la capacidad antioxidante total de plasma entre el grupo de sujetos control y de los enfermos con CCR, sugiere de nuevo la estrecha asociación que se establece entre las especies reactivas derivadas del nitrógeno (RNS) y una menor capacidad antioxidante asociada al propio proceso carcinogénico (Mocellin, 2009).

Por otra parte, cabe destacar como los grupos carbonilo, indicadores del daño oxidativo a las proteínas, se postulan como un buen biomarcador para el estudio del estrés oxidativo tanto en sujetos control como en pacientes con cáncer colorrectal, dado que se correlaciona de forma significativa con la capacidad antioxidante total, con el daño oxidativo y sólo en el caso de sujetos control con el estado redox. Esta falta de correlación entre los GC y los parámetros encargados del equilibrio redox detectado en la población de enfermos podría ser debida a los importantes cambios que se producen en la molécula antioxidante GSH y en el sistema tiorredoxina asociado al desarrollo de la enfermedad colorrectal, tal y como se ha ido recogiendo en los diferentes apartados del presente trabajo (Mansego et al., 2007). El empleo de los grupos carbonilo medidos en plasma como indicador de estrés oxidativo, ya ha sido puesto de manifiesto a lo largo de la discusión de resultados, dado que en los pacientes con CCR respecto al grupo control se detecta un fuerte y marcado incremento de la concentración de este parámetro, requiriendo de técnicas de medida con menor sensibilidad con respecto a las necesarias para la cuantificación de otro tipo de parámetros y/o medios biológicos estudiados en este trabajo.

El incremento de estrés oxidativo presente en la población con cáncer colorrectal vuelve a reflejarse en el daño detectado en las estructuras lipídicas, a través de la cuantificación de los hidroperóxidos (Di Giacomo et al., 2003). De esta forma, se observa que este parámetro se correlaciona de forma inversa con la capacidad antioxidante total y de forma positiva con el sistema tiorredoxina, lo que sugiere que el incremento de estrés oxidativo puede desencadenar la activación y puesta en marcha de los sistemas compensatorios del daño oxidativo molecular.

En cuanto al estado redox y los biomarcadores de daño oxidativo, la correlación negativa que se establece entre los grupos carbonilo y los tioles antioxidantes en el grupo de sujetos control, pone de nuevo de manifiesto que un mayor estrés oxidativo, reflejado a través del incremento en la oxidación de proteínas, lleva asociado una disminución de las moléculas antioxidantes encargadas de reestablecer el equilibrio redox. Asimismo, también se establece una correlación directa entre los parámetros indicadores de la capacidad antioxidante total FRAP y ABTS y la tiorredoxina, indicando una vez más el importante papel que juega en el mantenimiento óptimo en el estado redox. Sin embargo, cuando los

niveles de estrés oxidativo son mayores, estando asociados a la enfermedad carcinogénica, no se establece la misma respuesta fisiológica, ya que el complejo mecanismo de la propia enfermedad así como de otra serie de factores intervinientes en el estrés oxidativo como el tratamiento quimioterápico, hace que no se establezcan de forma significativa correlaciones con los parámetros del estado redox, reflejando por tanto la ruptura del equilibrio, dejando de contribuir a su reestablecimiento (Arner and Holmgren, 2006).

Por otra parte, el GSH medido en linfocitos, que no se correlaciona en la población de sujetos control, si va a ser un marcador importante en enfermos con cáncer colorrectal. El hecho de que en la población de pacientes el GSH se correlacione negativamente con marcadores de daño oxidativo, como son los nitritos, nitratos, hidroperóxidos y grupos carbonilo de linfocitos, corrobora los resultados previamente obtenidos en los estudios realizados, en los que se ha discutido que un mayor estrés oxidativo conlleva un mayor consumo de GSH como mecanismo compensatorio de los niveles de oxidación celular (Balendiran et al., 2004).



***CONCLUSIONES***



## 6. CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes alcanzadas en este trabajo son las que se indican a continuación:

1. Antioxidantes que se pueden ver influidos por la dieta como polifenoles y GSH están significativamente disminuidos en pacientes con cáncer colorrectal en comparación con otras neoplasias. Los niveles de MDA y GC fueron significativamente diferentes entre las distintas neoplasias, pudiéndose establecer como marcadores diferenciales de estrés oxidativo.
2. Nuestros resultados confirman plenamente la referida existencia de mayor estrés oxidativo y cambios en el estado redox plasmático en pacientes con cancer colorrectal como muestran la disminución de la capacidad antioxidante e incremento de biomarcadores.
3. El tratamiento con quimioterapia, independientemente del tipo de tratamiento, se relaciona directamente con un mayor estrés oxidativo en plasma, caracterizado por un descenso significativo del estado antioxidante y un incremento significativo de los biomarcadores de daño oxidativo.
4. Los tratamientos que combinan anticuerpos monoclonales como el cetuximab o bevacizumab, resulta en un incremento del estrés oxidativo plasmático con mayor daño a lípidos y proteínas, asociado a una disminución de los niveles de GSH plasmático.
5. Los pacientes con metástasis tienen mayor estrés oxidativo que los que no tienen metástasis, con niveles significativamente más altos de GC y de hidroperóxidos lipídicos. El estado antioxidante se ve disminuido en función del avance de la enfermedad.
6. El estado redox plasmático, medido como niveles de Trx y GSH podría ser un buen biomarcador del estado metastásico y de la respuesta a los tratamientos quimioterapéuticos.

7. Los grupos carbonilos e hidroperóxidos son los biomarcadores de daño oxidativo más sensibles a cambios en el avance de la enfermedad.
8. La tiorredoxina se establece como un posible biomarcador indicador de la evolución de la enfermedad, tal y como muestra su correlación positiva con el marcador tumoral CEA.

## ***REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, J., and Berk, B.C. (1999). Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 21003-21010.

Abudu, N., Miller, J.J., Attaelmannan, M., and Levinson, S.S. (2004). Vitamins in human arteriosclerosis with emphasis on vitamin C and vitamin E. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 339, 11-25.

Adams, R., and Maughan, T. (2007). Predicting response to epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy* 7, 503-518.

Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105, 121-126.

Ahmad, R., Tripathi, A.K., Tripathi, P., Singh, S., Singh, R., and Singh, R.K. (2008). Malondialdehyde and protein carbonyl as biomarkers for oxidative stress and disease progression in patients with chronic myeloid leukemia. *In Vivo* 22, 525-528.

Amado, R.G., Wolf, M., Peeters, M., Van Cutsem, E., Siena, S., Freeman, D.J., Juan, T., Sikorski, R., Suggs, S., Radinsky, R., *et al.* (2008). Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26, 1626-1634.

Ames, B.N., and Gold, L.S. (1990). Too many rodent carcinogens: mitogenesis increases mutagenesis. *Science* 249, 970-971.

Anderson, M.E. (1997). Glutathione and glutathione delivery compounds. *Advances in Pharmacology* 38, 65-78.

Andreyev, H.J., Norman, A.R., Cunningham, D., Oates, J., Dix, B.R., Iacopetta, B.J., Young, J., Walsh, T., Ward, R., Hawkins, N., *et al.* (2001). Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *British Journal of Cancer* 85, 692-696.

Angelini, G., Gardella, S., Ardy, M., Ciriolo, M.R., Filomeni, G., Di Trapani, G., Clarke, F., Sitia, R., and Rubartelli, A. (2002). Antigen-presenting dendritic cells provide the reducing extracellular microenvironment required for T lymphocyte activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 1491-1496.

Arbiser, J.L., Petros, J., Klaffer, R., Govindajaran, B., McLaughlin, E.R., Brown, L.F., Cohen, C., Moses, M., Kilroy, S., Arnold, R.S., *et al.* (2002). Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 715-720.

Arner, E.S., and Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry* 267, 6102-6109.

Arner, E.S., and Holmgren, A. (2006). The thioredoxin system in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 16, 420-426.

Arner, E.S., Nakamura, H., Sasada, T., Yodoi, J., Holmgren, A., and Spyrou, G. (2001). Analysis of the inhibition of mammalian thioredoxin, thioredoxin reductase, and glutaredoxin by cis-diamminedichloroplatinum (II) and its major metabolite, the glutathione-platinum complex. *Free Radical Biology and Medicine* 31, 1170-1178.

Arnold, M.W., Young, D.C., Hitchcock, C.L., Schneebaum, S., and Martin, E.W., Jr. (1995). Radioimmunoguided surgery in primary colorectal carcinoma: an intraoperative prognostic tool and adjuvant to traditional staging. *American Journal of Surgery* 170, 315-318.

Arrigo, A.P. (1999). Gene expression and the thiol redox state. *Free Radical Biology and Medicine* 27, 936-944.

Awasthi, Y.C., Sharma, R., Cheng, J.Z., Yang, Y., Sharma, A., Singhal, S.S., and Awasthi, S. (2003). Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Molecular Aspects of Medicine* 24, 219-230.

Balendiran, G.K., Dabur, R., and Fraser, D. (2004). The role of glutathione in cancer. *Cell Biochemistry and Function* 22, 343-352.

Ballatori, N., Krance, S.M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., and Hammond, C.L. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological Chemistry* 390, 191-214.

Baron, J.A., Sandler, R.S., Haile, R.W., Mandel, J.S., Mott, L.A., and Greenberg, E.R. (1998). Folate intake, alcohol consumption, cigarette smoking, and risk of colorectal adenomas. *Journal of the National Cancer Institute* 90, 57-62.

Bates, S.E. (1989). The use and potential of serum tumour markers, new and old. *Drugs* 38, 9-18.

Bates, S.E., and Longo, D.L. (1987). Use of serum tumor markers in cancer diagnosis and management. *Seminars in Oncology* 14, 102-138.

Beckman, K.B., and Ames, B.N. (1997). Oxidative decay of DNA. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 19633-19636.

Belonogov, R.N., Titova, N.M., Lapeshin, P.V., Ivanova, Y.R., Shevtsova, A.O., and Pokrovskii, A.A. (2009). Changes in the content of protein and lipid oxidative modification products in tumor tissue at different stages of lung cancer. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 147, 630-631.

Benvenuti, S., Sartore-Bianchi, A., Di Nicolantonio, F., Zanon, C., Moroni, M., Veronese, S., Siena, S., and Bardelli, A. (2007). Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Research* 67, 2643-2648.

- Benzie, I.F., and Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239, 70-76.
- Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., and Ferencik, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences* 65, 1865-1874.
- Berger, S.H., and Hakala, M.T. (1984). Relationship of dUMP and free FdUMP pools to inhibition of thymidylate synthase by 5-fluorouracil. *Molecular Pharmacology* 25, 303-309.
- Berglund, G. (2002). Anthropometry, physical activity and cancer of the breast and colon. *IARC Scientific Publications* 156, 237-241.
- Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 20313-20316.
- Bisby, R.H., and Parker, A.W. (1991). Reactions of the alpha-tocopheroxyl radical in micellar solutions studied by nanosecond laser flash photolysis. *FEBS Letters* 290, 205-208.
- Blau, S., Rubinstein, A., Bass, P., Singaram, C., and Kohen, R. (1999). Differences in the reducing power along the rat GI tract: lower antioxidant capacity of the colon. *Molecular and Cellular Biochemistry* 194, 185-191.
- Blaut, M., Schoefer, L., and Braune, A. (2003). Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernährungsforschung* 73, 79-87.
- Bodannes, R.S., and Chan, P.C. (1979). Ascorbic acid as a scavenger of singlet oxygen. *FEBS Letters* 105, 195-196.
- Bos, J.L. (1989). Ras oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Research* 49, 4682-4689.
- Boyle, P., and Ferlay, J. (2005a). Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 16, 481-488.
- Boyle, P., and Ferlay, J. (2005b). Mortality and survival in breast and colorectal cancer. *Nature Clinical Practice* 2, 424-425.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56, 317-333.
- Brigelius-Flohe, R. (2006). Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biological Chemistry* 387, 1329-1335.
- Brigelius-Flohe, R., and Traber, M.G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J* 13, 1145-1155.

- Brigelius, R., Muckel, C., Akerboom, T.P., and Sies, H. (1983). Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochemical Pharmacology* 32, 2529-2534.
- Brink, A., Richter, I., Lutz, U., Wanek, P., Stopper, H., and Lutz, W.K. (2009). Biological significance of DNA adducts: Comparison of increments over background for various biomarkers of genotoxicity in L5178Y tk(+/-) mouse lymphoma cells treated with hydrogen peroxide and cumene hydroperoxide. *Mutation Research* 678, 123-128.
- Brown, M.L., Braun, M., Cicalese, L., and Rastellini, C. (2005). Effect of perioperative antioxidant therapy on suboptimal islet transplantation in rats. *Transplantation Proceedings* 37, 217-219.
- Bulteau, A.L., Szweda, L.I., and Friguet, B. (2006). Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aging. *Experimental Gerontology* 41, 653-657.
- Burton, G.W., and Ingold, K.U. (1989). Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Annals of the New York Academy of Sciences* 570, 7-22.
- Burton, G.W., Ingold, K.U., Cheeseman, K.H., and Slater, T.F. (1990). Application of deuterated alpha-tocopherols to the biokinetics and bioavailability of vitamin E. *Free Radical Research Communications* 11, 99-107.
- Cabello, C.M., Bair, W.B., 3rd, and Wondrak, G.T. (2007). Experimental therapeutics: targeting the redox Achilles heel of cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 8, 1022-1037.
- Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry* 58, 79-110.
- Cadenas, E. (1997). Basic mechanisms of antioxidant activity. *BioFactors* (Oxford, England) 6, 391-397.
- Caprioni, F., and Fornarini, G. (2007). Bevacizumab in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Future Oncology* (London, England) 3, 141-148.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* 6, 389-395.
- Carnevali, S., Petruzzelli, S., Longoni, B., Vanacore, R., Barale, R., Cipollini, M., Scatena, F., Paggiaro, P., Celi, A., and Giuntini, C. (2003). Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *American Journal of Physiology* 284, L955-963.
- Carr, A., and Frei, B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB Journal* 13, 1007-1024.
- Carr, A., and Frei, B. (2000). The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium-derived nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* 28, 1806-1814.

Castro-Carpeno, J.D., Moyano, M.S., Saenz, E.C., Belda-Iniesta, C., Batlle, J.F., and Baron, M.G. (2009). Bevacizumab: a safe and effective treatment in a patient with advanced colorectal cancer and repeated removal of metastases. *Anti-cancer drugs 20 Special Issue 1*, S7-S10.

Ceccarelli, J., Delfino, L., Zappia, E., Castellani, P., Borghi, M., Ferrini, S., Tosetti, F., and Rubartelli, A. (2008). The redox state of the lung cancer microenvironment depends on the levels of thioredoxin expressed by tumor cells and affects tumor progression and response to prooxidants. *International Journal of Cancer 123*, 1770-1778.

Cejas, P., Casado, E., Belda-Iniesta, C., De Castro, J., Espinosa, E., Redondo, A., Sereno, M., Garcia-Cabezas, M.A., Vara, J.A., Dominguez-Caceres, A., *et al.* (2004). Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer (Spain). *Cancer Causes Control 15*, 707-719.

Cerutti, P.A. (1985). Prooxidant states and tumor promotion. *Science (New York, NY 227*, 375-381.

Cerutti, P.A., and Trump, B.F. (1991). Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer Cells 3*, 1-7.

Coleman, M.P., Gatta, G., Verdecchia, A., Esteve, J., Sant, M., Storm, H., Allemani, C., Ciccolallo, L., Santaquilani, M., and Berrino, F. (2003). EUROCORE-3 summary: cancer survival in Europe at the end of the 20th century. *Annals of Oncology 14 Suppl 5*, v128-149.

Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal 17*, 1195-1214.

Cornell, J.S., and Meister, A. (1976). Glutathione and gamma-glutamyl cycle enzymes in crypt and villus tip cells of rat jejunal mucosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 73*, 420-422.

Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M., and Harman, D. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine 107*, 526-545.

Cutler, R.G. (1984). Urate and ascorbate: their possible roles as antioxidants in determining longevity of mammalian species. *Archives of Gerontology and Geriatrics 3*, 321-348.

Chan, J.M., Stampfer, M.J., Ma, J., Rimm, E.B., Willett, W.C., and Giovannucci, E.L. (1999). Supplemental vitamin E intake and prostate cancer risk in a large cohort of men in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 8*, 893-899.

Chau, I., Allen, M.J., Cunningham, D., Norman, A.R., Brown, G., Ford, H.E., Tebbutt, N., Tait, D., Hill, M., Ross, P.J., *et al.* (2004). The value of routine serum carcino-embryonic antigen measurement and computed tomography in the surveillance of patients after adjuvant chemotherapy for colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology 22*, 1420-1429.

- Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S., and Loeb, L.A. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A--C substitutions. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 166-172.
- Choi, J.H., Lim, H.Y., Joo, H.J., Kim, H.S., Yi, J.W., Kim, H.C., Cho, Y.K., Kim, M.W., and Lee, K.B. (2002). Expression of multidrug resistance-associated protein1, P-glycoprotein, and thymidylate synthase in gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil and doxorubicin-based adjuvant chemotherapy after curative resection. *British Journal of Cancer* 86, 1578-1585.
- Chung, K.Y., Shia, J., Kemeny, N.E., Shah, M., Schwartz, G.K., Tse, A., Hamilton, A., Pan, D., Schrag, D., Schwartz, L., *et al.* (2005). Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *Journal of Clinical Oncology* 23, 1803-1810.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., and Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry* 52, 601-623.
- Danielson, S.R., and Andersen, J.K. (2008). Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine* 44, 1787-1794.
- David, S.S., O'Shea, V.L., and Kundu, S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 447, 941-950.
- Davies, K.J. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *The Journal of Biological Chemistry* 262, 9895-9901.
- Dayan, A.D., and Paine, A.J. (2001). Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of the literature from 1985 to 2000. *Human and Experimental Toxicology* 20, 439-451.
- de Gramont, A., Bosset, J.F., Milan, C., Rougier, P., Bouche, O., Etienne, P.L., Morvan, F., Louvet, C., Guillot, T., Francois, E., *et al.* (1997). Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. *Journal of Clinical Oncology* 15, 808-815.
- de Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., *et al.* (2000). Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 18, 2938-2947.
- Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., and Davies, M.J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical Journal* 324 ( Pt 1), 1-18.
- Desideri, A., and Falconi, M. (2003). Prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutases. *Biochemical Society Transactions* 31, 1322-1325.

Di Fiore, F., Blanchard, F., Charbonnier, F., Le Pessot, F., Lamy, A., Galais, M.P., Bastit, L., Killian, A., Sesboue, R., Tuech, J.J., *et al.* (2007). Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *British Journal of Cancer* 96, 1166-1169.

Di Giacomo, C., Acquaviva, R., Lanteri, R., Licata, F., Licata, A., and Vanella, A. (2003). Nonproteic antioxidant status in plasma of subjects with colon cancer. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, NJ) 228, 525-528.

Dincer, Y., Akcay, T., Tortum, O.B., and Dogusoy, G. (2006). Nitric oxide and antioxidant defense in patients with gastric cancer. *Digestive Diseases and Sciences* 51, 1367-1370.

Dostalek, M., Hardy, K.D., Milne, G.L., Morrow, J.D., Chen, C., Gonzalez, F.J., Gu, J., Ding, X., Johnson, D.A., Johnson, J.A., *et al.* (2008). Development of oxidative stress by cytochrome P450 induction in rodents is selective for barbiturates and related to loss of pyridine nucleotide-dependent protective systems. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 17147-17157.

Douillard, J.Y., Cunningham, D., Roth, A.D., Navarro, M., James, R.D., Karasek, P., Jandik, P., Iveson, T., Carmichael, J., Alakl, M., *et al.* (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 355, 1041-1047.

Draper, H.H., Squires, E.J., Mahmoodi, H., Wu, J., Agarwal, S., and Hadley, M. (1993). A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radical Biology and Medicine* 15, 353-363.

Dreher, D., and Junod, A.F. (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. *European Journal of Cancer* 32A, 30-38.

Dreys, J., Medinger, M., Schmidt-Gersbach, C., Weber, R., and Unger, C. (2003). Receptor tyrosine kinases: the main targets for new anticancer therapy. *Current Drug Targets* 4, 113-121.

Droge, W. (2002a). Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Experimental Gerontology* 37, 1333-1345.

Droge, W. (2002b). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82, 47-95.

Du, G.J., Lin, H.H., Xu, Q.T., and Wang, M.W. (2006). Bcl-2 switches the type of demise from apoptosis to necrosis via cyclooxygenase-2 upregulation in HeLa cell induced by hydrogen peroxide. *Cancer Letters* 232, 179-188.

Duffy, M.J., van Dalen, A., Haglund, C., Hansson, L., Klapdor, R., Lamerz, R., Nilsson, O., Sturgeon, C., and Topolcan, O. (2003). Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* 39, 718-727.

- Eissa, L.A., and Esmaeel, M.I. (2008). Relevance of some serum biomarkers (E cadherin, GAGs and MDA in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 21, 29-35.
- Ekstrom, A.M., Serafini, M., Nyren, O., Hansson, L.E., Ye, W., and Wolk, A. (2000). Dietary antioxidant intake and the risk of cardia cancer and noncardia cancer of the intestinal and diffuse types: a population-based case-control study in Sweden. *International Journal of Cancer* 87, 133-140.
- England, K., and Cotter, T.G. (2005). Direct oxidative modifications of signalling proteins in mammalian cells and their effects on apoptosis. *Redox Report* 10, 237-245.
- Esposito, F., Chirico, G., Montesano Gesualdi, N., Posadas, I., Ammendola, R., Russo, T., Cirino, G., and Cimino, F. (2003). Protein kinase B activation by reactive oxygen species is independent of tyrosine kinase receptor phosphorylation and requires SRC activity. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 20828-20834.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J., and Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* 11, 81-128.
- Estrela, J.M., Ortega, A., and Obrador, E. (2006). Glutathione in cancer biology and therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 43, 143-181.
- Evens, A.M., Schumacker, P.T., Helenowski, I.B., Singh, A.T., Dokic, D., Keswani, A., Kordeluk, E., Raji, A., Winter, J.N., Jovanovic, B.D., *et al.* (2008). Hypoxia inducible factor-alpha activation in lymphoma and relationship to the thioredoxin family. *British Journal of Haematology* 141, 676-680.
- Eyries, M., Collins, T., and Khachigian, L.M. (2004). Modulation of growth factor gene expression in vascular cells by oxidative stress. *Endothelium* 11, 133-139.
- Fernandez, E., La Vecchia, C., Gonzalez, J.R., Lucchini, F., Negri, E., and Levi, F. (2005). Converging patterns of colorectal cancer mortality in Europe. *European Journal of Cancer* 41, 430-437.
- Ferraro, D., Corso, S., Fasano, E., Panieri, E., Santangelo, R., Borrello, S., Giordano, S., Pani, G., and Galeotti, T. (2006). Pro-metastatic signaling by c-Met through RAC-1 and reactive oxygen species (ROS). *Oncogene* 25, 3689-3698.
- Fiaschi, A.I., Cozzolino, A., Ruggiero, G., and Giorgi, G. (2005). Glutathione, ascorbic acid and antioxidant enzymes in the tumor tissue and blood of patients with oral squamous cell carcinoma. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 9, 361-367.
- Fink, S.P., Reddy, G.R., and Marnett, L.J. (1997). Mutagenicity in *Escherichia coli* of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 8652-8657.

Finley, J.W., Davis, C.D., and Feng, Y. (2000). Selenium from high selenium broccoli protects rats from colon cancer. *The Journal of Nutrition* 130, 2384-2389.

Fleischauer, A.T., Poole, C., and Arab, L. (2000). Garlic consumption and cancer prevention: meta-analyses of colorectal and stomach cancers. *The American Journal of Clinical Nutrition* 72, 1047-1052.

Floyd, R.A. (1990). The development of a sensitive analysis for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Free Radical Research Communications* 8, 139-141.

Fournier, D.B., Erdman, J.W., Jr., and Gordon, G.B. (1998). Soy, its components, and cancer prevention: a review of the in vitro, animal, and human data. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7, 1055-1065.

Fujita, M., Tsuruta, R., Kasaoka, S., Fujimoto, K., Tanaka, R., Oda, Y., Nanba, M., Igarashi, M., Yuasa, M., Yoshikawa, T., *et al.* (2009). In vivo real-time measurement of superoxide anion radical with a novel electrochemical sensor. *Free Radical Biology and Medicine* 47, 1039-1048.

Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C.O., Buerk, D.G., Huang, P.L., and Jain, R.K. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 2604-2609.

Galati, G., and O'Brien, P.J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine* 37, 287-303.

George, J., and Struthers, A. (2009). The role of urate and xanthine oxidase in vascular oxidative stress: future directions. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 5, 799-803.

Giovannucci, E. (1999). Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *Journal of the National Cancer Institute* 91, 317-331.

Giovannucci, E. (2006). Calcium plus vitamin D and the risk of colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 354, 2287-2288; author reply 2287-2288.

Girotti, A.W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research* 39, 1529-1542.

Gold, P., and Freedman, S.O. (1965). Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *The Journal of Experimental Medicine* 122, 467-481.

Goldberg, R.M., Sargent, D.J., Morton, R.F., Fuchs, C.S., Ramanathan, R.K., Williamson, S.K., Findlay, B.P., Pitot, H.C., and Alberts, S.R. (2004). A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 22, 23-30.

- Graham, R.A., Wang, S., Catalano, P.J., and Haller, D.G. (1998). Postsurgical surveillance of colon cancer: preliminary cost analysis of physician examination, carcinoembryonic antigen testing, chest x-ray, and colonoscopy. *Annals of Surgery* 228, 59-63.
- Greenwald, P., Clifford, C.K., and Milner, J.A. (2001). Diet and cancer prevention. *European Journal of Cancer* 37, 948-965.
- Grivicich, I., Regner, A., da Rocha, A.B., Kayser, G.B., Schunemann, D.P., Grass, L.B., Alves, P.A., Henriques, J.A., and Schwartzmann, G. (2005). The irinotecan/5-fluorouracil combination induces apoptosis and enhances manganese superoxide dismutase activity in HT-29 human colon carcinoma cells. *Chemotherapy* 51, 93-102.
- Grotto, D., Santa Maria, L.D., Boeira, S., Valentini, J., Charao, M.F., Moro, A.M., Nascimento, P.C., Pombum, V.J., and Garcia, S.C. (2007). Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43, 619-624.
- Gutteridge, J.M., and Halliwell, B. (1989). Iron toxicity and oxygen radicals. *Bailliere's Clinical Haematology* 2, 195-256.
- Haendeler, J. (2006). Thioredoxin-1 and posttranslational modifications. *Antioxidants and Redox Signaling* 8, 1723-1728.
- Haghdoust, S., Czene, S., Naslund, I., Skog, S., and Harms-Ringdahl, M. (2005). Extracellular 8-oxo-dG as a sensitive parameter for oxidative stress in vivo and in vitro. *Free Radical Research* 39, 153-162.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition* 16, 33-50.
- Halliwell, B. (1999). Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutation Research* 443, 37-52.
- Hehner, S.P., Breikreutz, R., Shubinsky, G., Unsoeld, H., Schulze-Osthoff, K., Schmitz, M.L., and Droge, W. (2000). Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. *Journal of Immunology* 165, 4319-4328.
- Heistad, D.D., Wakisaka, Y., Miller, J., Chu, Y., and Pena-Silva, R. (2009). Novel aspects of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circulation Journal* 73, 201-207.
- Hemila, H., and Wikstrom, M. (1985). Retinoids activate superoxide production by polymorphonuclear leucocytes. *Scandinavian Journal of Immunology* 21, 227-234.
- Hendrickse, C.W., Kelly, R.W., Radley, S., Donovan, I.A., Keighley, M.R., and Neoptolemos, J.P. (1994). Lipid peroxidation and prostaglandins in colorectal cancer. *The British Journal of Surgery* 81, 1219-1223.

Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.

Hensley, K., Robinson, K.A., Gabbita, S.P., Salsman, S., and Floyd, R.A. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine* 28, 1456-1462.

Hermans, N., Cos, P., Maes, L., De Bruyne, T., Vanden Berghe, D., Vlietinck, A.J., and Pieters, L. (2007). Challenges and pitfalls in antioxidant research. *Current Medicinal Chemistry* 14, 417-430.

Holmgren, A. (1979). Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Characterization of the enzymatic mechanism of *Escherichia coli* glutaredoxin. *The Journal of Biological Chemistry* 254, 3672-3678.

Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *The Journal of Biological Chemistry* 264, 13963-13966.

Holmgren, A., and Bjornstedt, M. (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology* 252, 199-208.

Hollins, D.L., Suliman, H.B., Piantadosi, C.A., and Carraway, M.S. (2006). Glutathione regulates susceptibility to oxidant-induced mitochondrial DNA damage in human lymphocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 40, 1220-1226.

Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., *et al.* (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 350, 2335-2342.

Hussain, S.P., Hofseth, L.J., and Harris, C.C. (2003). Radical causes of cancer. *Nature Reviews* 3, 276-285.

Hutter, E., Skovbro, M., Lener, B., Prats, C., Rabol, R., Dela, F., and Jansen-Durr, P. (2007). Oxidative stress and mitochondrial impairment can be separated from lipofuscin accumulation in aged human skeletal muscle. *Aging Cell* 6, 245-256.

Hynes, N.E., and Lane, H.A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews* 5, 341-354.

Ial'chenko, N.A., Lagutin, V.D., Lavik, N.N., and Musin, II (1991). [The clinical information value of an immunoenzyme study of the tumor markers CA-19-9, CEA and AFP in cancer of the stomach, pancreas, colon and rectum]. *Voprosy Onkologii* 37, 921-924.

Ichikawa, T., Ishikawa, G., and Yano, T. (1993). The prevention of oxy radical-mediated lung tumorigenesis in mice by vitamin E. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 39 *Suppl*, S49-55.

Il'yasova, D., Ivanova, A., Morrow, J.D., Cesari, M., and Pahor, M. (2008). Correlation between two markers of inflammation, serum C-reactive protein and interleukin 6,

and indices of oxidative stress in patients with high risk of cardiovascular disease. *Biomarkers* 13, 41-51.

Iles, K.E., and Forman, H.J. (2002). Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunologic Research* 26, 95-105.

Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.M., Kira, Y., Imada, I., and Utsumi, K. (2003). Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry* 10, 2495-2505.

Iqbal, S., and Lenz, H.J. (2004). Integration of novel agents in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 54 *Suppl* 1, S32-39.

Ishihara, J., Inoue, M., Iwasaki, M., Sasazuki, S., and Tsugane, S. (2008). Dietary calcium, vitamin D, and the risk of colorectal cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition* 88, 1576-1583.

Ishikawa, K., Takenaga, K., Akimoto, M., Koshikawa, N., Yamaguchi, A., Imanishi, H., Nakada, K., Honma, Y., and Hayashi, J. (2008). ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* 320, 661-664.

Janero, D.R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine* 9, 515-540.

Jaxel, C., Kohn, K.W., Wani, M.C., Wall, M.E., and Pommier, Y. (1989). Structure-activity study of the actions of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I: evidence for a specific receptor site and a relation to antitumor activity. *Cancer Research* 49, 1465-1469.

Jerremalm, E., Wallin, I., Yachnin, J., and Ehrsson, H. (2006). Oxaliplatin degradation in the presence of important biological sulphur-containing compounds and plasma ultrafiltrate. *European Journal of Pharmaceutical Science* 28, 278-283.

Ji, X., von Rosenvinge, E.C., Johnson, W.W., Tomarev, S.I., Piatigorsky, J., Armstrong, R.N., and Gilliland, G.L. (1995). Three-dimensional structure, catalytic properties, and evolution of a sigma class glutathione transferase from squid, a progenitor of the lens S-crystallins of cephalopods. *Biochemistry* 34, 5317-5328.

Jing, X., Ueki, N., Cheng, J., Imanishi, H., and Hada, T. (2002). Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines by emodin. *Jpn Journal of Cancer Research* 93, 874-882.

Jonker, D.J., O'Callaghan, C.J., Karapetis, C.S., Zalcborg, J.R., Tu, D., Au, H.J., Berry, S.R., Krahn, M., Price, T., Simes, R.J., *et al.* (2007). Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 357, 2040-2048.

Khanzode, S.S., Khanzode, S.D., and Dakhale, G.N. (2003). Serum and plasma concentration of oxidant and antioxidants in patients of *Helicobacter pylori* gastritis and its correlation with gastric cancer. *Cancer Letters* 195, 27-31.

- Kim, S.J., Miyoshi, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., Nakamura, H., Yodoi, J., Kato, K., and Noguchi, S. (2005). High thioredoxin expression is associated with resistance to docetaxel in primary breast cancer. *Clinical Cancer Research* 11, 8425-8430.
- Kirkham, P. (2007). Oxidative stress and macrophage function: a failure to resolve the inflammatory response. *Biochemical Society Transactions* 35, 284-287.
- Klaunig, J.E., and Kamendulis, L.M. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 44, 239-267.
- Knekt, P., Hakama, M., Jarvinen, R., Pukkala, E., and Heliövaara, M. (1998). Smoking and risk of colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 78, 136-139.
- Kogaki, H., Fujiwara, Y., Yoshiki, A., Kitajima, S., Tanimoto, T., Mitsui, A., Shimamura, T., Hamuro, J., and Ashihara, Y. (1996). Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for adult T-cell leukemia-derived factor and normal value measurement. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 10, 257-261.
- Kojo, S. (2004). Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 11, 1041-1064.
- Kopetz, S., Lesslie, D.P., Dallas, N.A., Park, S.I., Johnson, M., Parikh, N.U., Kim, M.P., Abbruzzese, J.L., Ellis, L.M., Chandra, J., *et al.* (2009). Synergistic activity of the SRC family kinase inhibitor dasatinib and oxaliplatin in colon carcinoma cells is mediated by oxidative stress. *Cancer Research* 69, 3842-3849.
- Koshland, D.E., Jr. (1992). The molecule of the year. *Science* 258, 1861.
- Krinsky, N.I. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine* 7, 617-635.
- Kukreja, R.C., and Hess, M.L. (1992). The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovascular Research* 26, 641-655.
- Kuroda, Y., and Hara, Y. (1999). Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutation Research* 436, 69-97.
- Kyriakis, J.M., and Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews* 81, 807-869.
- Laco, G.S., Collins, J.R., Luke, B.T., Kroth, H., Sayer, J.M., Jerina, D.M., and Pommier, Y. (2002). Human topoisomerase I inhibition: docking camptothecin and derivatives into a structure-based active site model. *Biochemistry* 41, 1428-1435.
- Landis, G.N., and Tower, J. (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of Ageing and Development* 126, 365-379.

- Le Bras, M., Clement, M.V., Pervaiz, S., and Brenner, C. (2005). Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histology and Histopathology* 20, 205-219.
- Leonard, S.S., Harris, G.K., and Shi, X. (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine* 37, 1921-1942.
- Leonarduzzi, G., Arkan, M.C., Basaga, H., Chiarpotto, E., Sevanian, A., and Poli, G. (2000). Lipid oxidation products in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine* 28, 1370-1378.
- Levi, F. (1999). Cancer prevention: epidemiology and perspectives. *European Journal of Cancer* 35, 1912-1924.
- Levi, F., Lucchini, F., Negri, E., Boyle, P., and La Vecchia, C. (2004). Cancer mortality in Europe, 1995-1999, and an overview of trends since 1960. *International Journal of Cancer* 110, 155-169.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., and Stadtman, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186, 464-478.
- Li, C.Q., Kim, M.Y., Godoy, L.C., Thiantanawat, A., Trudel, L.J., and Wogan, G.N. (2009). Nitric oxide activation of Keap1/Nrf2 signaling in human colon carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 14547-14551.
- Lim, S.D., Sun, C., Lambeth, J.D., Marshall, F., Amin, M., Chung, L., Petros, J.A., and Arnold, R.S. (2005). Increased Nox1 and hydrogen peroxide in prostate cancer. *The Prostate* 62, 200-207.
- Lincoln, D.T., Ali Emadi, E.M., Tonissen, K.F., and Clarke, F.M. (2003). The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer. *Anticancer Research* 23, 2425-2433.
- Liochev, S.I., and Fridovich, I. (1994). The role of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in the production of HO<sub>2</sub>: in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine* 16, 29-33.
- Liochev, S.I., and Fridovich, I. (2002). The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox Report* 7, 55-57; author reply 59-60.
- Locker, G.Y., Hamilton, S., Harris, J., Jessup, J.M., Kemeny, N., Macdonald, J.S., Somerfield, M.R., Hayes, D.F., and Bast, R.C., Jr. (2006). ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *Journal Clinical of Oncology* 24, 5313-5327.
- Loft, S., and Poulsen, H.E. (1996). Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *Journal of Molecular Medicine* 74, 297-312.

- Lopez-Abente, G., Pollan, M., Aragones, N., Perez Gomez, B., Hernandez Barrera, V., Lope, V., and Suarez, B. (2004). [State of cancer in Spain: incidence]. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 27, 165-173.
- Loschen, G., Flohe, L., and Chance, B. (1971). Respiratory chain linked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Letters* 18, 261-264.
- Lou, H., and Kaplowitz, N. (2007). Glutathione depletion down-regulates tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activity via IkappaB kinase-dependent and -independent mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 29470-29481.
- Lowenstein, C.J., Dinerman, J.L., and Snyder, S.H. (1994). Nitric oxide: a physiologic messenger. *Annals of Internal Medicine* 120, 227-237.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Macdonald, J.S. (1999). Carcinoembryonic antigen screening: pros and cons. *Seminars in Oncology* 26, 556-560.
- Machlin, L.J., and Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB Journal* 1, 441-445.
- Mansego, M.L., Blesa, S., Gonzalez-Albert, V., Tormos, M.C., Saez, G., Redon, J., and Chaves, F.J. (2007). Discordant response of glutathione and thioredoxin systems in human hypertension? *Antioxidants and Redox Signaling* 9, 507-514.
- Mantovani, G., Madeddu, C., Gramignano, G., Lusso, M.R., Mocci, M., Massa, E., Ferreli, L., Astara, G., Maccio, A., and Serpe, R. (2003). Subcutaneous interleukin-2 in combination with medroxyprogesterone acetate and antioxidants in advanced cancer responders to previous chemotherapy: phase II study evaluating clinical, quality of life, and laboratory parameters. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology* 3, 205-219.
- Mao, H., Schnetz-Boutaud, N.C., Weisenseel, J.P., Marnett, L.J., and Stone, M.P. (1999). Duplex DNA catalyzes the chemical rearrangement of a malondialdehyde deoxyguanosine adduct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6615-6620.
- Marnett, L.J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research* 424, 83-95.
- Marnett, L.J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21, 361-370.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., and Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 16, 577-586.

- Masuda, H., Tanaka, T., and Takahama, U. (1994). Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 203, 1175-1180.
- Masuda, H., Tanaka, T., Tateishi, M., Naito, M., and Tamai, H. (2001). Detection and cytotoxicity of cisplatin-induced superoxide anion in monolayer cultures of a human ovarian cancer cell line. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 47, 155-160.
- Matsuzawa, A., and Ichijo, H. (2005). Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxidants and Redox Signaling* 7, 472-481.
- McCord, J.M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry* 244, 6049-6055.
- Meister, A. (1983). Transport and metabolism of glutathione and gamma-glutamyl amino acids. *Biochemical Society Transactions* 11, 793-794.
- Meister, A., and Anderson, M.E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry* 52, 711-760.
- Mendelsohn, J., and Baselga, J. (2000). The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19, 6550-6565.
- Mendelsohn, J., and Baselga, J. (2006). Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Seminars in Oncology* 33, 369-385.
- Meyer, T.E., Liang, H.Q., Buckley, A.R., Buckley, D.J., Gout, P.W., Green, E.H., and Bode, A.M. (1998). Changes in glutathione redox cycling and oxidative stress response in the malignant progression of NB2 lymphoma cells. *International Journal of Cancer* 77, 55-63.
- Meynard, D., Le Morvan, V., Bonnet, J., and Robert, J. (2007). Functional analysis of the gene expression profiles of colorectal cancer cell lines in relation to oxaliplatin and cisplatin cytotoxicity. *Oncology Reports* 17, 1213-1221.
- Miller, D.M., Buettner, G.R., and Aust, S.D. (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology and Medicine* 8, 95-108.
- Miller, N.J., and Rice-Evans, C.A. (1997). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS.+ radical cation assay. *Free Radical Research* 26, 195-199.
- Miyajima, A., Nakashima, J., Yoshioka, K., Tachibana, M., Tazaki, H., and Murai, M. (1997). Role of reactive oxygen species in cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells. *British Journal of Cancer* 76, 206-210.
- Mocellin, S. (2009). Nitric oxide: cancer target or anticancer agent? *Current Cancer Drug Targets* 9, 214-236.

- Molavi, B., and Mehta, J.L. (2004). Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations. *Current Opinion in Cardiology* 19, 488-493.
- Monboisse, J.C., Gardes-Albert, M., Randoux, A., Borel, J.P., and Ferradini, C. (1988). Collagen degradation by superoxide anion in pulse and gamma radiolysis. *Biochimica et Biophysica Acta* 965, 29-35.
- Moncada, S., and Palmer, R.M. (1991). Biosynthesis and actions of nitric oxide. *Seminars in Perinatology* 15, 16-19.
- Morabito, F., Cristani, M., Saija, A., Stelitano, C., Callea, V., Tomaino, A., Minciullo, P.L., and Gangemi, S. (2004). Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma. *Mediators of Inflammation* 13, 381-383.
- Moshage, H., Kok, B., Huizenga, J.R., and Jansen, P.L. (1995). Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clinical Chemistry* 41, 892-896.
- Multhoff, G., Meier, T., Botzler, C., Wiesnet, M., Allenbacher, A., Wilmanns, W., and Issels, R.D. (1995). Differential effects of ifosfamide on the capacity of cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells to lyse their target cells correlate with intracellular glutathione levels. *Blood* 85, 2124-2131.
- Muller, D.P. (1990). Antioxidant therapy in neurological disorders. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 264, 475-484.
- Nakamura, H., De Rosa, S., Roederer, M., Anderson, M.T., Dubs, J.G., Yodoi, J., Holmgren, A., Herzenberg, L.A., and Herzenberg, L.A. (1996). Elevation of plasma thioredoxin levels in HIV-infected individuals. *International Immunology* 8, 603-611.
- Nakamura, H., Nakamura, K., and Yodoi, J. (1997). Redox regulation of cellular activation. *Annual Review of Immunology* 15, 351-369.
- Nelson, R.L. (1995). Postoperative evaluation of patients with colorectal cancer. *Seminars in Oncology* 22, 488-493.
- Netto, L.E., and Stadtman, E.R. (1996). The iron-catalyzed oxidation of dithiothreitol is a biphasic process: hydrogen peroxide is involved in the initiation of a free radical chain of reactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 333, 233-242.
- Nguyen, V., Bonds, D.V., and Prokai, L. (2008). Measurement of Hydroxyl-Radical Formation in the Rat Striatum by In Vivo Microdialysis and GC-MS. *Chromatographia* 68, s57-s62.
- Nishikawa, M. (2008). Reactive oxygen species in tumor metastasis. *Cancer Letters* 266, 53-59.
- Nishikimi, M. (1975). Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 63, 463-468.

- Noda, N., Ochiai, A., Miyazaki, K., Sugimura, T., Terada, M., and Wakasugi, H. (2000). Detection of thioredoxin in gastric cancer: association with histological type. *Antioxidants and Redox Signaling* 2, 519-528.
- North, S., Moenner, M., and Bikfalvi, A. (2005). Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors. *Cancer Letters* 218, 1-14.
- Nourooz-Zadeh, J., Tajaddini-Sarmadi, J., and Wolff, S.P. (1994). Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Analytical Biochemistry* 220, 403-409.
- Oberley, L.W. (1988). Free radicals and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine* 5, 113-124.
- Ochoa, S. (1983). Regulation of protein synthesis initiation in eucaryotes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 223, 325-349.
- Oren, M. (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death and Differentiation* 10, 431-442.
- Packer, J.E., Slater, T.F., and Willson, R.L. (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 278, 737-738.
- Packer, L. (1994). Antioxidant properties of lipoic acid and its therapeutic effects in prevention of diabetes complications and cataracts. *Annals of the New York Academy of Sciences* 738, 257-264.
- Palmqvist, R., Engaras, B., Lindmark, G., Hallmans, G., Tavelin, B., Nilsson, O., Hammarstrom, S., and Hafstrom, L. (2003). Prediagnostic levels of carcinoembryonic antigen and CA 242 in colorectal cancer: a matched case-control study. *Diseases of the Colon and Rectum* 46, 1538-1544.
- Park, Y.J., Park, K.J., Park, J.G., Lee, K.U., Choe, K.J., and Kim, J.P. (1999a). Prognostic factors in 2230 Korean colorectal cancer patients: analysis of consecutively operated cases. *World Journal of Surgery* 23, 721-726.
- Park, Y.J., Youk, E.G., Choi, H.S., Han, S.U., Park, K.J., Lee, K.U., Choe, K.J., and Park, J.G. (1999b). Experience of 1446 rectal cancer patients in Korea and analysis of prognostic factors. *International Journal of Colorectal Disease* 14, 101-106.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., and Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 333, 19-39.
- Pelicano, H., Carney, D., and Huang, P. (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Update* 7, 97-110.
- Pentheroudakis, G., and Twelves, C. (2002a). Capecitabine (Xeloda): from the laboratory to the patient's home. *Clinical Colorectal Cancer* 2, 16-23.

- Pentheroudakis, G., and Twelves, C. (2002b). The rational development of capecitabine from the laboratory to the clinic. *Anticancer Research* 22, 3589-3596.
- Pietra, N., Sarli, L., Costi, R., Ouchemi, C., Grattarola, M., and Peracchia, A. (1998). Role of follow-up in management of local recurrences of colorectal cancer: a prospective, randomized study. *Diseases of the Colon and Rectum* 41, 1127-1133.
- Pisani, P., Bray, F., and Parkin, D.M. (2002). Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *International Journal of Cancer* 97, 72-81.
- Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F., and Chiarpotto, E. (2004). Oxidative stress and cell signalling. *Current Medicinal Chemistry* 11, 1163-1182.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-305.
- Potter, J.D. (1999). Colorectal cancer: molecules and populations. *Journal of the National Cancer Institute* 91, 916-932.
- Pourahmad, J., and O'Brien, P.J. (2001). Biological reactive intermediates that mediate chromium (VI) toxicity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 500, 203-207.
- Powis, G., and Kirkpatrick, D.L. (2007). Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology* 7, 392-397.
- Powis, G., and Montfort, W.R. (2001). Properties and biological activities of thioredoxins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 30, 421-455.
- Pryor, W.A. (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radical Biology and Medicine* 28, 141-164.
- Radisky, D.C., Levy, D.D., Littlepage, L.E., Liu, H., Nelson, C.M., Fata, J.E., Leake, D., Godden, E.L., Albertson, D.G., Nieto, M.A., *et al.* (2005). Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 436, 123-127.
- Rainis, T., Maor, I., Lanir, A., Shnizer, S., and Lavy, A. (2007). Enhanced oxidative stress and leucocyte activation in neoplastic tissues of the colon. *Digestive Diseases and Sciences* 52, 526-530.
- Raymond, E., Faivre, S., Woynarowski, J.M., and Chaney, S.G. (1998). Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Seminars in Oncology* 25, 4-12.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231-1237.
- Renzing, J., Hansen, S., and Lane, D.P. (1996). Oxidative stress is involved in the UV activation of p53. *Journal of Cell Science* 109 ( Pt 5), 1105-1112.

Rhee, S.G., Chae, H.Z., and Kim, K. (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine* 38, 1543-1552.

Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry* 8, 797-807.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* 20, 933-956.

Richter, C., Park, J.W., and Ames, B.N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 6465-6467.

Rigas, B., and Sun, Y. (2008). Induction of oxidative stress as a mechanism of action of chemopreventive agents against cancer. *British Journal of Cancer* 98, 1157-1160.

Rivero, D., Perez-Magarino, S., Gonzalez-Sanjose, M.L., Valls-Belles, V., Codoner, P., and Muniz, P. (2005). Inhibition of induced DNA oxidative damage by beers: correlation with the content of polyphenols and melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 3637-3642.

Roos, W.P., and Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in Molecular Medicine* 12, 440-450.

Rustgi, A.K. (1994). Hereditary gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes. *The New England Journal of Medicine* 331, 1694-1702.

Saitoh, D., Okada, Y., Ookawara, T., Yamashita, H., Takahara, T., Ishihara, S., Ohno, H., and Mimura, K. (1994). Prevention of ongoing lipid peroxidation by wound excision and superoxide dismutase treatment in the burned rat. *The American Journal of Emergency Medicine* 12, 142-146.

Saltz, L.B., Cox, J.V., Blanke, C., Rosen, L.S., Fehrenbacher, L., Moore, M.J., Maroun, J.A., Ackland, S.P., Locker, P.K., Pirodda, N., *et al.* (2000). Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *The New England Journal of Medicine* 343, 905-914.

Sanchez, M., Torres, J.V., Tormos, C., Iradi, A., Muniz, P., Espinosa, O., Salvador, A., Rodriguez-Delgado, J., Fandos, M., and Saez, G.T. (2006). Impairment of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and 8-oxo-2'-deoxyguanosine in advanced epithelial ovarian carcinoma of a Spanish community. *Cancer Letters* 233, 28-35.

Sant, M., Aareleid, T., Berrino, F., Bielska Lasota, M., Carli, P.M., Faivre, J., Grosclaude, P., Hedelin, G., Matsuda, T., Moller, H., *et al.* (2003). EUROCORE-3: survival of cancer patients diagnosed 1990-94--results and commentary. *Annals of Oncology* 14 Suppl 5, v61-118.

Santos, F.W., Zeni, G., Rocha, J.B., Weis, S.N., Fachinetto, J.M., Favero, A.M., and Nogueira, C.W. (2005). Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chemico-Biological Interactions* 151, 159-165.

Sasada, T., Nakamura, H., Ueda, S., Sato, N., Kitaoka, Y., Gon, Y., Takabayashi, A., Spyrou, G., Holmgren, A., and Yodoi, J. (1999). Possible involvement of thioredoxin reductase as well as thioredoxin in cellular sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Free Radical Biology and Medicine* 27, 504-514.

Schafer, F.Q., and Buettner, G.R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine* 30, 1191-1212.

Schafer, G., Cramer, T., Suske, G., Kemmner, W., Wiedenmann, B., and Hocker, M. (2003). Oxidative stress regulates vascular endothelial growth factor-A gene transcription through Sp1- and Sp3-dependent activation of two proximal GC-rich promoter elements. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 8190-8198.

Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, J.P., Williams, R.J., Cadenas, E., and Rice-Evans, C. (2002). MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiology of Aging* 23, 861-880.

Sen, C.K. (1998). Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochemical Pharmacology* 55, 1747-1758.

Sevanian, A., Davies, K.J., and Hochstein, P. (1985). Conservation of vitamin C by uric acid in blood. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine* 1, 117-124.

Sharma, S., and Saltz, L.B. (2000). Oral chemotherapeutic agents for colorectal cancer. *The Oncologist* 5, 99-107.

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., and Dowd, C.A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *The Biochemical Journal* 360, 1-16.

Shishodia, S., and Aggarwal, B.B. (2002). Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35, 28-40.

Shokolenko, I.N., Alexeyev, M.F., Robertson, F.M., LeDoux, S.P., and Wilson, G.L. (2003). The expression of Exonuclease III from *E. coli* in mitochondria of breast cancer cells diminishes mitochondrial DNA repair capacity and cell survival after oxidative stress. *DNA Repair* 2, 471-482.

Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine* 91, 31S-38S.

Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry* 215, 213-219.

- Sies, H., Stahl, W., and Sevanian, A. (2005). Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *The Journal of Nutrition* 135, 969-972.
- Simeonova, P.P., and Luster, M.I. (2002). Arsenic carcinogenicity: relevance of c-Src activation. *Molecular and Cellular Biochemistry* 234-235, 277-282.
- Singleton, V.L., and Esau, P. (1969). Phenolic substances in grapes and wine, and their significance. *Advances in Food Research* 1, 1-261.
- Sobrero, A., Guglielmi, A., Grossi, F., Puglisi, F., and Aschele, C. (2000). Mechanism of action of fluoropyrimidines: relevance to the new developments in colorectal cancer chemotherapy. *Seminars in Oncology* 27, 72-77.
- Soderberg, A., Sahaf, B., and Rosen, A. (2000). Thioredoxin reductase, a redox-active selenoprotein, is secreted by normal and neoplastic cells: presence in human plasma. *Cancer Research* 60, 2281-2289.
- Sorbye, H., and Dahl, O. (2003). Carcinoembryonic antigen surge in metastatic colorectal cancer patients responding to oxaliplatin combination chemotherapy: implications for tumor marker monitoring and guidelines. *Journal of Clinical Oncology* 21, 4466-4467.
- Sorbye, H., and Dahl, O. (2004). Transient CEA increase at start of oxaliplatin combination therapy for metastatic colorectal cancer. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 43, 495-498.
- Stadtman, E.R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science (New York, NY)* 257, 1220-1224.
- Stadtman, E.R. (2004). Role of oxidant species in aging. *Current Medicinal Chemistry* 11, 1105-1112.
- Starke, D.W., Chen, Y., Bapna, C.P., Lesnefsky, E.J., and Mieryl, J.J. (1997). Sensitivity of protein sulfhydryl repair enzymes to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 23, 373-384.
- Stayner, L.T., Dankovic, D.A., and Lemen, R.A. (1996). Occupational exposure to chrysotile asbestos and cancer risk: a review of the amphibole hypothesis. *American Journal of Public Health* 86, 179-186.
- Steinberg, W. (1990). The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *The American Journal of Gastroenterology* 85, 350-355.
- Stone, W.L., and Papas, A.M. (1997). Tocopherols and the etiology of colon cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 89, 1006-1014.
- Storz, P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Frontiers Bioscience* 10, 1881-1896.

Stralin, P., Karlsson, K., Johansson, B.O., and Marklund, S.L. (1995). The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15, 2032-2036.

Sun, Y., and Rigas, B. (2008). The thioredoxin system mediates redox-induced cell death in human colon cancer cells: implications for the mechanism of action of anticancer agents. *Cancer Research* 68, 8269-8277.

Swaminathan, S., and Shah, S.V. (2008). Novel approaches targeted toward oxidative stress for the treatment of chronic kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 17, 143-148.

Szatrowski, T.P., and Nathan, C.F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Research* 51, 794-798.

Takebe, G., Yarimizu, J., Saito, Y., Hayashi, T., Nakamura, H., Yodoi, J., Nagasawa, S., and Takahashi, K. (2002). A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 41254-41258.

Tavani, A., La Vecchia, C., Gallus, S., Lagiou, P., Trichopoulos, D., Levi, F., and Negri, E. (2000). Red meat intake and cancer risk: a study in Italy. *International Journal of Cancer* 86, 425-428.

Tempero, M.A., Uchida, E., Takasaki, H., Burnett, D.A., Steplewski, Z., and Pour, P.M. (1987). Relationship of carbohydrate antigen 19-9 and Lewis antigens in pancreatic cancer. *Cancer Research* 47, 5501-5503.

Thannickal, V.J., and Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology* 279, L1005-1028.

Tonissen, K.F., and Di Trapani, G. (2009). Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. *Molecular Nutrition and Food Research* 53, 87-103.

Topinka, J., Binkova, B., Sram, R.J., and Erin, A.N. (1989). The influence of alpha-tocopherol and pyritinol on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in human lymphocytes. *Mutation Research* 225, 131-136.

Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M.A., Nilsa, R.D., and Huang, P. (2008). Redox regulation of cell survival. *Antioxidants and Redox Signaling* 10, 1343-1374.

Trueba, G.P., Sanchez, G.M., and Giuliani, A. (2004). Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in cancer. *Frontiers Bioscience* 9, 2029-2044.

Tsuzuki, T., Nakatsu, Y., and Nakabeppu, Y. (2007). Significance of error-avoiding mechanisms for oxidative DNA damage in carcinogenesis. *Cancer Science* 98, 465-470.

Twelves, C., Boyer, M., Findlay, M., Cassidy, J., Weitzel, C., Barker, C., Osterwalder, B., Jamieson, C., and Hieke, K. (2001). Capecitabine (Xeloda) improves medical

resource use compared with 5-fluorouracil plus leucovorin in a phase III trial conducted in patients with advanced colorectal carcinoma. *European Journal of Cancer* 37, 597-604.

Uchida, K. (2003). 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in Lipid Research* 42, 318-343.

Urig, S., and Becker, K. (2006). On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology* 16, 452-465.

Vachtenheim, J. (1997). Occurrence of ras mutations in human lung cancer. Minireview. *Neoplasma* 44, 145-149.

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., and Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry* 266, 37-56.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39, 44-84.

Valko, M., Morris, H., Mazur, M., Rapta, P., and Bilton, R.F. (2001). Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer? *Biochimica et Biophysica Acta* 1527, 161-166.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160, 1-40.

van Duijnhoven, F.J., Bueno-De-Mesquita, H.B., Ferrari, P., Jenab, M., Boshuizen, H.C., Ros, M.M., Casagrande, C., Tjonneland, A., Olsen, A., Overvad, K., *et al.* (2009). Fruit, vegetables, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 89, 1441-1452.

van Poppel, G., and Goldbohm, R.A. (1995). Epidemiologic evidence for beta-carotene and cancer prevention. *The American Journal of Clinical Nutrition* 62, 1393S-1402S.

Veronese, M.L., and O'Dwyer, P.J. (2004). Monoclonal antibodies in the treatment of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 40, 1292-1301.

Vina, J., Romero, F.J., Estrela, J.M., and Vina, J.R. (1980). Effect of acetaminophen (paracetamol) and its antagonists on glutathione (GSH) content in rat liver. *Biochemical Pharmacology* 29, 1968-1970.

Vines, J.J., Ardanaz, E., Arrazola, A., and Gaminde, I. (2003). [Population-based epidemiology of colorectal cancer: causality review]. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 26, 79-97.

- Visconti, R., and Grieco, D. (2009). New insights on oxidative stress in cancer. *Current Opinion in Drug Discovery and Development* 12, 240-245.
- Waalkes, M.P., Liu, J., Ward, J.M., and Diwan, B.A. (2004). Mechanisms underlying arsenic carcinogenesis: hypersensitivity of mice exposed to inorganic arsenic during gestation. *Toxicology* 198, 31-38.
- Wang, J., Liu, Y.X., Hande, M.P., Wong, A.C., Jin, Y.J., and Yin, Y. (2007). TAp73 is a downstream target of p53 in controlling the cellular defense against stress. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 29152-29162.
- Wang, J., and Yi, J. (2008). Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biology and Therapy* 7, 1875-1884.
- Weber, J., and McCormack, P.L. (2008). Panitumumab: in metastatic colorectal cancer with wild-type KRAS. *BioDrugs* 22, 403-411.
- Wei, W., Liu, Q., Tan, Y., Liu, L., Li, X., and Cai, L. (2009). Oxidative stress, diabetes, and diabetic complications. *Hemoglobin* 33, 370-377.
- Weitzman, S.A., and Gordon, L.I. (1990). Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 76, 655-663.
- Welsh, S.J., Bellamy, W.T., Briehl, M.M., and Powis, G. (2002). The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Research* 62, 5089-5095.
- Wells, P.G., McCallum, G.P., Chen, C.S., Henderson, J.T., Lee, C.J., Perstin, J., Preston, T.J., Wiley, M.J., and Wong, A.W. (2009). Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicology Science* 108, 4-18.
- Witte, A.B., Anestal, K., Jerremalm, E., Ehrsson, H., and Arner, E.S. (2005). Inhibition of thioredoxin reductase but not of glutathione reductase by the major classes of alkylating and platinum-containing anticancer compounds. *Free Radical Biology and Medicine* 39, 696-703.
- Wlodek, P.J., Smolenski, O.B., Chwatko, G., Iciek, M.B., Milkowski, A., Bald, E., and Wlodek, L. (2006). Disruption of thiol homeostasis in plasma of terminal renal failure patients. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 366, 137-145.
- Wolff, S.P. (1993). Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *British Medical Bulletin* 49, 642-652.
- Wolpin, B.M., and Mayer, R.J. (2008). Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology* 134, 1296-1310.

Wu, W.S. (2006). The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Reviews* 25, 695-705.

Yokomizo, A., Ono, M., Nanri, H., Makino, Y., Ohga, T., Wada, M., Okamoto, T., Yodoi, J., Kuwano, M., and Kohno, K. (1995). Cellular levels of thioredoxin associated with drug sensitivity to cisplatin, mitomycin C, doxorubicin, and etoposide. *Cancer Research* 55, 4293-4296.

Young, A.J., and Lowe, G.M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385, 20-27.

Zastrow, L., Groth, N., Klein, F., Kockott, D., Lademann, J., and Ferrero, L. (2009). [UV, visible and infrared light. Which wavelengths produce oxidative stress in human skin?]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und Verwandte Gebiete* 60, 310-317.

Zhong, L., Arner, E.S., and Holmgren, A. (2000). Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5854-5859.

Zhong, L., and Holmgren, A. (2000). Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 18121-18128.

(1992). Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate. *Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. Journal of Clinical of Oncology* 10, 896-903.

(1996). Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on May 17, 1996 by the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical of Oncology* 14, 2843-2877.

(1998). Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. *Meta-analysis Group In Cancer. Journal of Clinical of Oncology* 16, 301-308.

## ***ABREVIATURAS***



## ABREVIATURAS

ABTS: sal diamonio 2,2'azinobis-(6-ácido sulfónico 3-etilbenzotiazolina)

ASCO: Sociedad Americana de Oncología Clínica

CAT: Catalasa

CCR: Cáncer colorrectal

CEA: Antígeno carcinoembrionario

CG: Cáncer gástrico

DACH: 1,2-diaminociclohexano

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EMT: Transición epitelial-mesenquimal

EO: Estrés oxidativo

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

ERNs: Especies reactivas del nitrógeno

EROs: Especies reactivas del oxígeno

ERONs: Especies reactivas del oxígeno o nitrógeno

5-FU: 5- fluorouracilo

GC: Grupos carbonilo

GGT: Gamma-glutamyl transpeptidasa

GPx: Glutation peroxidada

GR: Glutation reductasa

GSH: Glutation reducido

GSSG: Glutation disulfuro u oxidado

GST: Glutation-S-transferasa

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno

HO<sub>2</sub>·: Radical hidroperóxido

HNE: 4-Hidroxi-2-nonenal

HTA: Hipertensión arterial

L: Linfoma

NO·: Oxido nítrico

NOO·: Peroxinitrito

MDA: Malondialdehido

MMP: Metaloproteasas de matriz

$O_2^{\cdot-}$ : Anión superóxido

$^1O_2$ : Oxígeno singlete

$\cdot OH$ : Radical hidroxilo

8-OH-dG: 8-hidroxi-desoxiguanina

PS-ECOG: Performance status (calidad de vida del paciente) según criterios de Eastern Cooperative Oncologic Group

PTKs: Protein quinasas

RNS: Especies de nitrógeno reactivas

ROO $\cdot$ : Radical peroxilo

ROS: Especies oxigénicas reactivas

SOD: Superóxido dismutasa

TROLOX: Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

Trx: Tiorredoxina

TrxR: Tiorredoxina reductasa

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular