



TESIS DOCTORAL

**REGULACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR
OLEUROPEÍNA EN CÉLULAS HUMANAS DE
OSTEOSARCOMA: PAPEL DE LA VÍA
APOPTÓTICA BAX/BCL-2.**

OLGA LEAL HERNÁNDEZ

**PROGRAMA DE DOCTORADO:
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA APLICADA (R009)**

2020



TESIS DOCTORAL

**REGULACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR
OLEUROPEÍNA EN CÉLULAS HUMANAS DE
OSTEOSARCOMA: PAPEL DE LA VÍA
APOPTÓTICA BAX/BCL-2.**

OLGA LEAL HERNÁNDEZ

**PROGRAMA DE DOCTORADO:
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA APLICADA (R009)**

2020

Conformidad del director:

Dr. D. José María Morán García



DEPARTAMENTO DE ENFERMERÍA

Facultad de Enfermería y Terapia Ocupacional

Avd. Universidad s/n

10003-CACERES

ESPAÑA-SPAIN

José María Morán García, Profesor Titular de Universidad adscrito al Departamento de Enfermería de la Facultad de Enfermería y Terapia Ocupacional de la Universidad de Extremadura,

CERTIFICA:

Que la presente tesis doctoral, titulada **“REGULACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR OLEUROPEÍNA EN CÉLULAS HUMANAS DE OSTEOSARCOMA: PAPEL DE LA VÍA APOPTÓTICA BAX/BCL-2”** de la que es autora Olga Leal Hernández, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Enfermería de la Universidad de Extremadura.

Que, revisada la memoria presentada, el Director del trabajo considera que posee las condiciones requeridas para ser defendida como un trabajo de Tesis Doctoral mediante Compendio de Publicaciones. Por todo ello,

AUTORIZA:

Su presentación y defensa pública al tribunal designado al efecto de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 99/2011 de 28 de enero.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expide el presente certificado en Cáceres a 04 de febrero de 2020.

Fdo. José María Morán García.

TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

El presente trabajo de tesis doctoral se presenta como compendio de publicaciones, de acuerdo con el artículo 46 de la Resolución de 18 de febrero de 2014, del Gerente, por la que se ejecuta el acuerdo adoptado por el Consejo de Gobierno por el que se aprueba la modificación de la normativa de los estudios de Doctorado, en el que se aprueba la normativa de Desarrollo del Régimen relativo a la elaboración, tribunal, defensa y evaluación de la Tesis Doctoral del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero (BOE de 10 de febrero). Dichas publicaciones recogen todos los resultados que han sido obtenidos en los diferentes trabajos de investigación desarrollados con el fin de alcanzar el objetivo fijado para la realización de la tesis.

A continuación se detallan los artículos que integran la tesis (Capítulo VII):

Morán JM, **Leal-Hernández O**, Canal-Macías ML, Roncero-Martín R, Guerrero-Bonmatty R, Aliaga I, Zamorano JD. Antiproliferative Properties of Oleuropein in Human Osteosarcoma Cells. Nat Prod Commun. 2016 Apr;11(4):491-2.

José M. Morán, **Olga Leal-Hernández**, Raúl Roncero-Martín, Juan D. Pedrera-Zamorano. Antitumor Perspectives of Oleuropein. J Food Sci. 2019. 84(3):384.

Olga Leal-Hernández, Raúl Roncero-Martín, Ignacio Aliaga, María Pedrera-Canal, José M. Morán, Sergio Rico, Luis M. Puerto Parejo, Jesús M. Lavado-García. P-53-independent apoptosis of human osteosarcoma cells after exposure to oleuropein. Lat Am J Pharm. In press.

Adicionalmente también se han presentado las siguientes comunicaciones a congresos nacionales e internacionales (Capítulo IX).

Leal-Hernández O, Morán JM, Roncero-Martín R, Pedrera-Canal M, Guerrero-Bonmatty R, Lavado-García JM, Pedrera-Zamorano JD. Propiedades antiproliferativas de la oleuropeína en células humanas de osteosarcoma. IV Jornadas doctorales del G-9. Pamplona 2016.

José M Morán, **Olga Leal-Hernández**, María L Canal-Macías, Jesús M Lavado-García, Raúl Roncero-Martín, Ignacio Aliaga & Juan D Pedrera-Zamorano. Antiproliferative properties of oleuropein in human osteosarcoma cells. 43rd Annual European Calcified Tissue Society Congress. Rome, Italy. 14 - 17 May 2016. Bone Abstracts 2016 (5) P109: 85-86. DOI: 10.1530/boneabs.5.P109.

AGRADECIMIENTOS

Parece que el día nunca va a llegar, pero llega. El camino ha sido largo, con altibajos y lleno de aprendizaje. Una gran etapa termina hoy.

Por todo ello quiero agradecer:

A mi director de tesis, el Dr. José María Morán García, por verme capaz de esto y confiar en mí más de lo que yo misma lo hacía. Por mostrarme la puerta de la investigación e invitarme a entrar de tu mano, guiándome siempre y aconsejándome desde la experiencia. Gracias por apostar por mí.

A GIEMO, mi grupo de investigación, a todos y cada uno de vosotros, por acogerme con los brazos abiertos, por mostraros siempre disponibles para todo lo que necesitara y por vuestros ánimos y ayuda incondicional.

A mis compañeros del Departamento de Enfermería, que me han visto crecer profesionalmente en los diferentes sitios por los que he pasado, por ser una parte importante de este camino.

A mis amigos, que han vivido conmigo este proceso, por darme su apoyo cuando más lo necesitaba.

A mis padres, el motor de mi vida, por darme alas para volar tan alto como quiera, pero sin perder los pies del suelo.

A mi hermano, por ser un referente al que seguir, por transmitirme tu orgullo con todo lo que consigo.

A mi familia, por estar siempre.

Gracias, de corazón, a todos.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	9
TABLAS Y FIGURAS	11
RESUMEN	13
ABSTRACT.....	14
Capítulo I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	15
I. 1. Antioxidantes, salud ósea y cáncer.....	17
I. 2. Dieta Mediterránea y cáncer.....	18
I. 3. Dieta mediterránea y salud ósea.	21
I. 4. Aceite de oliva (Oleuropeína).	22
I. 5. Aceite de oliva (Oleuropeína) y cáncer.	25
I. 6. Otros Antioxidantes y cáncer (Curcumina).	28
I. 7. Aceite de oliva (Oleuropeína) y salud ósea.	30
I. 8. Apoptosis mediada por Bax/Bcl-2.....	31
I. 9. El gen p-53.	33
Capítulo II. OBJETIVOS.....	35
Capítulo III. MATERIAL Y MÉTODOS	39
III. 1. Cultivos celulares.....	41
III. 2. Viabilidad celular mediante estudios de MTT.	42
III. 3. Expresión génica mediante ensayos de PCR en tiempo real.	43
III. 4. Actividad caspasa-3.....	44
Capítulo IV. PROPIEDADES ANTIPROLIFERATIVAS DE LA OLEUROPEÍNA EN CÉLULAS HUMANAS DE OSTEOSARCOMA	47
IV. 1. Introducción.....	49
IV. 2. Objetivo.	49
IV. 3. Método.	50
IV. 4. Resultados.	51
IV. 5. Referencias.	55

Capítulo V. PERSPECTIVAS ANTITUMORALES DE LA OLEUROPEÍNA ...	59
V. 1. Resultados	61
V. 2. Referencias	62
Capítulo VI. APOPTOSIS INDEPENDIENTE DE P-53 EN CÉLULAS HUMANAS DE OSTEOSARCOMA TRAS LA EXPOSICIÓN A OLEUROPEÍNA	65
VI. 1. Introducción.....	67
VI. 2. Objetivo.	68
VI. 3. Método.	68
VI. 4. Resultados.	70
VI. 5. Referencias.	74
Capítulo VII. RESULTADOS	75
VII. 1. Publicación N° 1.	77
“Antiproliferative Properties of Oleuropein in Human Osteosarcoma Cells”	77
VII. 1. 1. Presentación de la publicación.	77
VII. 1. 2. Informe.....	78
VII. 1. 3. Resumen en castellano.	80
VII. 1. 4. Copia de la publicación.....	81
VII. 2. Publicación N° 2.	83
“Antitumor Perspectives of Oleuropein”	83
VII. 2. 1. Presentación de la publicación.	83
VII. 2. 2. Informe.....	84
VII. 2. 3. Resumen en castellano.	86
VII. 2. 4. Copia de la publicación.....	87
VII. 3. Publicación N° 3.	89
“P-53-independent apoptosis of human osteosarcoma cells after exposure to oleuropein”	89
VII. 3. 1. Presentación de la publicación.	89
VII. 3. 2. Informe.....	90
VII. 3. 3. Resumen en castellano.	92
VII. 3. 4. Copia de la publicación (In press).....	93

Capítulo VIII. DISCUSIÓN INTEGRADORA	95
VIII. 1. Discusión sobre la citotoxicidad de la oleuropeína en cultivos celulares de osteosarcoma.	97
VIII. 2. Discusión sobre los mecanismos de apoptosis.	99
VIII. 4. Fortalezas.....	101
VIII. 5. Limitaciones.	102
Capítulo IX. OTRAS CONTRIBUCIONES DERIVADAS DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL	103
IX. 1. Póster: IV Jornadas doctorales del G-9. Pamplona 2016.....	105
IX. 1. 1. Certificado de la jornada donde fue expuesto.....	105
IX. 1. 2. Póster.	106
IX. 2. Abstract: 43rd Annual European Calcified Tissue Society Congress. Rome, Italy. 14 - 17 May 2016.....	107
IX. 2. 1. Portada de la revista donde fue publicado.....	107
IX. 2. 2. Página donde fue publicado.	108
Capítulo X. CONCLUSIONES.....	111
Capítulo XI. BIBLIOGRAFÍA.....	115

ABREVIATURAS

Ac-DEVD-pNA: acetil-Asp-Glu-Val- Asp p-nitroanilida.

ADN o DNA: ácido desoxirribonucleico.

aMED: alimentación mediterránea.

APNPs: amphiphilic peptide nanoparticles.

ARN o RNA: ácido ribonucleico

Atp6v0d2: d2 isoform of vacuolar (H⁺) ATPase V0 domain.

Bcl-2: B cell Lymphoma.

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario.

CTSK: cathepsin K.

DMSO: dimetilsulfóxido.

EMEM (EBSS): Eagle's Minimum Essential Medium (Earle's balanced salt solution).

FBS: suero fetal bovino.

GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase.

HER2: human epidermal growth factor receptor 2.

IC50: concentración inhibitoria media máxima.

LPS: lipopolisacárido.

MAPKs: mitogen activated protein kinases.

M-CSF: macrophage colony stimulating factor.

MMP-9: matrix metalloproteinase-9.

mRNA: ácido ribonucleico mensajero.

MTT: bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

MUFA: ácidos grasos monoinsaturados.

NEAA: Non-Essential Amino Acids.

NFATc1: nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1.

NF- κ B: nuclear factor- κ B.

NO: nitric oxide.

OC-STAMP: osteoclast stimulatory transmembrane protein.

OS: osteosarcoma.

OSCAR: osteoclast-associated receptor.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PI3K/AKT: vía fosfatidilinositol- 3-kinasa o phosphatidylinositol 3-kinase pathway.

pNA: p-nitroanilina.

PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.

RANKL: receptor activator of nuclear factor- κ B ligand.

ROS: reactive oxygen species.

SD: desviación estándar.

SE: error estándar.

TRAP: tartrate-resistant acid phosphatase.

TABLAS

Tabla 1. Efecto antiproliferativo in vitro de oleuropeína sobre células humanas de osteosarcoma.

FIGURAS

Figura 1. Cultivo de células humanas de osteosarcoma MG-63 en monocapa.

Figura 2. Incubador de células.

Figura 3. Efectos antiproliferativos de oleuropeína en líneas celulares de osteosarcoma. Las gráficas muestran curvas de dosis-respuesta de oleuropeína obtenidas mediante ensayo de MTT después de 24, 48 y 72 h de exposición. Los valores son medias \pm SD.

Figura 4. Ensayo MTT para la viabilidad celular de células MG-63 cultivadas durante 24 y 48 horas en presencia de oleuropeína. Mediciones representativas de tres conjuntos distintos de datos: n.s. no significativo, * ($p < 0.05$). Las barras de error representan la SD.

Figura 5. Actividad de caspasa-3 detectada mediante ensayo colorimétrico. Los datos presentados se calcularon a partir de tres experimentos independientes. Los datos presentados son medias \pm SD, n.s. no significativa frente al control, * $p < 0.05$ frente al control.

Figura 6. Expresiones relativas de los niveles del mRNA de Bax y Bcl-2 en células humanas de osteosarcoma MG-63. (A) Niveles del mRNA de Bax. (B) Niveles del mRNA de Bcl-2. Las expresiones relativas de mRNA se determinaron mediante la cuantificación relativa de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Los niveles de RNA (normalizados a los niveles de RNA de GAPDH) se representaron como un aumento o disminución de la expresión en relación con los niveles del control. Los datos se expresan como medias \pm desviaciones estándar de tres experimentos independientes, n.s. no significativo frente a control, * $p < 0.05$ vs. control.

RESUMEN

La dieta mediterránea es ampliamente consumida y aceptada en nuestra sociedad. La oleuropeína, uno de los principales componentes del aceite de oliva, ha sido objeto de estudio en numerosos trabajos, destacando aquellos que tratan sobre sus propiedades anticancerígenas.

La agresividad de esta patología y el crecimiento descontrolado que produce en las células hace que exista un gran interés biomédico que permita buscar nuevas estrategias para abordar de manera eficiente esta enfermedad.

En la primera parte de este estudio, se evaluó la actividad antiproliferativa de la oleuropeína en dos líneas celulares humanas de osteosarcoma (MG-63 y Saos-2).

El análisis estadístico de IC50 por el método de regresión Probit sugirió que la oleuropeína tuvo efectos tóxicos similares en ambas líneas celulares (rango de IC50 247.4-475.0 μ M en células MG-63 y 359.9-798.7 μ M en células Saos-2).

Posteriormente, se estudió la vía apoptótica Bax/Bcl-2 en las células humanas de osteosarcoma MG-63 carentes de p-53, tras ser expuestas a la oleuropeína. La actividad de caspasa-3 se midió mediante un ensayo colorimétrico.

Además, la expresión del mRNA de Bax, Bcl-2 y p-53 fue determinada por PCR en tiempo real después de 24 horas de exposición. Tanto la relación entre la expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 como la actividad de la caspasa-3 aumentaron en las células expuestas a la oleuropeína en comparación con las del control no expuesto ($P < 0.05$). Como se esperaba, no se detectó ningún mRNA de p-53 en las células MG-63.

Nuestros resultados sugieren que la oleuropeína induce muerte compatible con apoptosis independiente de p-53 en células de osteosarcoma humano MG-63.

Palabras clave: Oleuropeína, osteosarcoma, apoptosis.

ABSTRACT

Mediterranean diet is widely consumed and accepted in our society. Oleuropein, one of the main components of olive oil, has been investigated in numerous studies, especially those dealing with its anti-cancer properties.

The severity of this pathology and the uncontrolled growth it produces in the cells lead to a great biomedical interest in exploring new strategies to efficiently confront this disease.

This study evaluated the antiproliferative activity of oleuropein in two human osteosarcoma cell lines (MG-63 and Saos-2).

IC50 statistical analysis by Probit regression method showed that oleuropein had similar toxic effects on both cell lines (IC50 ranges from 247.4-475.0 μ M for MG-63 cells and from 359.9-798.7 μ M for Saos-2 cells).

Thereafter, the p-53-null MG-63 human osteosarcoma cells were exposed to oleuropein and the Bax/Bcl-2 apoptotic pathway was investigated. Caspase-3 activity was determined by a colorimetric assay.

Furthermore, Bax, Bcl-2 and p-53 mRNA expression was assessed by real-time PCR following 24 hours of exposure. Both the ratio of Bax/Bcl-2 mRNA expression and caspase-3 activity were enhanced in cells exposed to oleuropein when compared to unexposed control cells ($P < 0.05$). Predictably, no p-53 mRNA expression was observed in MG-63 cells.

These results show that oleuropein induces a p-53-independent apoptosis-like mechanism in human MG-63 osteosarcoma cells.

Key words: Oleuropein, osteosarcoma, apoptosis.

Capítulo I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Capítulo I. INTRODUCCIÓN GENERAL.

I. 1. Antioxidantes, salud ósea y cáncer.

El estudio de alimentos y productos derivados de plantas naturales con alto contenido en antioxidantes ha crecido en los últimos años debido a la multitud de propiedades que se le atribuyen.

Dentro de los ámbitos en los que se ha estudiado cómo afectan estos compuestos, caben destacar la salud ósea y el cáncer.

En la revisión realizada por Jing An y colaboradores (An et al., 2016), se muestra de forma detallada los mecanismos sobre los que actúan.

Los compuestos activos de las plantas naturales, que poseen efectos sobre la inhibición de la función y diferenciación de osteoclastos, incluyen flavonoides, terpenoides, glucósidos, lignanos, cumarinas, alcaloides, polifenoles y limonoides entre otros.

Los estudios incluidos en la revisión mencionada, han demostrado que los productos naturales ejercen efectos inhibitorios a través de la regulación de muchos factores que intervienen en el proceso de la osteoclastogénesis y resorción ósea, tales como las citoquinas esenciales (RANKL, M-CSF), factores transcripción (NFATc1, c-Fos), vías de señalización (NF- κ B, MAPKs, señalización de ion calcio), genes específicos de los osteoclastos (TRAP, CTSK, MMP-9, integrin β 3, OSCAR, DC-STAMP, Atp6v0d2) y factores locales (ROS, LPS, NO) entre otros.

El desarrollo de productos naturales tiene gran valor para acelerar el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas moleculares para la prevención o tratamiento de enfermedades erosivas óseas y para la medicina regenerativa del hueso. Así mismo, la inhibición de la resorción ósea excesiva y la regulación del metabolismo óseo, crearía una nueva alternativa para el tratamiento de enfermedades óseas.

También se ha demostrado que el consumo de productos naturales, con alto contenido en polifenoles, aumenta de forma significativa la masa ósea (Shahnazari et al., 2016). En este caso, el estudio in vivo realizado en roedores tras el consumo de ciruela seca, reflejó la disminución de la resorción ósea al afectar directamente a los precursores de osteoclastos y suprimir la actividad inflamatoria, y al mismo tiempo se observó una ganancia de hueso debido al aumento de la formación ósea.

Dentro de los alimentos con alto contenido en antioxidantes, encontramos las frutas y las verduras, destacando su alto contenido en carotenoides y vitamina C. Su consumo está asociado a un efecto protector frente a la aparición de cáncer, concretamente frente al cáncer de pulmón (Shareck et al., 2017).

Los polifenoles, debido a su potencial antioxidante y antiinflamatorio, han sido objeto de estudio para determinar su posible relación con la disminución de riesgo de padecer ciertos cánceres. Sin embargo, es necesario seguir investigando, ya que la variedad de dosis, de compuestos y de mecanismos de acción en las diferentes líneas celulares in vitro y restos de estudios epidemiológicos e in vivo, hacen difícil determinar una respuesta única y homogénea para sacar conclusiones que se puedan generalizar y extrapolar a los tipos de cáncer que existen (Zhou et al., 2016).

I. 2. Dieta Mediterránea y cáncer.

Las descripciones generales utilizadas para la definición de “Dieta Mediterránea”, pese a sus variabilidades, tienen puntos en común. Todas ellas incluyen el alto consumo de aceite de oliva virgen extra, verduras, frutas, cereales, legumbres, frutos secos y una ingesta moderada de pescados y carnes, productos lácteos y vino tinto, como indica el trabajo de Davis y colaboradores (Davis et al., 2015).

La dieta mediterránea es conocida por los beneficios que confieren a la salud sus componentes bioactivos, destacando los compuestos polifenólicos y fitoesteroles (Zamora-Ros et al., 2010).

Estos provienen principalmente del vino tinto, aceite de oliva, té, café, nueces, fruta, verdura y especias (Davis et al., 2015).

El estilo de alimentación mediterránea ha demostrado, con amplia solvencia científica, por asociación o intervención, generar numerosos beneficios en la prevención y tratamiento de diferentes tipos de situaciones de riesgo y/o patologías crónicas. Como sugiere la revisión de Dussaillant y colaboradores, la alimentación de tipo mediterránea es una importante herramienta para ser implementada a nivel de salud pública en el desarrollo de políticas efectivas para disminuir la morbimortalidad prematura (Dussaillant et al., 2016).

Debido a estas propiedades se ha demostrado que la adherencia a la dieta mediterránea está asociada a una disminución de mortalidad por cáncer, así como una menor incidencia de padecer cáncer colorrectal, de mama, de cabeza, gástrico, de próstata y de cuello de útero. Así mismo, cabe mencionar que este efecto beneficioso de la dieta mediterránea no lo confiere uno de sus múltiples componentes de forma aislada, sino el conjunto de todos ellos (Schwingshackl & Hoffmann, 2016).

Parece que existe una relación entre el cáncer y la obesidad, por lo que el efecto antiobesidad que tiene la dieta mediterránea entre sus consumidores, sería una de las explicaciones de la menor prevalencia de esta enfermedad (Kwan et al., 2017).

La aparición del síndrome metabólico es inversamente proporcional al consumo de esta dieta, debido a los mencionados efectos como agente preventivo de la obesidad, pero es su carácter anticancerígeno el más estudiado debido a ser la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares (Di Daniele et al., 2017).

Además de realizar estudios para observar cómo el consumo de esta dieta supone una disminución del riesgo a padecer estas enfermedades, es importante la medición de la adherencia de la población estudiada a los mencionados hábitos dietéticos, para poder así establecer esta relación de forma más clara. Hodge y colaboradores relacionaron en su estudio estos hábitos saludables con un menor riesgo de padecer cáncer de pulmón, especialmente en fumadores (Hodge et al., 2016).

También encontramos otros cánceres, como el de cabeza y cuello, donde se incluirían los localizados en faringe y laringe entre otros. Los resultados, en comparación con el consumo de frutas, verduras y legumbres principalmente, vuelven a mostrar una relación inversa entre la adherencia a la dieta mediterránea y el riesgo de padecer esta enfermedad (Giraldi et al., 2016).

Los resultados del estudio realizado por Turati y colaboradores en 2017 apoyan los de Giraldi y colaboradores, tratando una localización similar del cáncer con resultados idénticos (Turati et al., 2017).

En la bibliografía consultada, no sólo encontramos datos referidos a la prevención, sino a una mejora tras el diagnóstico. Podemos encontrar el ejemplo en dos estudios sobre cáncer colorrectal, en el que se destaca el importante papel de la adherencia terapéutica tanto como un factor de prevención de riesgo de aparición (Rosato et al., 2016) como, en el caso de que la enfermedad ya estuviera diagnosticada, su asociación a una mayor supervivencia a largo plazo (Ratjen et al., 2017).

El cáncer de mama, el más frecuente en mujeres, es uno de los más estudiados, sobre todo en mujeres postmenopáusicas. Uno de los factores de riesgo de este cáncer es una dieta alta en grasas, por lo que existe un gran interés en la dieta mediterránea por ser rica en antioxidantes e inhibir los factores de crecimiento que promueven el crecimiento de estas células malignas (Potentas et al., 2015).

No solo encontramos estudios de adherencia con una asociación inversa a la aparición de esta enfermedad (van den Brandt & Schulpen, 2017), y revisiones que muestren la eficacia de esta dieta en pacientes ya diagnosticadas y sus beneficios (Braakhuis et al., 2016), sino que se recomienda la suplementación con los componentes principales de esta dieta, como el aceite de oliva virgen extra como prevención primaria (Berrino, 2016).

I. 3. Dieta mediterránea y salud ósea.

Recientemente, en 2017, se ha realizado una revisión para actualizar la epidemiología de la osteoporosis, centrándose en las fracturas, por ser la consecuencia clínica más importante de la osteoporosis. Destacan en sus hallazgos los factores dietéticos como importantes factores no farmacológicos que permiten disminuir el riesgo de padecer fracturas y poder, de ese modo, mejorar la salud ósea (Cauley, 2017).

Los estudios basados en patrones alimentarios han crecido en la última década, teniendo en cuenta diferentes aspectos de la dieta. Los resultados muestran que el alto consumo de frutas, legumbres, frutos secos, pescado, aves y productos bajos en grasas y el bajo consumo de productos procesados, dulces, refrescos y cereales refinados, están implicados en la mejora de la salud ósea. Estos resultados obtenidos de una revisión de 2017 muestran que, con el conocimiento actual sobre el tema, la adecuación de la dieta supone una iniciativa de promoción de la salud para mejorar la densidad mineral ósea y mantenerla para así reducir el riesgo de osteoporosis y, consecuentemente, el riesgo de padecer fracturas en el futuro (Movassagh & Vatanparast, 2017).

La población de estudio que podemos encontrar es muy variada, por ejemplo, grupos mixtos de mediana edad o edad avanzada en el que los resultados reafirman la idea de que una mayor adherencia a la dieta mediterránea se asocia de forma favorable a la densidad mineral ósea (G. D. Chen et al., 2016).

Por otro lado, debido al componente genético, hay autores como Calderón-García y colaboradores, que se decantan por grupo de mujeres, observando que el consumo de pescado y vitamina D ayuda a mantener una densidad ósea adecuada en mujeres premenopáusicas, siendo un dato relevante para la prevención de los problemas que pudieran derivar de la osteoporosis (Calderon-Garcia et al., 2012).

Además de la osteoporosis, hemos encontrado relación con otros problemas óseos. Una mayor adherencia a la dieta mediterránea, comprobada mediante cuestionario validado (aMED), está relacionada con una menor

prevalencia de osteoartritis de rodilla. Estos resultados se obtuvieron de las más de 4000 personas que participaron en este estudio con una media de edad de 61.2 años (Veronese et al., 2016).

Otro de los objetivos por los que se ha estudiado el consumo de la mencionada dieta fue para conocer si se le podría atribuir características de prevención de ciertos problemas óseos derivados de una baja densidad mineral ósea. De este modo, los resultados asocian un menor riesgo de fractura de cadera a las personas cuyos hábitos alimentarios son más característicos de la dieta mediterránea (Haring et al., 2016).

Estos resultados coinciden con las conclusiones de Byberg y colaboradores en su población sueca estudiada (Byberg et al., 2016), compuesta tanto por hombres como por mujeres, a diferencia del estudio de Haring y colaboradores (Haring et al., 2016), que estaba compuesto sólo de mujeres norteamericanas. Destaca este primero en sus conclusiones la importancia de que la dieta es un factor modificable que debe tenerse en cuenta como herramienta de prevención, en este caso, para disminuir el riesgo de sufrir una fractura de cadera.

I. 4. Aceite de oliva (Oleuropeína).

Entre los componentes de la dieta mediterránea a los que se les atribuye un beneficio en la salud, encontramos el aceite de oliva virgen extra, resultado del fruto de la *Olea europaea*, más conocido como olivo (Tripoli et al., 2005).

Este aceite tiene una alta concentración de MUFA (ácidos grasos monoinsaturados), como el ácido oleico, a los que se les otorga una reducción de riesgo de padecer arterioesclerosis, frente al consumo perjudicial de PUFA (ácidos grasos poliinsaturados) (Tripoli et al., 2005).

Sus beneficios no son atribuidos solo a la relación entre los ácidos grasos saturados e insaturados, sino a las propiedades antioxidantes de sus compuestos fenólicos. La pulpa de la aceituna contiene estos compuestos hidrófilos, donde encontramos desde algunos simples como el hidroxitirosol

hasta los llamados lignanos y los secoiridoides (Tripoli et al., 2005) (Owen et al., 2000).

En este último grupo encontramos la oleuropeína, el componente más estudiado y el objeto principal del presente trabajo. Es el responsable del peculiar sabor amargo y picante del aceite de oliva virgen extra, pero destaca principalmente por su actividad antioxidante. Se encuentra tanto en las hojas del olivo como en la pulpa de su fruto (Tripoli et al., 2005) (Vogel et al., 2014), siendo el principal componente fenólico del mismo (Romero et al., 2017).

En la citada revisión de Tripoli y colaboradores, las conclusiones destacan una correlación positiva entre el consumo de dieta mediterránea y una baja incidencia de enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer, destacando el papel de los componentes del aceite de oliva (Tripoli et al., 2005).

Estos resultados apoyan conclusiones de revisiones previas (Owen et al., 2000).

Es necesario tener en cuenta que puede existir una diferencia en la concentración de estos compuestos, como evaluaron Negro y colaboradores en su estudio (Negro et al., 2019). En él comparó 8 tipos diferentes de aceites de oliva virgen extra italianos y la concentración de oleuropeína podía variar en 4 veces desde el de menor hasta el de mayor concentración. Esto es debido a la variabilidad del origen, la técnica de producción y, principalmente, del genotipo.

En revisiones posteriores como la de Vogel y colaboradores en 2014 se amplían los beneficios que la oleuropeína aporta a la salud, destacando, aparte de las capacidades antioxidante y cardioprotectora ya mencionadas, sus características antihipertensivas, hipoglucemiante y como reductor del colesterol. Pese a que algunos de los estudios son realizados en animales, son necesarios futuros estudios en los que los resultados en personas confirmen dichas cualidades (Vogel et al., 2014).

La evidencia de estudios in vivo e in vitro también muestra la alta actividad antiinflamatoria y cómo supone un beneficio en genes relacionados con la obesidad y el síndrome metabólico. Este hecho explicaría la baja incidencia de enfermedades inflamatorias crónicas entre la población residente en la región

mediterránea, por consumir aceite de oliva de forma diaria en su dieta (Parkinson & Cicerale, 2016).

Sun y colaboradores destacan esta cualidad antihipertensiva de la oleuropeína como una futura estrategia prometedora para tratar dicha enfermedad, aunque en personas con hipotensión, también se produciría una bajada de la misma (Sun et al., 2017).

Aunque inicialmente, los estudios se centraban en la dieta mediterránea, existen cada vez más publicaciones que destacan si las dietas son ricas o pobres en aceite de oliva, por ser este componente el principal aporte de grasa en este tipo de dieta, tanto in vivo como in vitro (Waterman & Lockwood, 2007).

Es importante destacar que la variedad aceite de oliva virgen extra contiene una proporción de antioxidantes significativamente más alta que el resto de aceites refinados. El consumo necesario para alcanzar dichos beneficios saludables, no está definido de forma clara. Aunque en los estudios in vitro se sabe que los resultados dependen de la dosis, en los estudios in vivo a veces es difícil cuantificar o registrar el consumo (Waterman & Lockwood, 2007).

Las hojas de los olivos son, a su vez, otra fuente para la obtención de dichos compuestos. Es una fuente barata, renovable y abundante, que suele ser muchas veces desecho agrícola. Sin embargo, hay un creciente interés en ellas, ya que de las hojas se extraen componentes fenólicos tanto para cosmética como para complementos alimenticios e industrias farmacéuticas.

En la revisión de Sahin y Bilgin, se analizan las diferentes propiedades, así como las diferentes variables a tener en cuenta para una extracción más exitosa, como son la edad de la hoja, el grado de maduración, el origen geográfico o incluso el clima, ya que la cantidad de biofenoles tiende a disminuir en días calurosos de verano y aumentar en primavera (Sahin & Bilgin, 2017).

También existen estudios que buscan una mayor efectividad en las condiciones de los procesos industriales para extraer estos antioxidantes fenólicos de las hojas del olivo, como el estudio de Shirzad y colaboradores, cuyos resultados muestran una mayor eficiencia de la extracción con unas condiciones de 51% de etanol con respecto al agua, durante 15 minutos a 65°C,

identificando 27 compuestos con la oleuropeína como compuesto principal (Shirzad et al., 2017).

Se ha estudiado que el extracto obtenido de las hojas de olivo mejora las cualidades del aceite de oliva, cuando son añadidas a éste, en los niveles de tocoferol, carotenoides y clorofila, además de aumentar la actividad antioxidante del aceite (Sahin et al., 2017).

Cicerale y colaboradores explican los citados efectos beneficiosos mediante el estudio de la biodisponibilidad y las propiedades biológicas que confiere el consumo de aceite de oliva. Destacan sus efectos beneficiosos en el plasma de las lipoproteínas, causa principal de las enfermedades cardiovasculares; sobre la oxidación de los lípidos, factor de riesgo de la aterosclerosis; daño oxidativo del ADN, precursor de diferentes tipos de cáncer; y diferentes marcadores biológicos (Cicerale et al., 2010).

I. 5. Aceite de oliva (Oleuropeína) y cáncer.

Existen multitud de estudios que relacionan la oleuropeína con propiedades anticancerígenas. Estos resultados suelen obtenerse de modelos in vivo o de modelos celulares de diferentes tipos de cáncer, muy diferentes al complejo cuerpo humano. Pese a que no se pueden aplicar estas conclusiones de forma directa al cáncer en humanos, ya que para ello serían necesarios ensayos clínicos, la evidencia disponible en modelos celulares y animales apoyan la conclusión de que los polifenoles del aceite de oliva, como la oleuropeína, tienen efecto protector contra el cáncer y puede explicar la menor prevalencia en personas que consumen una dieta mediterránea (Boss et al., 2016).

Partiendo de esta premisa, encontramos diferentes artículos y revisiones que estudian de qué modo se produce este efecto anticancerígeno.

En las conclusiones de la revisión de estudios in vivo de Fabiani y colaboradores, se muestra que los componentes fenólicos del aceite de oliva inhiben tanto la fase de iniciación como la de progresión de la carcinogénesis.

En esta primera fase, destacan el posible papel de estos componentes para prevenir el daño en el ADN inducido por estrés oxidativo (Fabiani, 2016).

Una revisión reciente ha demostrado que la oleuropeína actúa como un agente anticancerígeno por su mediación en varios mecanismos importantes, incluyendo los dirigidos a HER2, modificaciones epigenéticas, interferencia con la vía MAPK, modulación de la apoptosis y eje de señalización PI3K/AKT, así como reduciendo la producción de ROS en diferentes tipos celulares (Ahmad Farooqi et al., 2017).

Otras de las cualidades que se le atribuyen a este antioxidante son la inhibición de factores de crecimiento que están excesivamente expresados en distintos tipos de cáncer y la inducción a la apoptosis en las células cancerígenas (Fayyaz et al., 2016).

Debido a sus cualidades como antiinflamatorio, la oleuropeína podría prevenir la colitis asociada a procesos quimioterapéuticos en cáncer colorrectal (Giner et al., 2016).

Existen estudios que combinan los modelos celulares y modelos animales, como el de Hamdi y Castellon. En él, podemos observar como la oleuropeína induce la regresión de tumores en roedores. En los resultados en líneas celulares, existe una inhibición del crecimiento y de la migración, evitando así la invasión en otros tejidos (Hamdi & Castellon, 2005).

Son muy frecuentes los estudios que utilizan líneas celulares humanas tumorales para ver el efecto de la oleuropeína in vitro.

Se realizó un estudio en líneas celulares de cáncer de colón y hepático, en el que además de comprobar el efecto antiproliferativo de la oleuropeína se estudió cómo de efectivas eran diferentes variedades de olivo, de las que se analizó su contenido en polifenoles y flavonoides, destacando finalmente, entre otros, la oleuropeína (Maalej et al., 2017).

Dentro de los tipos de líneas celulares cancerígenas utilizadas podemos encontrar próstata (Acquaviva et al., 2012), tiroides (Bulotta et al., 2013), colorrectal (Cardeno, Sanchez-Hidalgo, Rosillo et al., 2013), hepático (Yan et al., 2015) y HeLa (Yao et al., 2014).

Los resultados en todos ellos son bastante prometedores, destacando la actividad antiproliferativa frente a estas células dañinas, aunque las diferentes características de los diferentes tipos hacen que la metodología utilizada también varíe en los cultivos celulares realizados, ya que los efectos son dosis-dependientes y no existe una concentración de oleuropeína estándar que sea efectiva en todos ellos.

Unos de los tipos de cáncer más estudiados *in vitro* con relación a este polifenol del aceite de oliva es el cáncer de mama. En las diferentes líneas celulares de cáncer de mama que encontramos en los trabajos consultados, no solo encontramos resultados positivos con respecto a la actividad antiproliferativa (Sirianni et al., 2010), como en las líneas ya mencionadas, sino que también destacan los resultados obtenidos con respecto al efecto antimetastásico (Hassan et al., 2012) y apoptótico (Hassan et al., 2014) del antioxidante estudiado.

Además de la oleuropeína, también se han estudiado análogos de la misma para ver si esta prometedora actividad antiproliferativa se podía encontrar en ellos. De los 51 estudiados, 7 mostraron tener una citotoxicidad significativa y de estos, el análogo 24, el que poseía la actividad tumoral más prometedora, fue utilizado en estudios más detallados (Samara et al., 2017).

Los resultados en estudios *in vivo* en roedores inyectados con células de cáncer de mama humano, en combinación con fármacos anticancerígenos como la doxorubicina, muestran una disminución del volumen del tumor de más de 3 veces con respecto al control al utilizar la oleuropeína como tratamiento combinado (Elamin et al., 2017).

Este antioxidante, presente tanto en el aceite de oliva, como en las aceitunas y las hojas de olivo, tiene un alto poder anticancerígeno, como se demuestra en los estudios incluidos en la revisión de Shamsoum y colaboradores. Los experimentos han sido realizados *in vitro*, en 11 líneas celulares humanas tumorales diferentes y también *in vivo*, en modelos animales. Estos efectos están asociados con la capacidad de la oleuropeína para modular la expresión génica y la actividad de una variedad de diferentes proteínas de

señalización que juegan un papel importante en la proliferación y la apoptosis (Shamshoum et al., 2017).

I. 6. Otros Antioxidantes y cáncer (Curcumina).

La curcumina es un colorante alimenticio natural derivado de la cúrcuma, especia obtenida de la planta denominada *Curcuma longa*. Aunque la curcumina pura ha sido usada en algunos estudios experimentales, la mayoría de estos estudios utilizan un derivado comercial que contiene un 80% de curcumina (Shehzad et al., 2013).

Resultados recientes muestran que este compuesto tiene un alto componente antioxidante y antiinflamatorio que le da un carácter terapéutico multifactorial para el tratamiento de varias enfermedades. La curcumina interviene en la modulación de enzimas, factores de crecimiento y sus receptores, así como citoquinas y varias proteínas quinasas que controlan la proliferación celular y la progresión del ciclo celular (Shehzad et al., 2013).

También se ha demostrado que disminuye la mineralización y la proliferación celular en células con perfil osteoblástico (Moran et al., 2012).

Sin embargo, existen discrepancias sobre la concentración de curcumina necesaria para alcanzar estos niveles de citotoxicidad (Moran et al., 2014).

Una revisión publicada en 2013 sobre el tratamiento con curcumina in vitro, in vivo y ensayos clínicos, muestra las múltiples vías moleculares sobre las que media para prevenir diferentes tipos de cáncer (Shehzad et al., 2013).

En 2015, el resultado de otra revisión mostró la aplicación de la curcumina como tratamiento en diferentes tipos de cáncer in vivo (Leal-Hernandez et al., 2015).

En revisiones posteriores estos datos siguen confirmándose, como observamos en una revisión de 2016 de Imran y colaboradores en la que muestran que la curcumina y la fuerte mezcla de las moléculas bioactivas que la componen (conocidas como curcuminoides) suprimen la proliferación, la

angiogénesis, la invasión, la activación NF- κ B y la metástasis de diferentes tumores (Imran et al., 2016).

Dentro de todos los cánceres estudiados, destacamos los resultados obtenidos de osteosarcomas o diferentes enfermedades óseas.

Los compuestos naturales, como la curcumina, están siendo estudiados como posibles futuros tratamientos del osteosarcoma, por su afectación a las líneas de señalización de las células principales (Angulo et al., 2017).

Los resultados obtenidos en una revisión reciente sobre diferentes enfermedades óseas, muestra una visión prometedora de cómo la curcumina actúa, sobre todo, en enfermedades con una actividad resortiva excesiva (Rohanizadeh et al., 2016).

De las enfermedades analizadas, encontramos la osteoporosis, la osteoartritis, el osteosarcoma y las metástasis óseas derivadas de otros cánceres (Rohanizadeh et al., 2016).

La curcumina podría proteger de la osteoporosis inducida por glucocorticoides mediante la protección de los osteoblastos de la apoptosis, por lo que sería un tratamiento preventivo prometedor (Z. Chen et al., 2016).

Hablando de la apoptosis, en este caso de las células malignas, la vía mitocondrial parece ser una de las más importantes. La curcumina interfiere activando esta vía mediante la generación de ROS intracelular, lo que le concedería este efecto antitumoral que se le atribuye (Z. Chang et al., 2014).

En los estudios in vitro, la línea celular humana de osteosarcoma más frecuente es la MG-63. En ellos se destacan diferentes características de este antioxidante. La curcumina parece inhibir la proliferación y la habilidad invasiva de estas células cancerosas inhibiendo los genes diana (Yu et al., 2015).

Utilizando un vehículo hidrofóbico apropiado (APNPs), la curcumina podría actuar en un medio acuoso e inhibir selectivamente las células de osteosarcoma (MG-63) en lugar de los osteoblastos humanos sanos, dando más posibilidades de tratamiento a este compuesto (R. Chang et al., 2015).

Este mismo autor ya mostró que, con las concentraciones adecuadas, la curcumina podría atacar de forma selectiva a las células cancerígenas frente a las células óseas sanas (R. Chang et al., 2014).

I. 7. Aceite de oliva (Oleuropeína) y salud ósea.

La degeneración esquelética debido a la edad, también conocida como osteoporosis, es un problema de salud importante a lo largo de todo el mundo. Algunos componentes de la dieta protegen nuestro sistema esquelético de esta enfermedad, como el consumo de aceite de oliva y sus polifenoles, que han mostrado mejorar la salud ósea (García-Martínez et al., 2014).

Estos efectos beneficiosos podrían atribuirse a su habilidad para reducir el estrés oxidativo y la inflamación. En estudios con líneas celulares se ha demostrado que los polifenoles del aceite de oliva aumentan la proliferación de pre-osteoblastos, la diferenciación de osteoblastos y disminuye la formación de osteoclastos. Sin embargo, las vías celulares sobre las que intervienen siguen siendo estudiadas (Chin & Ima-Nirwana, 2016).

La forma en la que la oleuropeína disminuye la formación de osteoclastos, y por tanto inhibe la resorción del hueso, es mediante el bloqueo de la expresión del mRNA de los marcadores genéticos de osteoclastos (Torre, 2017).

Existen también estudios que muestran estos efectos de los compuestos fenólicos, pero haciendo diferencias entre diferentes variedades de aceite de oliva virgen extra, y con frutos en diferente etapa de maduración. Los resultados mostraron que la variedad picual aumentó la proliferación en un porcentaje mayor que la arbequina. Se observó una disminución de la proliferación celular cuando el fruto era recogido al final del periodo de cosecha, por disminuir el contenido fenólico total en esta última etapa (García-Martínez et al., 2016).

En un estudio realizado con diferentes polifenoles del aceite de oliva, se observó que la oleuropeína favorecía el depósito de calcio y disminuía la formación de osteoclastos (Hagiwara et al., 2011).

Con respecto a su actividad antiinflamatoria, la oleuropeína parece mejorar el daño tisular asociado a la artritis inducida por colágeno, al actuar durante la inflamación crónica propia de la artritis reumatoide (Impellizzeri et al., 2011).

Este efecto protector en la masa ósea asociado a una modulación de los parámetros antiinflamatorios, también fue estudiado en ratas (Puel et al., 2006).

Este mismo autor, indica que la oleuropeína no solo podría tratar la inflamación, sino también prevenirla, como comprobó igualmente en ratas ovariectomizadas (Puel et al., 2004).

También se estudian las propiedades del aceite de oliva con otros compuestos. En combinación con la vitamina D3, es capaz de contrarrestar la pérdida ósea inducida por la carencia de estrógenos, siendo así una probable alternativa nutricional para la prevención de la osteoporosis (Tagliaferri et al., 2014).

I. 8. Apoptosis mediada por Bax/Bcl-2.

El término apoptosis fue propuesto por Kerr desde hace varias décadas para hacer referencia a la muerte celular deliberada. Este proceso se ha mostrado como un mecanismo indispensable para lograr una adecuada homeostasis. La apoptosis puede ser mediada por diversas vías de señalización molecular bajo un estricto control regulador, ya que la desregulación de tales señalizaciones se asocia al desarrollo de enfermedades autoinmunes y cáncer (Ramírez-García et al., 2014).

La iniciación de los procesos apoptóticos está regulada por las células b de linfoma 2 (Bcl-2), familia de proteínas que pueden ser identificadas como pro-apoptóticas o anti-apoptótica (Cory et al., 2003; Unger et al., 1993).

La apoptosis se regula a través de la acción de varios oncogenes y, posteriormente, las oncoproteínas muestran la acción inhibitoria o promotora. Bcl-2, un gen ubicado en el cromosoma 18q21, codifica una proteína de 26 kD que bloquea la muerte celular programada sin afectar a la proliferación celular.

La proteína Bax es un miembro de la familia Bcl-2 que promueve la apoptosis. En muchos sistemas, los miembros de la familia Bcl-2 modulan la apoptosis, y el ratio Bax/Bcl-2 sirve para determinar la susceptibilidad de las células a la apoptosis (Salakou et al., 2007).

Las propiedades de Bcl-2 son tan relevantes y diversas que pueden decidir el desenlace de una célula, ya sea por apoptosis, necrosis o autofagia. Sin embargo, dicha capacidad, si está mal regulada, puede permitir que células alteradas sobrevivan y den origen a estirpes con dichas características y, adicionalmente, adquieran otras (Ramírez-García et al., 2014).

En los últimos años, varios estudios han investigado la importancia del ratio Bax/Bcl-2 y lo correlacionaron con la progresión del desarrollo de varias enfermedades o tumores malignos. Se sabe que las caspasas, especialmente la caspasa-3, actúan en el control posterior de Bax/Bcl-2 y desempeñan un papel clave en la ejecución de la apoptosis (Salakou et al., 2007).

La evidencia reciente sugiere que Bcl-2 también actúa como una medida de la muerte del sustrato para las caspasas y, por lo tanto, que la familia de enzimas caspasas puede inactivar la función antiapoptótica de Bcl-2 y aumentar aún más la muerte celular, incluso cuando se desencadena la apoptosis a través de una vía no dependiente de Bax/Bcl-2. Aunque existe un ciclo de retroalimentación entre Bcl-2 y caspasas, Bcl-2 no siempre puede inhibir la apoptosis, lo que implica un subconjunto de activación de caspasas que lleva a la muerte celular (Salakou et al., 2007).

La relación Bax/Bcl-2 puede regular positivamente la expresión de caspasa-3 y modular la apoptosis asociada con el progreso de la enfermedad. Cuando la relación Bax/Bcl-2 es <1 se asocia con la remisión completa y estable después de la extirpación del tumor. La relación Bax/Bcl-2 fue un marcador predictivo independiente para la respuesta terapéutica después de la eliminación de la zona afectada (Salakou et al., 2007).

Estas vías de apoptosis son tenidas en cuenta en estudios in vitro de viabilidad de células cancerígenas, para conocer cómo afecta a la regulación de la expresión en estas proteínas.

Cuando existe una actividad antiproliferativa por parte del agonista que esté actuando en el cultivo celular y, por lo tanto, un aumento de la apoptosis en estas células cancerígenas, existe un aumento de la expresión de Bax, proteína apoptótica, y una disminución de Bcl-2, proteína antiapoptótica. Al mismo tiempo aumenta el ratio de Bax/Bcl-2, lo que indica una inducción a la apoptosis (Vadde et al., 2015; Wu et al., 2017).

I. 9. El gen p-53.

El gen p-53 fue descrito por primera vez hace 40 años y han sido numerosas las investigaciones realizadas desde entonces sobre él para determinar su función. El gen expresa una proteína supresora de tumores que puede detener el ciclo celular, activar enzimas de reparación de ADN si detecta daños o incluso iniciar procesos de apoptosis si estos daños son irreparables (Levine & Oren, 2009).

Sin embargo, este gen supresor de tumores está mutado en cánceres humanos, impidiendo evitar que las células malignas se propaguen de forma descontrolada y aumentando así su virulencia (Petitjean et al., 2007).

Debido a esto, diversas investigaciones están enfocadas en la búsqueda de fármacos que permitan reactivar el p-53 mutante (Blanden et al., 2015).

Las propiedades anticancerígenas de la oleuropeína también se han relacionado con la expresión elevada de la proteína p-53 en células de cáncer de mama (Chimento et al., 2014; Hassan et al., 2014), células de cáncer de colon (Cardeno, Sanchez-Hidalgo, & Alarcon-de-la-Lastra, 2013) y células humanas de neuroblastoma (Secme et al., 2016). En general, se ha sugerido que la oleuropeína influye en las moléculas clave de señalización implicadas en la proliferación y supervivencia de células cancerosas y, por esa razón, podría utilizarse como un agente para atacar estas moléculas de señalización de forma específica (Shamshoum et al., 2017).

Capítulo II. OBJETIVOS

Capítulo II. Objetivos.

Objetivo primario: Determinar la posible citotoxicidad de la oleuropeína sobre células humanas de osteosarcoma y la caracterización de dicho proceso.

Objetivo secundario: Estudiar la regulación de la muerte celular inducida por oleuropeína en células humanas de osteosarcoma y su compatibilidad con la apoptosis mediante el estudio de las vías Bax/Bcl-2.

Capítulo III. MATERIAL Y MÉTODOS

Capítulo III. Material y métodos

III. 1. Cultivos celulares.

Se han realizado cultivos in vitro con líneas celulares humanas de osteosarcoma (MG-63 y Saos-2).

Ambas líneas tienen un modo de crecimiento adherente.

La primera de ellas, MG-63, tiene su origen en un varón caucásico de 14 años con osteosarcoma y su morfología es de fibroblasto.

La Saos-2, sin embargo, tiene su origen en una mujer caucásica de 11 años con sarcoma osteogénico primario y su morfología es epitelial.

Las líneas celulares MG-63 y Saos-2 (Osteosarcoma humano) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.).

Las células MG-63 se cultivaron en EMEM (EBSS) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor, penicilina (10 U/ml), estreptomycin (10 µg/ml), glutamina 2 mM y 1 % aminoácidos no esenciales (NEAA).

Las células Saos-2 se cultivaron en McCoy's 5a suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor, penicilina (10 U/ml), estreptomycin (10 µg/ml) y glutamina 2 mM.

Los cultivos se incubaron en presencia de 5 % de CO₂ a 37 °C y 95 % de humedad relativa.

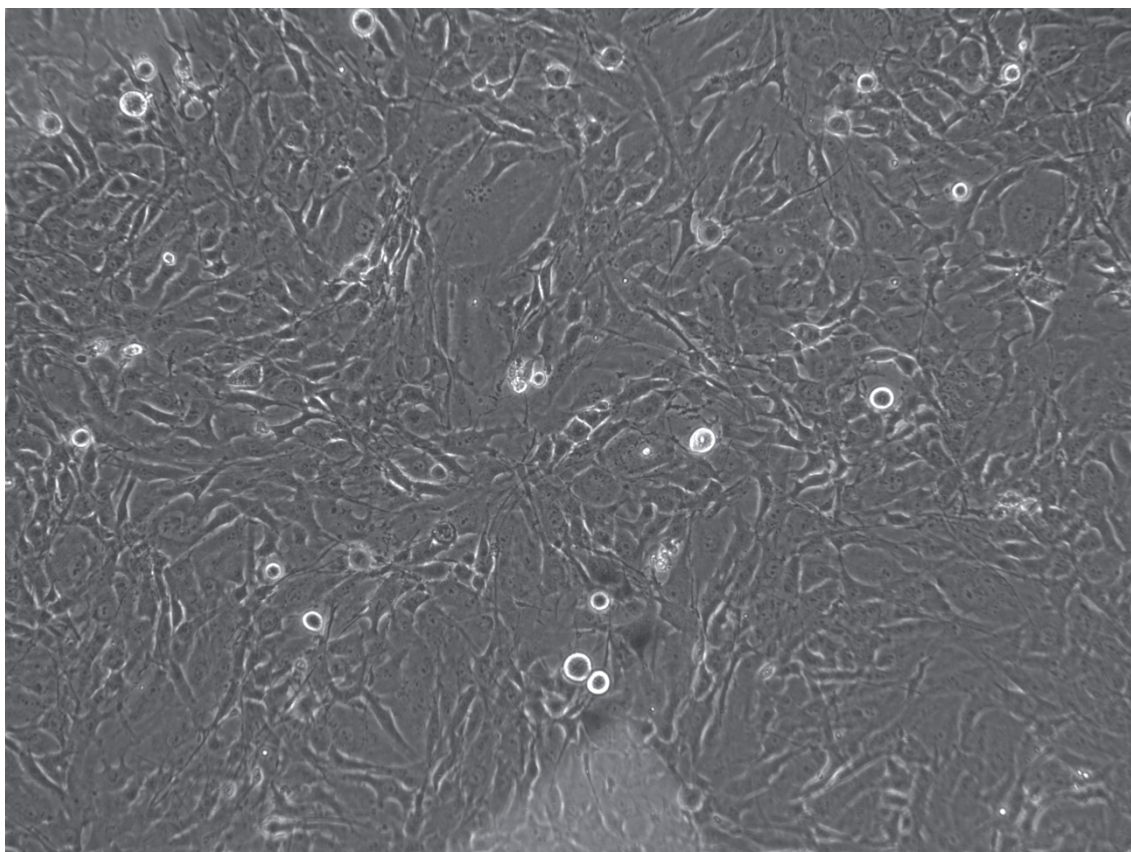


Figura 1. Cultivo de células humanas de osteosarcoma MG-63 en monocapa.

III. 2. Viabilidad celular mediante estudios de MTT.

Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos con una densidad de 1×10^4 células/pocillo y se incubaron por 24 h a 37 °C en 5 % de CO₂. Las células se trataron con diferentes concentraciones de oleuropeína y las no tratadas se utilizaron como controles negativos. Después de los diferentes periodos de tratamiento, se agregaron 100 µl de reactivo MTT a cada pocillo.

Las placas se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂ durante 4 h. Luego, se añadieron 100 µl de la solución de solubilización (DMSO) a cada pocillo, seguido de una incubación de 1 h a 37 °C para disolver los cristales de formazán. Finalmente, se leyó la absorbancia usando un lector de placas ELISA a una longitud de onda de 570 nm. El porcentaje de citotoxicidad y la viabilidad celular se calculó usando la siguiente ecuación: % de citotoxicidad = $1 - (\text{absorbancia media de las células tratadas} / \text{absorbancia media del control negativo})$ y % de viabilidad = $100 - \%$ de citotoxicidad.



Figura 2. Incubador de células.

III. 3. Expresión génica mediante ensayos de PCR en tiempo real.

Se ha estudiado la expresión génica de Bax/Bcl-2 mediante ensayos de PCR en tiempo real para conocer su mediación en la apoptosis.

Se aisló el ARN total de las células cultivadas expuestas a diferentes condiciones. Las concentraciones del ARN se midieron espectrofotométricamente. 1 μg de ARN total fue transcrito de forma inversa en un volumen de reacción final 20 μl . El ADN complementario fue preparado por transcripción inversa.

La PCR cuantitativa se realizó en un instrumento StepOne Thermal Cycler y se determinó la expresión de GAPDH, Bax, Bcl-2. Los niveles de transcripción se determinaron usando sondas Taqman. La expresión de la transcripción se determinó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak & Schmittgen, 2001), con valores

normalizados frente a los de GAPDH. Los cambios de expresión se midieron en relación con los controles no estimulados.

El ARN total se extrajo utilizando el reactivo TRIzol (Sigma, St. Louis, MO, USA). El cDNA fue sintetizado por KiCqStart One-Step Probe real-time quantitative PCR ReadyMix (Sigma, St. Louis, MO, USA). La PCR cuantitativa se realizó utilizando el ensayo de expresión génica TaqMan (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) en un sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus (Thermo Fisher Scientific). Las reacciones se realizaron en un volumen de 10 μ l que contenía 1 μ l de cDNA diluido, 20X TaqMan Gene Expression Assay Mix y 2X TaqMan Universal PCR Master Mix. Las mezclas de ensayos de expresión génica de TaqMan se utilizaron para detectar Bax, Bcl-2 y p-53, mientras que el GAPDH humano se midió como un control de contaminación. La expresión génica relativa se calculó restando el valor Ct de Bax, Bcl-2 o p-53 (genes de interés) del gen GAPDH (control) por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Cada PCR cuantitativa se realizó por triplicado y se repitió de forma independiente tres veces.

III. 4. Actividad caspasa-3.

Se midió la actividad de esta enzima ya que la caspasa-3 es un miembro de la familia de las caspasas que juega un importante papel como mediador de la apoptosis, o muerte celular programada. Después de su activación, la caspasa-3 corta una gran variedad de proteínas celulares, causando cambios morfológicos y funcionales en las células que llevan a cabo la apoptosis.

El ensayo de la caspasa-3 permite una cuantificación rápida y eficaz de la actividad de esta enzima.

La actividad de caspasa-3 se midió con un kit de ensayo colorimétrico (Sigma, St. Louis, MO, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El ensayo colorimétrico caspasa-3 se basa en la hidrólisis de acetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilida (Ac-DEVD-pNA) por la caspasa-3, dando como resultado la liberación del resto p-nitroanilina (pNA). La p-nitroanilina se detecta

a 405 nm ($\epsilon_{mM} = 10.5$). La concentración del pNA liberado del sustrato se calcula a partir de los valores de absorbancia a 405 nm o de una curva de calibración preparada con estándares pNA.

**Capítulo IV. PROPIEDADES
ANTIPROLIFERATIVAS DE LA
OLEUROPEÍNA EN CÉLULAS HUMANAS DE
OSTEOSARCOMA**

Capítulo IV PROPIEDADES ANTIPROLIFERATIVAS DE LA OLEUROPEÍNA EN CÉLULAS HUMANAS DE OSTEOSARCOMA

IV. 1. Introducción.

En las hojas de olivo (*Olea europaea*), el principal compuesto fenólico es la oleuropeína, seguida del hidroxitirosol, flavona-7-glucósidos de luteolina y apigenina, y verbascósido [1a]. Las propiedades antioxidantes y antiproliferativas de estos compuestos han sido estudiadas extensivamente, con un número de estudios que informaron que el aceite de oliva es más eficaz contra el cáncer que otras formas de lípidos agregados [1b, c].

El consumo de aceite de oliva ha demostrado correlacionarse inversamente con el riesgo de cáncer de mama en los seres humanos [1d] y reducir significativamente lesiones precancerosas en cáncer colorrectal in vitro [2,3], cáncer de próstata [4], leucemia [5], cáncer de páncreas [6], carcinoma hepatocelular [7], células Hela [8a], cáncer de mama [8b-g], cáncer de tiroides [9a], carcinoma de vejiga urinaria [8c], adenocarcinoma de células renales y eritroleucemia/glioblastoma/melanoma [9b].

Aunque la oleuropeína también ha demostrado tener efectos cruciales en la formación y mantenimiento de huesos, y por lo tanto para remediar de forma efectiva las condiciones relacionadas con el hueso, como la osteoporosis [9c], hay una falta de datos relacionados con otras enfermedades, como el osteosarcoma (OS).

IV. 2. Objetivo.

En este estudio investigamos, por primera vez, el efecto antiproliferativo de oleuropeína en dos líneas celulares humanas de OS, MG-63 y Saos-2. El efecto de la oleuropeína fue probado en dos líneas celulares humanas diferentes de OS, que representan dos niveles diferentes de madurez osteoblástica [9d].

IV. 3. Método.

La oleuropeína fue adquirida de Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). Las líneas celulares MG-63 y Saos-2 (OS humano) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Las células MG-63 se cultivaron en EMEM (EBSS) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor, penicilina (10 U/ml), estreptomicina (10 µg/ml), 2 mM glutamina y 1 % de aminoácidos no esenciales (NEAA).

Las células Saos-2 fueron cultivadas en McCoy's 5a suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor, penicilina (10 U/ml), estreptomicina (10 µg/ml) y 2 mM glutamina.

Los cultivos fueron incubados en presencia de 5 % CO₂ a 37 °C y 95 % de humedad relativa.

Ensayo de citotoxicidad: Las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos con una densidad de 1×10^4 células/pocillo y se incubaron por 24 h a 37 °C en 5 % de CO₂. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de oleuropeína (50, 100, 200, 400 µM). Las células de cáncer no tratadas se utilizaron como controles negativos.

Después de 24, 48 y 72 h de tratamiento, se agregaron 100 µl de reactivo MTT a cada pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂ durante 4 horas. Luego, se añadieron 100 µl de la solución de solubilización a cada pocillo, seguido por la incubación durante 1 h a 37 °C para disolver cristales de formazán. Finalmente, la absorbancia fue leída con un lector de ELISA a una longitud de onda de 570 nm. Los porcentajes de citotoxicidad y viabilidad celular se calcularon utilizando la siguiente ecuación: % citotoxicidad = $1 - (\text{absorbancia media de las células tratadas} / \text{absorbancia media del control negativo})$ y % de viabilidad = $100 - \% \text{ citotoxicidad}$.

Determinaciones IC50: El análisis Probit fue utilizado para determinar la concentración en la que la mortalidad de oleuropeína fue del 50 % (IC50) por el uso de un algoritmo de regresión de máxima verosimilitud. También se determinaron los valores de citotoxicidad de IC10 y IC90.

Análisis estadísticos: Todos los datos de este estudio se representan en media \pm SD de 3 réplicas de experimentos idénticos. Se determinó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La significación estadística fue determinada por ANOVA seguido de prueba de Bonferroni, y se consideró estadísticamente significativo un valor $P \leq 0.05$. Los datos se representaron como porcentajes de control vs concentración logarítmica (μM).

IV. 4. Resultados.

La oleuropeína causó 50 % de muerte celular, en las dos líneas celulares humanas de OS probadas (MG-63 y Saos-2), con valores de IC50 de 346.3 μM y 419.7 μM en líneas de células MG-63 y Saos-2, respectivamente, después de 48 h de exposición.

En este estudio, fue demostrado que la oleuropeína tiene un valor mayor de IC50 con respecto al calculado previamente en estudios en células humanas promielocíticas de leucemia HL60 (116.7 μM [10a] y 170 μM [10b], células MCF-7 y MDA-MB-231, 110 y 160 μM , respectivamente [8c].

La dosis de oleuropeína utilizada en nuestro estudio también fue mayor que la descrita para las células de HeLa carcinoma de cérvix humano (200 μM) [8a], células de cáncer de tiroides (100 μM) [9a] y las células MDA-MB-231, MCF-10A y STO (25-75 μM), pero similar a la dosis utilizada en las células de cáncer del colon después del tratamiento de 48h (400 μM) [2] y las células de cáncer de próstata después del tratamiento de 72h (100-500 μM) [4].

El efecto de la oleuropeína en las células de cáncer fue ampliamente estudiado por Kikuchi y colaboradores [10c], que probó su citotoxicidad contra un grupo de 39 líneas celulares de cáncer humano, sin encontrar entre ellas ninguna representación de cáncer de hueso. El estudio contra cáncer de mama, sistema nervioso central, colon, pulmón, melanoma, ovario, renal, estómago y próstata demostró una concentración media de 96 μM de oleuropeína para la inhibición al 50 % del crecimiento celular con respecto al control, después de 48 h de exposición [10c].

Por lo tanto, nuestros resultados confirman que la citotoxicidad de oleuropeína en células de cáncer depende de la concentración de oleuropeína, así como de la duración de la exposición (Tabla 1 y Figura 3).

Además, el hallazgo de que la citotoxicidad difiere entre líneas celulares sugiere que diferentes mecanismos moleculares pueden mediar en los efectos de la oleuropeína.

PROPIEDADES ANTIPROLIFERATIVAS DE LA OLEUROPEÍNA EN CÉLULAS HUMANAS DE OSTEOSARCOMA

	Exposición	Oleuropeína (µM)	Viabilidad (Media±SD)	Valor de <i>p</i> vs células control	Valor de <i>p</i> vs células MG-63
Células MG-63	24 h	50	107.5±6.2	0.707	
		100	114.3±2.8	0.147	
		200	72.2±11.6	0.002	
		400	60.5±8.8	<0.0001	
	48 h	50	95.7±2.7	0.953	
		100	89.3±13.2	0.426	
		200	65.7±6.6	<0.0001	
		400	43.4±7.5	<0.0001	
	72 h	50	107.3±10.9	0.934	
		100	71.9±14.4	0.145	
		200	60.7±5.0	0.046	
		400	42.9±1.4	0.01	
Células Saos-2	24 h	50	90.4±10.1	0.593	0.056
		100	87.3±5.8	0.377	0.001
		200	78.7±3.9	0.090	0.504
		400	68.0±1.2	0.019	0.323
	48 h	50	99.5±3.8	0.998	0.184
		100	71.3±5.3	<0.0001	0.080
		200	58.1±3.2	<0.0001	0.128
		400	59.3±4.9	<0.0001	0.025
	72 h	50	109.0±9.5	0.720	0.884
		100	86.7±4.8	0.426	0.304
		200	53.3±7.8	0.006	0.374
		400	45.7±4.1	0.003	0.454

Tabla 1. Efecto antiproliferativo in vitro de oleuropeína sobre células humanas de osteosarcoma.

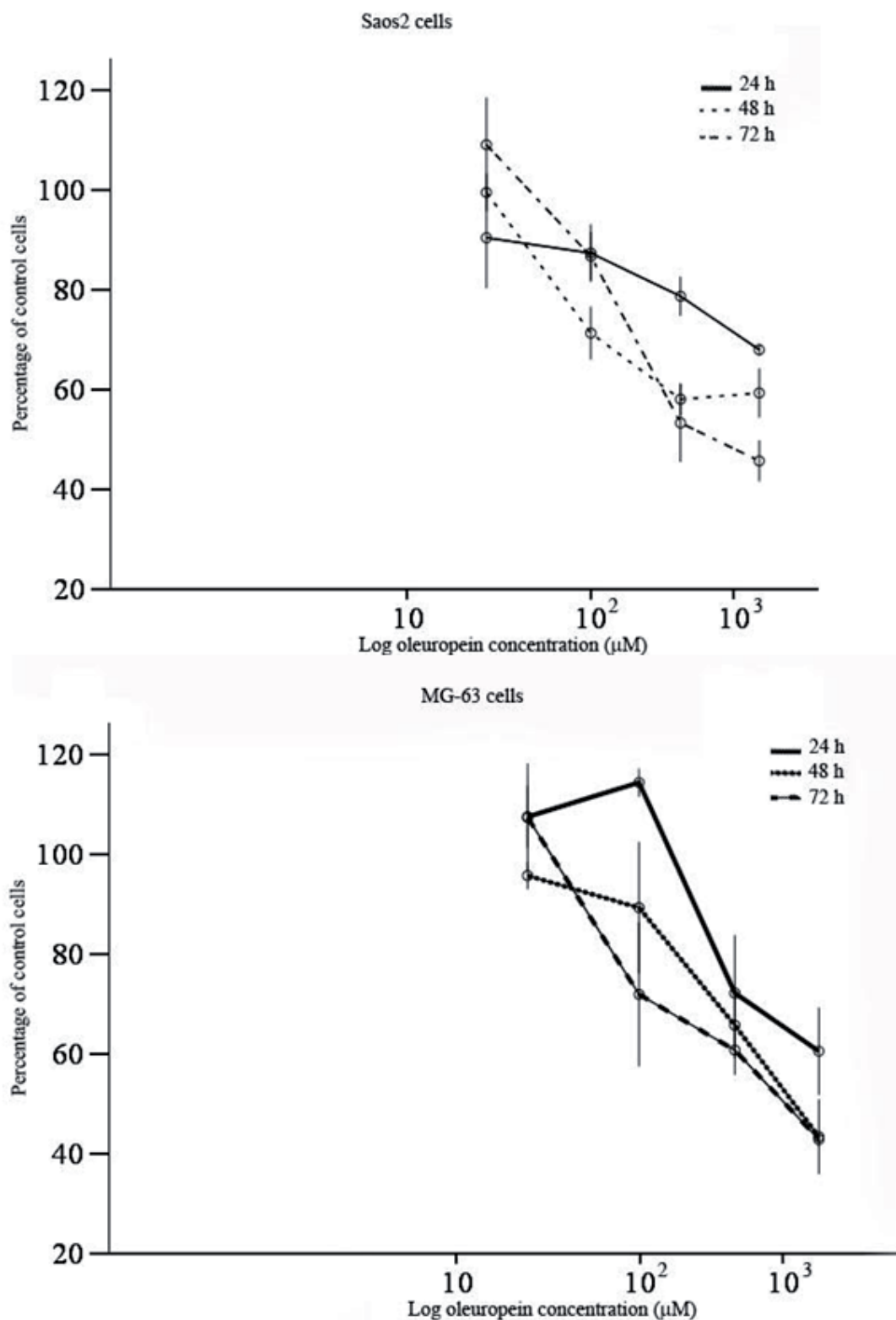


Figura 3. Efectos antiproliferativos de oleuropeína en líneas celulares de osteosarcoma. Las gráficas muestran curvas de dosis-respuesta de oleuropeína obtenidas mediante ensayo de MTT después de 24, 48 y 72 h de exposición. Los valores son medias \pm SD.

IV. 5. Referencias.

- [1] (a) Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V. (2006) The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17, 429-445.
- (b) Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Wurtele G, Spiegelhalder B, Bartsch H. (2000) Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncology*, 1, 107-112.
- (c) Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsch H. (2000) The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, 36, 1235-1247.
- (d) Martin-Moreno JM, Willett WC, Gorgojo L, Banegas JR, Rodriguez-Artalejo F, Fernandez-Rodriguez JC, Maisonneuve P, Boyle P. (1994) Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk. *International Journal of Cancer*, 58, 774-780.
- [2] Cardeno A, Sanchez-Hidalgo M, Rosillo MA, Alarcon dL. (2013) Oleuropein, a secoiridoid derived from olive tree, inhibits the proliferation of human colorectal cancer cell through downregulation of HIF-1alpha. *Nutrition and Cancer*, 65, 147-156.
- [3] Notarnicola M, Pisanti S, Tutino V, Bocale D, Rotelli MT, Gentile A, Memeo V, Bifulco M, Perri E, Caruso MG. (2011) Effects of olive oil polyphenols on fatty acid synthase gene expression and activity in human colorectal cancer cells. *Genes & Nutrition*, 6, 63-69.
- [4] Acquaviva R, Di GC, Sorrenti V, Galvano F, Santangelo R, Cardile V, Gangia S, D'Orazio N, Abraham NG, Vanella L. (2012) Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *International Journal of Oncology*, 41, 31-38.
- [5] Fabiani R, De BA, Rosignoli P, Servili M, Selvaggini R, Montedoro GF, Di SC, Morozzi G. (2006) Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *Journal of Nutrition*, 136, 614-619.
- [6] Goldsmith CD, Vuong QV, Sadeqzadeh E, Stathopoulos CE, Roach PD, Scarlett CJ. (2015) Phytochemical properties and anti-proliferative activity

- of *Olea europaea* L. leaf extracts against pancreatic cancer cells. *Molecules*, 20, 12992-13004.
- [7] Yan CM, Chai EQ, Cai HY, Miao GY, Ma W. (2015) Oleuropein induces apoptosis via activation of caspases and suppression of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in HepG2 human hepatoma cell line. *Molecular Medicine Reports*, 11, 4617-4624.
- [8] (a) Yao J, Wu J, Yang X, Yang J, Zhang Y, Du L. (2014) Oleuropein induced apoptosis in HeLa cells via a mitochondrial apoptotic cascade associated with activation of the c-Jun NH₂-terminal kinase. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 125, 300-311.
- (b) Chimento A, Casaburi I, Rosano C, Avena P, De LA, Campana C, Martire E, Santolla MF, Maggiolini M, Pezzi V, Sirianni R. (2014) Oleuropein and hydroxytyrosol activate GPER/ GPR30-dependent pathways leading to apoptosis of ER-negative SKBR3 breast cancer cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58, 478-489.
- (c) Goulas V, Exarchou V, Troganis AN, Psomiadou E, Fotsis T, Briasoulis E, Gerothanassis IP. (2009) Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 600-608.
- (d) Hassan ZK, Elamin MH, Omer SA, Daghestani MH, Al-Olayan ES, Elobeid MA, Virk P. (2014) Oleuropein induces apoptosis via the p53 pathway in breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14, 6739-6742.
- (e) Menendez JA, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Garcia-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. (2008) Analyzing effects of extra-virgin olive oil polyphenols on breast cancer-associated fatty acid synthase protein expression using reverse-phase protein microarrays. *International Journal of Molecular Medicine*, 22, 433-439.
- (f) Quirantes-Pine R, Zurek G, Barrajon-Catalan E, Bassmann C, Micol V, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. (2013) A metabolite-profiling approach to assess the uptake and metabolism of phenolic compounds from olive leaves in SKBR3 cells by HPLC-ESI-QTOF-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72, 121-126.

- (g) Sirianni R, Chimento A, De LA, Casaburi I, Rizza P, Onofrio A, Iacopetta D, Puoci F, Ando S, Maggiolini M, Pezzi V. (2010) Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54, 833-840.
- [9] (a) Bulotta S, Corradino R, Celano M, Maiuolo J, D'Agostino M, Oliverio M, Procopio A, Filetti S, Russo D. (2013) Antioxidant and antigrowth action of peracetylated oleuropein in thyroid cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, 51, 181-189.
- (b) Hamdi HK, Castellon R. (2005) Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334, 769-778.
- (c) Hagiwara K, Goto T, Araki M, Miyazaki H, Hagiwara H. (2011) Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *European Journal of Pharmacology*, 662, 78-84.
- (d) Pautke C, Schieker M, Tischer T, Kolk A, Neth P, Mutschler W, Milz S. (2004) Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Research*, 24, 3743-3748.
- [10] (a) Pieme C, Santosh G, Tekwu E, Askun T, Aydeniz H, Ngogang J, Bhushan S, Saxena A. (2014) Fruits and barks extracts of *Zanthoxylum heitzii* a spice from Cameroon induce mitochondrial dependent apoptosis and Go/G1 phase arrest in human leukemia HL-60 cells. *Biological Research*, 47, 54-67.
- (b) Anter J, Fernandez-Bedmar Z, Villatoro-Pulido M, Demyda-Peyras S, Moreno-Millan M, Alonso-Moraga A, Munoz-Serrano A, Luque de Castro MD. (2011) A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptosis-inducing properties of olive-leaf extracts. *Mutation Research*, 723, 165-170.
- (c) Kikuchi M, Mano N, Uehara Y, Machida K, Kikuchi M. (2011) Cytotoxic and EGFR tyrosine kinase inhibitory activities of aglycone derivatives obtained by enzymatic hydrolysis of oleoside-type secoiridoid glucosides, oleuropein and ligustroside. *Journal of Natural Medicines*, 65, 237-240.

Capítulo V. PERSPECTIVAS ANTITUMORALES DE LA OLEUROPEÍNA

Capítulo V. PERSPECTIVAS ANTITUMORALES DE LA OLEUROPEÍNA.

Debido a las características de este tipo de trabajo (carta al editor) no se ha seguido la estructura del resto de trabajos que forman la presente tesis.

V. 1. Resultados

Leímos con interés la revisión de Imran y colaboradores (2018) sobre las perspectivas antitumorales de la oleuropeína y su metabolito hidroxitirosol, publicada en el *Journal of Food Science* en la edición de junio de 2018. Las conclusiones de su manuscrito afirman que la oleuropeína y el hidroxitirosol son potenciales candidatos antitumorales, debido a su actividad basada en experimentos in vivo e in vitro sobre cáncer colorrectal, de mama, de piel, de próstata, de pulmón, de cervix, de tiroides, hepático, de vejiga, sanguíneo, gástrico y cerebral. Felicitamos a Imran y colaboradores por una búsqueda tan extensa de la literatura publicada recientemente sobre los efectos antitumorales de la oleuropeína.

Además, nos gustaría añadir que nuestro grupo también ha publicado resultados sobre los efectos antitumorales de la oleuropeína en células osteosarcoma (Moran et al., 2016) que muestran que la oleuropeína tuvo evidentes efectos citotóxicos en las células humanas de osteosarcoma de una manera dependiente de la concentración y del tiempo de exposición, con efectos tóxicos similares en ambas líneas celulares analizadas (IC₅₀ oscilan entre 247,4 y 475,0 μ M para células MG-63 y entre 359,9-798,7 μ M para células Saos-2). La revisión publicada anteriormente de Shamsoum y colaboradores (2017) ya informó de esos hallazgos en las células humanas de osteosarcoma, así como de otros no incluidos en el reciente estudio de Imran y colaboradores (2018) (mesotelioma (Marchetti et al., 2015), pancreático (Goldsmith et al., 2015) y neuroblastoma (Secme, Eroglu, Dodurga, & Bagci, 2016)).

La razón detrás de los criterios de exclusión no se discutió en su artículo, pero los autores declararon que su objetivo principal era describir las perspectivas y mecanismos anticancerígeno de oleuropeína e hidroxitirosol en cultivos celulares y estudios en animales y humanos, por lo que creemos que esos estudios deberían incluirse en la revisión. Sin embargo, es intrigante que la revisión de Shamsoum, Vlacheski y Tsiani (2017), publicada un año antes, no fuera citada por el estudio de Imran y colaboradores, ya que el conjunto de conocimientos se superpuso básicamente entre las dos revisiones.

V. 2. Referencias

- Goldsmith, C. D., Vuong, Q. V., Sadeqzadeh, E., Stathopoulos, C. E., Roach, P. D., & Scarlett, C. J. (2015). Phytochemical properties and anti-proliferative activity of *olea europaea* L. leaf extracts against pancreatic cancer cells. *Molecules* (Basel, Switzerland), 20(7), 12992–13004. <https://doi.org/10.3390/molecules200712992>
- Imran, M., Nadeem, M., Gilani, S. A., Khan, S., Sajid, M. W., & Amir, R. M. (2018). Antitumor perspectives of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol: Recent updates. *Journal of Food Science*, 83(7), 1781–1791. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14198>
- Marchetti, C., Clericuzio, M., Borghesi, B., Cornara, L., Ribulla, S., Gosetti, F., . . . Burlando, B. (2015). Oleuropein-enriched olive leaf extract affects calcium dynamics and impairs viability of malignant mesothelioma cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2015, 908493. <https://doi.org/10.1155/2015/908493>
- Moran, J. M., Leal-Hernandez, O., Canal-Macias, M. L., Roncero-Martin, R., Guerrero-Bonmatty, R., Aliaga, I., & Zamorano, J. D. (2016). Antiproliferative properties of oleuropein in human osteosarcoma cells. *Natural Product Communications*, 11(4), 491–492.

Secme, M., Eroglu, C., Dodurga, Y., & Bagci, G. (2016). Investigation of anticancer mechanism of oleuropein via cell cycle and apoptotic pathways in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Gene*, 585(1), 93–99. [https://doi.org/S0378-1119\(16\)30208-6](https://doi.org/S0378-1119(16)30208-6)

Shamshoum, H., Vlavcheski, F., & Tsiani, E. (2017). Anticancer effects of oleuropein. *BioFactors* (Oxford, England), 43(4), 517–528. <https://doi.org/10.1002/biof.1366>

**Capítulo VI. APOPTOSIS INDEPENDIENTE
DE P-53 EN CÉLULAS HUMANAS DE
OSTEOSARCOMA TRAS LA EXPOSICIÓN A
OLEUROPEÍNA**

Capítulo VI. APOPTOSIS INDEPENDIENTE DE P-53 EN CÉLULAS HUMANAS DE OSTEOSARCOMA TRAS LA EXPOSICIÓN A OLEUROPEÍNA.

VI. 1. Introducción.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Los productos naturales se han identificado como fuentes esenciales de futuros agentes quimioterapéuticos. La dieta típica mediterránea se describe mediante una alta ingesta dietética de alimentos de origen vegetal, incluido el uso frecuente de aceitunas (*Olea europaea*) y sus derivados (1).

La dieta mediterránea es abundante en componentes bioactivos (vitaminas, flavonoides y polifenoles), lo que se ha sugerido como un factor que contribuye a la baja frecuencia de cáncer en la región mediterránea en comparación con la frecuencia detectada en otros países (1,2). El aceite de oliva incluye en su composición tres tipos de polifenoles (hidroxitirosol, lignanos y secoiridoides como la oleuropeína), que presentan notables comportamientos antioxidantes (1,3). Se han estudiado en gran medida las características antioxidantes y antiproliferativas de estos polifenoles, con varios informes que muestran que el aceite de oliva es más útil contra el cáncer que otros tipos de lípidos suplementarios (3).

La oleuropeína es el elemento fenólico más común en las aceitunas (1,4). Aunque se ha demostrado que la oleuropeína tiene propiedades relacionadas con la creación y conservación de los huesos y, en consecuencia, mejora las condiciones relacionadas con los huesos como la osteoporosis (5), no hay pruebas suficientes (6) sobre la función de la oleuropeína en otras condiciones, como el osteosarcoma. Aunque se han descrito previamente efectos citotóxicos de la oleuropeína en células humanas de osteosarcoma (6), los mecanismos que regulan estos procesos no se han estudiado hasta ahora. El tratamiento con oleuropeína de diferentes modelos celulares de cáncer in vitro condujo a la activación de la vía apoptótica, lo que se demostró mediante una elevada proporción de Bax/Bcl-2 y de la actividad de caspasa-3 (7).

Las propiedades anticancerígenas de la oleuropeína también se han relacionado con la expresión elevada de la proteína p-53 en células de cáncer de mama (8,9), células de cáncer de colon (10) y células de neuroblastoma humano (11). En general, se ha sugerido que la oleuropeína influye en las moléculas clave de señalización implicadas en la proliferación y supervivencia de células cancerosas y, por esa razón, podría utilizarse como un agente para atacar específicamente estas moléculas de señalización (7).

VI. 2. Objetivo.

Este estudio se implementó para evaluar las propiedades anticancerígenas de la oleuropeína y para investigar adicionalmente la expresión génica relacionada con la apoptosis, como un mecanismo subyacente de regulación de la citotoxicidad inducida por oleuropeína en células humanas de osteosarcoma carentes de p-53.

VI. 3. Método.

Línea celular: La línea celular MG-63 (osteosarcoma humano) se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Las células MG-63 se cultivaron en EMEM (EBSS) suplementadas con 10 % de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor, penicilina (10 U/ml), estreptomycin (10 µg/ml), glutamina 2 mM y 1 % de aminoácidos no esenciales (NEAA). Los cultivos fueron incubados en presencia de un 5 % de CO₂ a 37 °C y un 95 % de humedad relativa. Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad de 1 x 10⁴ células/pocillo e incubadas durante 24 h a 37 °C en 5 % de CO₂. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de oleuropeína (100, 200 µM) durante 24 y 48 h. Las células cancerosas no tratadas se utilizaron como controles negativos.

Reactivos: La oleuropeína fue comprada a Sigma-Aldrich (98 % de oleuropeína) (St. Louis, MO, USA).

Ensayo de viabilidad: Después del tiempo/dosis de exposición a la oleuropeína (100 y 200 μ M durante 24 o 48 h) seleccionada en consecuencia a los resultados anteriores de nuestro grupo (6), se añadieron 100 μ l de reactivo MTT a cada pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂ durante 4 h. Luego, se añadieron 100 μ l de la solución de solubilización a cada pocillo, seguido de la incubación durante 1 h a 37 °C para disolver los cristales de formazán. Finalmente, se leyó la absorbancia utilizando un lector de placas ELISA a una longitud de onda de 570 nm. El porcentaje de citotoxicidad y viabilidad celular se calculó utilizando la siguiente ecuación: % de citotoxicidad = 1 - (absorción media de las células tratadas / absorción media del control negativo) y % viabilidad = 100 - % citotoxicidad.

PCR cuantitativa en tiempo real: El RNA total se extrajo utilizando el reactivo TRIzol (Sigma, St. Louis, MO, USA). El cDNA fue sintetizado por KiCqStart One-Step Probe RT-qPCR ReadyMix (Sigma, St. Louis, MO, USA). La PCR cuantitativa se realizó utilizando el ensayo de expresión génica TaqMan (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) en un sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus (Thermo Fisher Scientific). Las reacciones se realizaron en un volumen de 10 μ l que contenía 1 μ l de cDNA diluido, 20X TaqMan Gene Expression Assay Mix y 2X TaqMan Universal PCR Master Mix. Las mezclas de ensayos de expresión génica de TaqMan se utilizaron para detectar Bax, Bcl-2 y p-53, mientras que el GAPDH humano se midió como un control de contaminación. La expresión génica relativa se calculó restando el valor Ct de Bax, Bcl-2 o p-53 (genes de interés) del gen GAPDH (control) por el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (12). Cada PCR cuantitativa se realizó por triplicado y se repitió de forma independiente tres veces.

Ensayo colorimétrico caspasa-3: La actividad de caspasa-3 se midió con un kit de ensayo colorimétrico (Sigma, St. Louis, MO, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico: El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software SPSS 20.0 para Windows (SPSS, Inc. Chicago, IL, USA). Los datos se expresan como la media \pm SE. Las diferencias se probaron con la prueba U de Mann-Whitney. Los valores de P inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

VI. 4. Resultados.

Para determinar los efectos de la citotoxicidad inducida por oleuropeína en las células MG-63, las células humanas de osteosarcoma se trataron con 100 μ M y 200 μ M de oleuropeína durante 24 y 48 horas. Como se muestra en la Figura 4, la oleuropeína inhibió la proliferación de células MG-63 de una manera dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.

Los resultados del ensayo de actividad de la caspasa-3 se muestran en la Figura 5. La actividad de las caspasas fue significativamente mayor en las células expuestas a la oleuropeína (200 μ M) en comparación con la de las células de control ($P < 0.05$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas después de una exposición de 100 μ M durante 24 horas.

La proporción entre la proteína pro-apoptótica Bax y la proteína antiapoptótica Bcl-2 desempeña un papel decisivo en la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis. La expresión del mRNA de Bax se incrementó significativamente en las células tratadas con oleuropeína (200 μ M) en comparación con la de las células no expuestas, mientras que la expresión del mRNA de Bcl-2 disminuyó en las células tratadas con oleuropeína (200 μ M) en comparación con las células de control ($P < 0.05$) (Figura 6). Como era de esperar, después de 24 o 48 h de cultivo, no se detectó ninguna señal de expresión del mRNA p-53 en las células MG-63 (datos no mostrados). Estos resultados demostraron además que la oleuropeína tiene el potencial de inducir la muerte celular compatible con la apoptosis en células MG-63 por un mecanismo independiente de p-53.

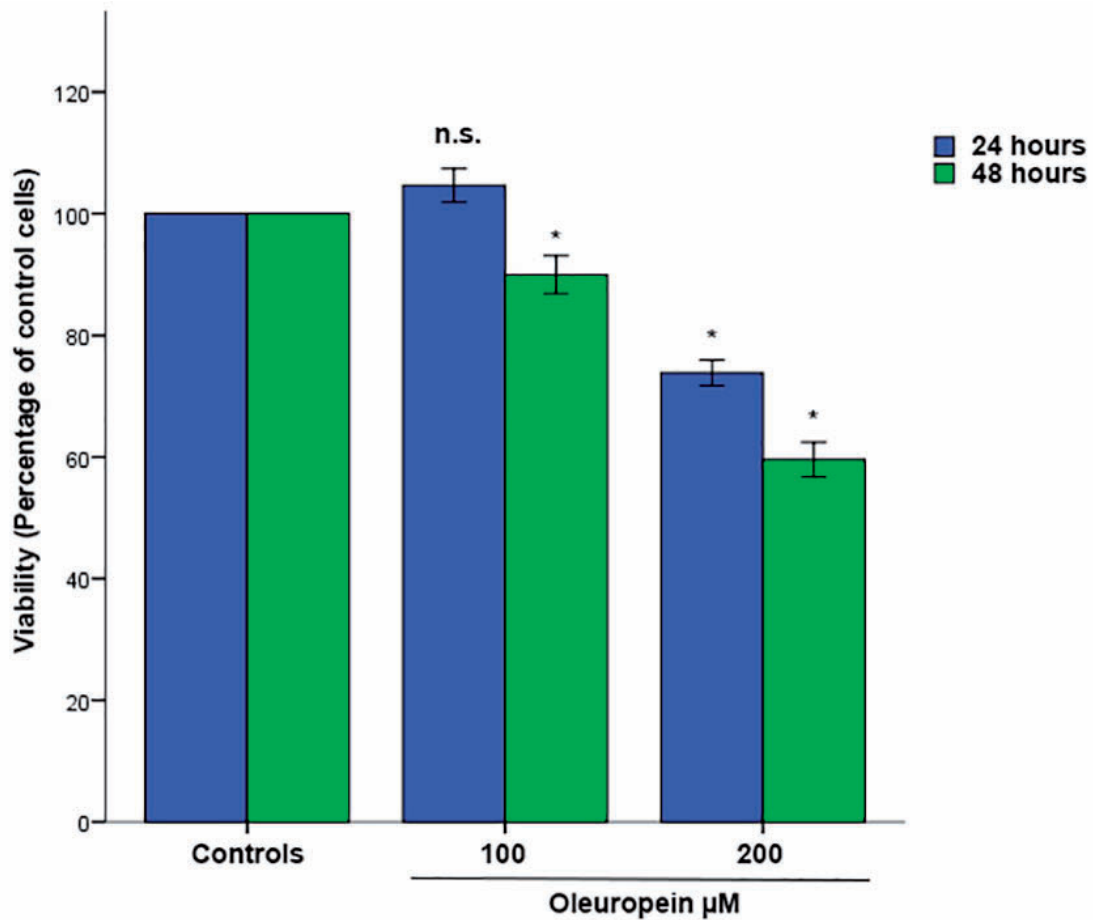


Figura 4. Ensayo MTT para la viabilidad celular de células MG-63 cultivadas durante 24 y 48 horas en presencia de oleuropeína. Mediciones representativas de tres conjuntos distintos de datos: n.s. no significativo, * ($p < 0.05$). Las barras de error representan la SD.

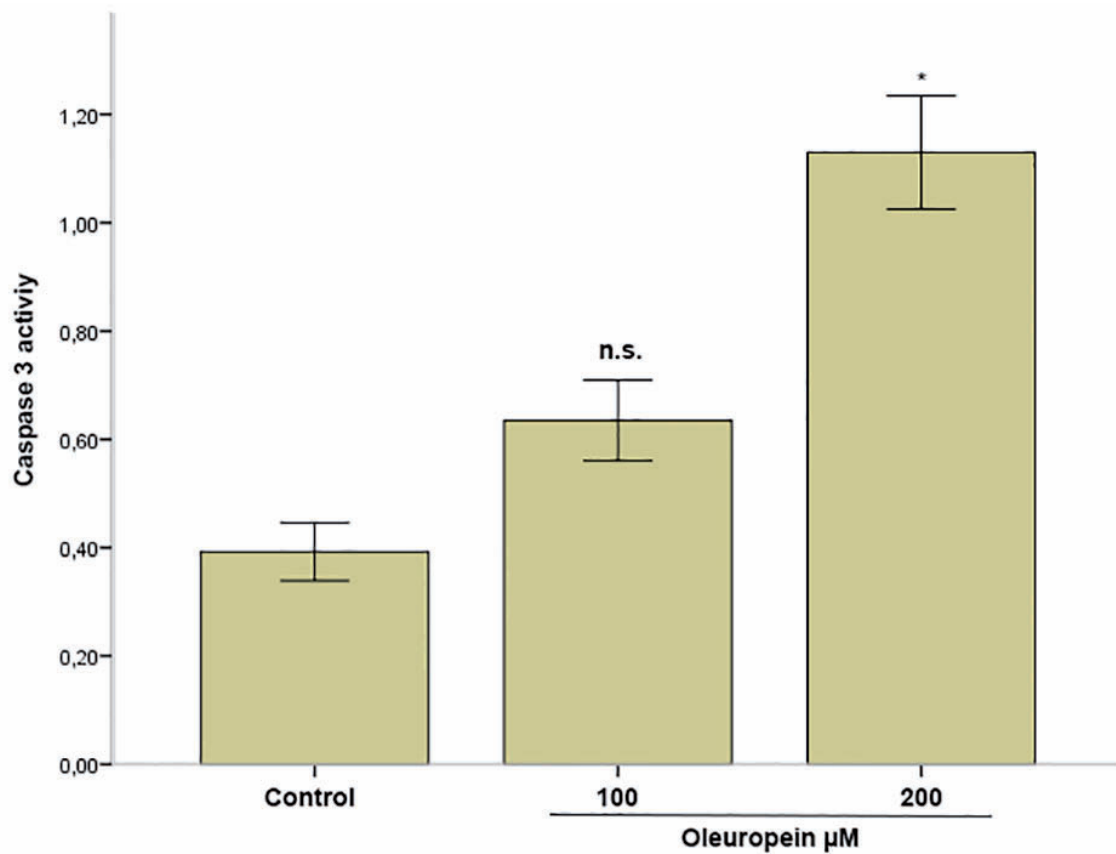


Figura 5. Actividad de caspasa-3 detectada mediante ensayo colorimétrico. Los datos presentados se calcularon a partir de tres experimentos independientes. Los datos presentados son medias \pm SD, n.s. no significativa frente al control, * $p < 0.05$ frente al control.

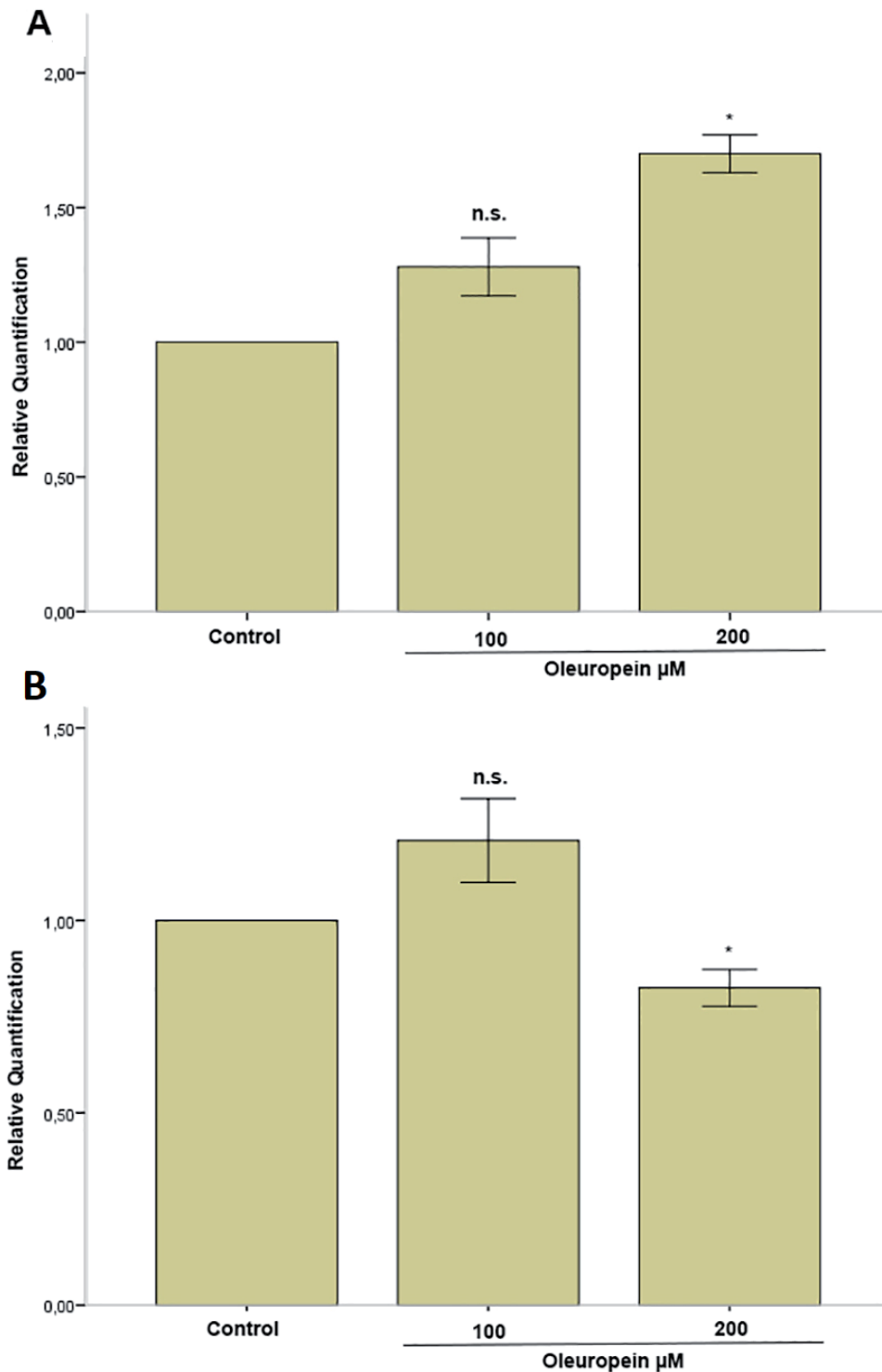


Figura 6. Expresiones relativas de los niveles del mRNA de Bax y Bcl-2 en células humanas de osteosarcoma MG-63. (A) Niveles del mRNA de Bax. (B) Niveles del mRNA de Bcl-2. Las expresiones relativas de mRNA se determinaron mediante la cuantificación relativa de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Los niveles de RNA (normalizados a los niveles de RNA de GAPDH) se representaron como un aumento o disminución de la expresión en relación con los niveles del control. Los datos se expresan como medias \pm desviaciones estándar de tres experimentos independientes, n.s. no significativo frente a control, * $p < 0.05$ vs. control.

VI. 5. Referencias.

- (1) Elamin M.H, M.H. Daghestani, S.A. Omer, M.A. Elobeid, P. Virk, E.M. Al-Olayan, *et al.* (2013) *Food Chem. Toxicol.* 53:310-316.
- (2) Trichopoulou A., P. Lagiou, H. Kuper & D Trichopoulos (2000) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9(9):869-873.
- (3) Owen R.W., Giacosa A., Hull W.E., Haubner R., Spiegelhalter B. *et al.* (2000) *Eur. J. Cancer* 36(10):1235-1247.
- (4) Han J., T.P. Talorete, P. Yamada & H. Isoda (2009) *Cytotechnology* 59(1):45-53.
- (5) Hagiwara K., T. Goto, M. Araki, H. Miyazaki & H. Hagiwara (2011) *Eur. J Pharmacol* 15:78-84.
- (6) Moran J.M., O. Leal-Hernandez, M.L. Canal-Macias, R. Roncero-Martin, R. Guerrero-Bonmatty, I. Aliaga *et al.* (2016) *Nat. Prod. Commun.* 11(4):491-492.
- (7) Shamsoum H., F. Vlavcheski & E. Tsiani (2017) *Biofactors* 8;43(4):517-528.
- (8) Hassan Z.K., M.H. Elamin, S.A. Omer, M.H. Daghestani, E.S. Al-Olayan, M.A. Elobeid *et al.* (2014) *Asian Pac. J. Cancer. Prev.* 14(11):6739-6742.
- (9) Chimento A., Casaburi I., Rosano C., Avena P., De Luca A., Campana C., *et al.* (2014) *Mol. Nutr. Food Res.* 58(3):478-489.
- (10) Cardeno A., M. Sanchez-Hidalgo & C. Alarcon-de-la-Lastra. (2013) *Curr. Med. Chem.* 20(37):4758-4776.
- (11) Secme M., C. Eroglu, Y Dodurga. & G. Bagci. (2016) *Gene* 1;585(1):93-99.
- (12) Livak K.J. & T.D. (2001) *Methods* 25:402-408.

Capítulo VII. RESULTADOS

Capítulo VII. RESULTADOS.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

VII. 1. Publicación Nº 1.

“Antiproliferative Properties of Oleuropein in Human Osteosarcoma Cells”

VII. 1. 1. Presentación de la publicación.

· **Título:** Antiproliferative Properties of Oleuropein in Human Osteosarcoma Cells.

· **Autores:** José M. Morán, **Olga Leal-Hernández**, María L. Canal-Macías, Raúl Roncero-Martín, Rafael Guerrero-Bonmatty, Ignacio Aliaga and Juan D. Pedrera Zamorano.

· **Filiación:** Grupo de Investigación en Enfermedades Metabólicas Óseas, Departamento de Enfermería, Universidad de Extremadura, Cáceres, España.

· **Revista:** Natural Product Communications (NPC).

· **Volumen:** 11 **Número:** 4 **DOI:** 10.1177/1934578X1601100418

· **Año de publicación:** 2016

VII. 1. 2. Informe.

El trabajo titulado “Antiproliferative Properties of Oleuropein in Human Osteosarcoma Cells” se publicó en la revista Natural Product Communications. Dicha publicación, se encuentra indexada en numerosas bases de datos de referencia de entre las que destacamos:

- CAB International (CABI)
- Chemical Abstracts Service (CAS)
- Clarivate Analytics: Science Citation Index Expanded (SCIE)
- Embase
- Scopus
- Journal Citation Reports / Science Edition (Clarivate Analytics, formerly Thomson).

Respecto del **Journal Citation Reports**, los últimos datos publicados indican que la revista ocupa la posición 98 de 130 revistas en el área de Alimentación, Ciencia y Tecnología equivalente a un 4º Cuartil (Q4). El índice de impacto de la revista en el área es de 0.773. Durante los últimos 5 años la revista ha mantenido una posición Q3-Q4 dentro del área. El índice de impacto a 5 años de la revista es de 0.881.

Contribución de la doctoranda

La doctoranda ha participado activamente en el diseño del estudio, la adquisición y procesamiento de los datos, en el análisis de los mismos y la redacción del artículo.

La doctoranda ocupa la primera posición en el orden de los autores compartida con el Dr. José M. Morán.

Contribución de los co-autores

José M. Morán y Juan D. Pedrera-Zamorano contribuyeron al diseño del estudio.

María L. Canal-Macías y Raúl Roncero-Martín contribuyeron a la adquisición y procesamiento de los datos.

Rafael Guerrero-Bonmatty, Ignacio Aliaga y José M. Morán participaron en el análisis de los datos.

José M. Morán escribió el manuscrito.

Todos los co-autores han leído y comentado activamente el manuscrito y aprobaron la versión final del mismo.

Fdo. El Director de la Tesis

Dr. José M. Morán García.

VII. 1. 3. Resumen en castellano.

En este estudio se evaluó la actividad antiproliferativa, en dos líneas celulares humanas de osteosarcoma (MG-63 y Saos-2), de oleuropeína, un compuesto de aceite de oliva encontrado tradicionalmente en la dieta mediterránea. La oleuropeína muestra evidentes efectos citotóxicos en células humanas de osteosarcoma de una manera dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.

El análisis estadístico de IC50 por el método de regresión Probit sugirió que la oleuropeína tuvo efectos tóxicos similares en ambas líneas celulares probadas (rango de IC50 247.4-475.0 μ M en células MG-63 y 359.9-798.7 μ M en células Saos-2).

Antiproliferative Properties of Oleuropein in Human Osteosarcoma Cells

Jose M. Moran^{a,b}, Olga Leal-Hernandez^{a,b}, Maria L. Canal-Macías^b, Raul Roncero-Martin^b, Rafael Guerrero-Bonmatty^b, Ignacio Aliaga^b and Juan D. Pedrera Zamorano^{b*}

^aBoth authors contributed equally to this work.

^bMetabolic Bone Diseases Research Group, University of Extremadura, Nursing Department, Caceres, Spain

jpedrera@unex.es

Received: November 29th, 2015; Accepted: February 14th, 2016

In this study, we evaluated the antiproliferative activity on two human osteosarcoma cell lines (MG-63 and Saos2) of oleuropein, an olive oil compound traditionally found in the Mediterranean diet. Oleuropein exhibited obvious cytotoxic effects on human osteosarcoma cells in a concentration- and time-dependent manner. Statistical analysis of IC₅₀ by the Probit regression method suggested that oleuropein had similar toxic effects on both cell lines tested (IC₅₀ range from 247.4-475.0 μM for MG63 cells and from 798.7-359.9 μM for Saos2 cells).

Keywords: Oleuropein, Osteosarcoma, Cytotoxicity, Cell proliferation, Dose-response relationship.

In olive (*Olea europaea* L.) leaves, the main phenolic compound is oleuropein, followed by hydroxytyrosol, the flavone-7-glucosides of luteolin and apigenin, and verbascoside [1a]. Antioxidative and antiproliferative properties of these compounds have been studied extensively, with a number of studies reporting that olive oil is more effective against cancer than other forms of added lipids [1b,c]. Olive oil intake has been shown to inversely correlate with the risk of breast cancer in humans [1d] and to reduce significantly pre-cancerous lesions in colorectal cancer *in vitro* [2,3], prostate cancer [4], leukemia [5], pancreatic cancer [6], hepatocellular carcinoma [7], HeLa cells [8a], breast cancer [8b-g], thyroid cancer [9a], urinary bladder carcinoma [8c], erythroleukemia/glioblastoma/melanoma and renal cell adenocarcinoma [9b]. Although oleuropein has also been shown to have critical effects on the formation and maintenance of bones, and hence to remedy effectively bone-related conditions such as osteoporosis [9c], there is a lack of data related to other diseases such as osteosarcoma (OS). In this study, we investigated, for the first time, the antiproliferative effect of oleuropein on two human OS cell lines, MG-63 and Saos2. The effect of oleuropein was tested on two different human OS cell lines, which represent two different signs of osteoblastic maturity [9d].

Oleuropein caused 50% cell death in both human OS cell lines tested (MG-63 and Saos2), with IC₅₀ values of 346.3 and 419.7 μM in MG-63 and Saos2 OS cell lines, respectively, after 48 h of exposure. In this study, oleuropein was shown to have a higher IC₅₀ value that previously calculated in studies in human promyelocytic leukemia cells HL60 (116.7 μM [10a] and 170 μM [10b]), MCF-7 and MDA-MB-231 cells 110 and 160 μM, respectively [8c]. The dose of oleuropein used in our study was also higher than that previously described for HeLa human cervical carcinoma cells (200 μM) [8a], thyroid cancer cells (100 μM) [9a], and MDA-MB-231, MCF-10A and STO cells (25-75 μM), but similar to the dose used in cancer colon cells after 48 h treatment (400 μM) [2], and prostate cancer cells after 72 h treatment (100-500 μM) [4]. The effect of oleuropein on cancer cells was extensively studied by Kikuchi and colleagues [10c], who tested its cytotoxicity against a panel of 39 human cancer cell lines, none of which represented bone cancers. The study against breast, central nervous system, colon, lung, melanoma, ovary, renal, stomach and prostate cancers showed a

Table 1: The *in vitro* antiproliferative effect of oleuropein against human osteosarcoma cells.

Exposure	Oleuropein (μM)	Viability (Mean±SD)	p Value vs control cells	p Value vs MG-63 cells	
MG-63 cells	24 h	50	107.5±6.2	0.707	
		100	114.3±2.8	0.147	
		200	72.2±11.6	0.002	
		400	60.5±8.8	<0.0001	
	48 h	50	95.7±2.7	0.953	
		100	89.3±13.2	0.426	
		200	65.7±6.6	<0.0001	
		400	43.4±7.5	<0.0001	
	72 h	50	107.3±10.9	0.934	
		100	71.9±14.4	0.145	
		200	60.7±5.0	0.046	
		400	42.9±1.4	0.01	
Saos2 cells	24 h	50	90.4±10.1	0.593	0.056
		100	87.3±5.8	0.377	0.001
		200	78.7±3.9	0.090	0.504
		400	68.0±1.2	0.019	0.323
	48 h	50	99.5±3.8	0.998	0.184
		100	71.3±5.3	<0.0001	0.080
		200	58.1±3.2	<0.0001	0.128
		400	59.3±4.9	<0.0001	0.025
	72 h	50	109.0±9.5	0.720	0.884
		100	86.7±4.8	0.426	0.304
		200	53.3±7.8	0.006	0.374
		400	45.7±4.1	0.003	0.454

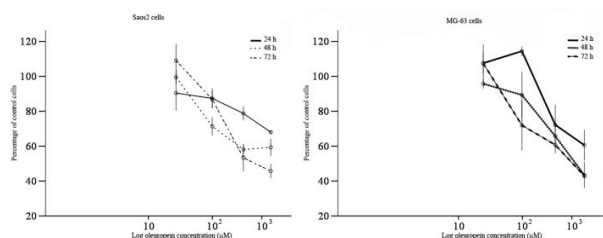


Figure 1: Antiproliferative effects of oleuropein on osteosarcoma cell lines. Plots show dose response curves for oleuropein tested by the MTT assay after 24, 48 and 72 h of exposure. Values are means ± SD.

mean concentration of 96 μM oleuropein for inhibition of cell growth at 50% relative to control after 48 h exposure [10c]. Our results hence confirm that the cytotoxicity of oleuropein on cancer cells depends on the oleuropein concentration as well as the

duration of exposure. In addition, the finding that the cytotoxicity differs between cell lines suggests that different molecular mechanisms may mediate the effects of oleuropein.

Experimental

General: Oleuropein was purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). MG-63 and Saos2 (human OS) cell lines were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). MG-63 cells were grown in EMEM (EBSS) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin (10 U/mL), streptomycin (10 µg/mL), 2 mM glutamine and 1% non-essential amino acids (NEAA). Saos2 cells were grown in McCoy's 5a supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin (10 U/mL), streptomycin (10 µg/mL) and 2 mM glutamine. Cultures were incubated in the presence of 5% CO₂ at 37°C and 95% relative humidity.

Cytotoxicity assay: The cells were seeded in 24-well plates with a density of 1×10⁴ cells/well and incubated for 24 h at 37°C in 5% CO₂. The cells were treated with different concentrations of oleuropein (50, 100, 200, 400 µM). Untreated cancer cells were used as negative controls. After 24, 48 and 72 h of treatment, 100

µL of MTT reagent was added to each well. The plates were incubated at 37°C in 5% CO₂ for 4 h. Then, 100 µL of the solubilization solution was added to each well, followed by incubation for 1 h at 37°C to dissolve formazan crystals. Finally, absorbance was read using an ELISA plate reader at a wavelength of 570 nm. The percentage of cytotoxicity and cell viability were calculated using the following equation: % Cytotoxicity=1-(mean absorbance of treated cells/mean absorbance of negative control) and % viability=100-% Cytotoxicity.

IC₅₀ determinations: Probit analysis was used to determine the concentration at which lethality to oleuropein was 50% (IC₅₀) by the use of a maximum likelihood regression algorithm. The cytotoxicity values of IC₁₀ and IC₉₀ were also determined.

Statistical analysis: All the data in this study represent mean ± SD of 3 replicates of identical experiments. Normality of the data was determined by the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical significance was determined by ANOVA followed by Bonferroni's test, and a P-value ≤0.05 was considered statistically significant. Data were plotted as percentages of control vs. logarithmic chemical concentration in µM.

References

[1] (a) Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V. (2006) The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **17**, 429-445; (b) Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Wurtele G, Spiegelhalter B, Bartsch H. (2000) Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncology*, **1**, 107-112; (c) Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalter B, Bartsch H. (2000) The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, **36**, 1235-1247; (d) Martin-Moreno JM, Willett WC, Gorgojo L, Banegas JR, Rodriguez-Artalejo F, Fernandez-Rodriguez JC, Maisonneuve P, Boyle P. (1994) Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk. *International Journal of Cancer*, **58**, 774-780.

[2] Cardeno A, Sanchez-Hidalgo M, Rosillo MA, Alarcon dL. (2013) Oleuropein, a secoiridoid derived from olive tree, inhibits the proliferation of human colorectal cancer cell through downregulation of HIF-1alpha. *Nutrition and Cancer*, **65**, 147-156.

[3] Notarnicola M, Pisanti S, Tutino V, Bocale D, Rotelli MT, Gentile A, Memeo V, Bifulco M, Perri E, Caruso MG. (2011) Effects of olive oil polyphenols on fatty acid synthase gene expression and activity in human colorectal cancer cells. *Genes & Nutrition*, **6**, 63-69.

[4] Acquaviva R, Di GC, Sorrenti V, Galvano F, Santangelo R, Cardile V, Gangia S, D'Orazio N, Abraham NG, Vanella L. (2012) Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *International Journal of Oncology*, **41**, 31-38.

[5] Fabiani R, De BA, Rosignoli P, Servili M, Selvaggini R, Montedoro GF, Di SC, Morozzi G. (2006) Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *Journal of Nutrition*, **136**, 614-619.

[6] Goldsmith CD, Vuong QV, Sadeqzadeh E, Stathopoulos CE, Roach PD, Scarlett CJ. (2015) Phytochemical properties and anti-proliferative activity of *Olea europaea* L. leaf extracts against pancreatic cancer cells. *Molecules*, **20**, 12992-13004.

[7] Yan CM, Chai EQ, Cai HY, Miao GY, Ma W. (2015) Oleuropein induces apoptosis via activation of caspases and suppression of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in HepG2 human hepatoma cell line. *Molecular Medicine Reports*, **11**, 4617-4624.

[8] (a) Yao J, Wu J, Yang X, Yang J, Zhang Y, Du L. (2014) Oleuropein induced apoptosis in HeLa cells via a mitochondrial apoptotic cascade associated with activation of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **125**, 300-311; (b) Chimento A, Casaburi I, Rosano C, Avena P, De LA, Campana C, Martire E, Santolla MF, Maggolini M, Pezzi V, Sirianni R. (2014) Oleuropein and hydroxytyrosol activate GPER/ GPR30-dependent pathways leading to apoptosis of ER-negative SKBR3 breast cancer cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, **58**, 478-489; (c) Goulas V, Exarchou V, Troganis AN, Psomiadou E, Fotsis T, Briassoulis E, Gerothanassis IP. (2009) Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, **53**, 600-608; (d) Hassan ZK, Elamin MH, Omer SA, Daghestani MH, Al-Olayan ES, Elobeid MA, Virk P. (2014) Oleuropein induces apoptosis via the p53 pathway in breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **14**, 6739-6742; (e) Menendez JA, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreras C, Garcia-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. (2008) Analyzing effects of extra-virgin olive oil polyphenols on breast cancer-associated fatty acid synthase protein expression using reverse-phase protein microarrays. *International Journal of Molecular Medicine*, **22**, 433-439; (f) Quirantes-Pine R, Zurek G, Barrajon-Catalan E, Bassmann C, Micol V, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. (2013) A metabolite-profiling approach to assess the uptake and metabolism of phenolic compounds from olive leaves in SKBR3 cells by HPLC-ESI-QTOF-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **72**, 121-126; (g) Sirianni R, Chimento A, De LA, Casaburi I, Rizza P, Onofrio A, Iacopetta D, Puoci F, Ando S, Maggolini M, Pezzi V. (2010) Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Molecular Nutrition & Food Research*, **54**, 833-840.

[9] (a) Bulotta S, Corradino R, Celano M, Maiuolo J, D'Agostino M, Oliverio M, Procopio A, Filetti S, Russo D. (2013) Antioxidant and antigrowth action of peracetylated oleuropein in thyroid cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, **51**, 181-189; (b) Hamdi HK, Castellon R. (2005) Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **334**, 769-778; (c) Hagiwara K, Goto T, Araki M, Miyazaki H, Hagiwara H. (2011) Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *European Journal of Pharmacology*, **662**, 78-84; (d) Pautke C, Schieker M, Tischer T, Kolk A, Neth P, Mutschler W, Milz S. (2004) Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Research*, **24**, 3743-3748.

[10] (a) Pieme C, Santosh G, Tekwu E, Askun T, Aydeniz H, Ngogang J, Bhushan S, Saxena A. (2014) Fruits and barks extracts of *Zanthoxylum heitzii* a spice from Cameroon induce mitochondrial dependent apoptosis and Go/G1 phase arrest in human leukemia HL-60 cells. *Biological Research*, **47**, 54-67; (b) Anter J, Fernandez-Bedmar Z, Villatoro-Pulido M, Demyda-Peyras S, Moreno-Millan M, Alonso-Moraga A, Munoz-Serrano A, Luque de Castro MD. (2011) A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptosis-inducing properties of olive-leaf extracts. *Mutation Research*, **723**, 165-170; (c) Kikuchi M, Mano N, Uehara Y, Machida K, Kikuchi M. (2011) Cytotoxic and EGFR tyrosine kinase inhibitory activities of aglycone derivatives obtained by enzymatic hydrolysis of oleoside-type secoiridoid glucosides, oleuropein and ligustroside. *Journal of Natural Medicines*, **65**, 237-240.

VII. 2. Publicación N° 2.

“Antitumor Perspectives of Oleuropein”

VII. 2. 1. Presentación de la publicación.

- **Título:** Antitumor Perspectives of Oleuropein.

- **Autores:** José M. Morán, **Olga Leal-Hernández**, Raúl Roncero-Martín, Juan D. Pedrera-Zamorano.

- **Filiación:** Grupo de Investigación en Enfermedades Metabólicas Óseas, Departamento de Enfermería, Universidad de Extremadura, Cáceres, España.

- **Revista:** Journal of Food Science

- **Volumen:** 84 **Número:** 3 **DOI:** 10.1111/1750-3841.14495.

- **Año de publicación:** 2019

VII. 2. 2. Informe.

La carta al editor titulada “Antitumor Perspectives of Oleuropein” se publicó en la revista Journal of Food Science. Dicha publicación se encuentra indexada en numerosas bases de datos de referencia de entre las que destacamos:

- Journal Citation Reports/Science Edition (Clarivate Analytics)
- MEDLINE/PubMed (NLM)
- Natural Science Collection (ProQuest)
- PubMed Dietary Supplement Subset (NLM)
- Research Library (ProQuest)
- Research Library Prep (ProQuest)
- Science Citation Index (Clarivate Analytics)
- Science Citation Index Expanded (Clarivate Analytics)
- SciTech Premium Collection (ProQuest)
- SCOPUS (Elsevier)

Respecto del **Journal Citation Reports**, los últimos datos publicados indican que la revista ocupa la posición 56 de 135 revistas en el área de Alimentación, Ciencia y Tecnología equivalente a un 2º Cuartil (Q2). El índice de impacto de la revista en el área es de 2.081. Durante los últimos 5 años la revista ha mantenido una posición Q2 dentro del área. El índice de impacto a 5 años de la revista es de 2.416.

Contribución de la doctoranda:

La doctoranda ha participado activamente en la concepción y elaboración del manuscrito.

Contribución de los co-autores

José M. Morán, Raúl Roncero-Martín y Juan D. Pedrera-Zamorano contribuyeron a la concepción y elaboración del manuscrito.

Todos los co-autores han leído y comentado activamente la carta al editor y aprobaron la versión final de la misma.

Fdo. El Director de la Tesis

Dr. José M. Morán García.

VII. 2. 3. Resumen en castellano.

Leímos con interés la revisión de Imran y colaboradores (2018) sobre las perspectivas antitumorales de la oleuropeína y su metabolito hidroxitirosol. Las conclusiones de su manuscrito afirman que la oleuropeína y el hidroxitirosol muestran actividad antitumoral basada en experimentos in vivo e in vitro sobre diferentes tipos de cáncer.

En este trabajo se señala que nuestro grupo también había publicado resultados sobre los efectos antitumorales de la oleuropeína en células humanas de osteosarcoma (Moran et al., 2016), no incluidos en los tipos de cáncer analizados.

La revisión publicada anteriormente de Shamshoum y colaboradores (2017) ya informaron de estos hallazgos en las células humanas de osteosarcoma, así como de otros tipos de cáncer no incluidos en el reciente estudio de Imran y colaboradores (2018).

La razón detrás de los criterios de exclusión no se discutió en su artículo, pero los autores declararon que su objetivo principal era describir las perspectivas y mecanismos anticancerígeno de oleuropeína e hidroxitirosol en cultivos celulares y estudios en animales y humanos, por lo que creemos que esos estudios deberían incluirse en la revisión.

Sin embargo, es intrigante que la revisión de Shamshoum, Vlavcheski y Tsiani (2017), publicada un año antes, no fuera citada por el estudio de Imran y colaboradores, ya que el conjunto de conocimientos se superpuso básicamente entre las dos revisiones.

Antitumor Perspectives of Oleuropein

We read with interest the review from Imran and colleagues (2018) about the antitumor perspectives of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol, published in the *Journal of Food Science* in the June 2018 issue. The conclusions of their manuscript state that oleuropein and hydroxytyrosol are excellent candidates due to their antitumoral activity based on *in vivo* and *in vitro* experiments concerning colorectal, breast, skin, prostate, lung, cervical, thyroid, hepatic, bladder, blood, gastric, and brain cancer. We congratulate Imran and colleagues for such an extensive search of the literature published recently about the antitumoral effects of oleuropein. Additionally, we would like to add that our group have also published results about the antitumoral effects of oleuropein in human osteosarcoma cells (Moran et al., 2016) showing that oleuropein had obvious cytotoxic effects on human osteosarcoma cells in a concentration- and time-dependent manner, with similar toxic effects on both cell lines tested (IC50 range from 247.4–475.0 μM for MG63 cells and from 359.9–798.7 μM for Saos2 cells). The previously published review of Shamshoum and colleagues (2017) already reported those findings in human osteosarcoma cells as well as others not included in the recent study of Imran and colleagues (2018) (mesothelioma (Marchetti et al., 2015), pancreatic (Goldsmith et al., 2015) and neuroblastoma (Secme, Eroglu, Dodurga, & Bagci, 2016)). The rationale behind the exclusion criteria was not discussed in their article, but the authors stated that their primary aim was to describe anticancer perspectives and mechanisms of oleuropein and hydroxytyrosol in cell cultures and animal and human studies, so we think that those studies should be included in the review. Nevertheless, it is intriguing why the review from Shamshoum, Vlacheski, and Tsiani (2017), published one year before, was not cited by the study of Imran and colleagues, as the body of knowledge was basically overlapped between the two revisions.

Sincerely,

Jose M. Moran, Olga Leal-Hernandez, Raul Roncero-Martin,
and Juan D. Pedrera-Zamorano
Metabolic Bone Diseases Research Group, Univ. of Extremadura,
Nursing and Occupational Therapy College, Cáceres, Spain

References

- Goldsmith, C. D., Vuong, Q. V., Sadeqzadeh, E., Stathopoulos, C. E., Roach, P. D., & Scarlett, C. J. (2015). Phytochemical properties and anti-proliferative activity of olea europaea L. leaf extracts against pancreatic cancer cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(7), 12992–13004. <https://doi.org/10.3390/molecules200712992>
- Imran, M., Nadeem, M., Gilani, S. A., Khan, S., Sajid, M. W., & Amir, R. M. (2018). Antitumor perspectives of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol: Recent updates. *Journal of Food Science*, 83(7), 1781–1791. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14198>
- Marchetti, C., Clericuzio, M., Borghesi, B., Cornara, L., Ribulla, S., Gosetti, F., . . . Burlando, B. (2015). Oleuropein-enriched olive leaf extract affects calcium dynamics and impairs viability of malignant mesothelioma cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2015, 908493. <https://doi.org/10.1155/2015/908493>
- Moran, J. M., Leal-Hernandez, O., Canal-Macias, M. L., Roncero-Martin, R., Guerrero-Bonmatty, R., Aliaga, I., & Zamorano, J. D. (2016). Antiproliferative properties of oleuropein in human osteosarcoma cells. *Natural Product Communications*, 11(4), 491–492.
- Secme, M., Eroglu, C., Dodurga, Y., & Bagci, G. (2016). Investigation of anticancer mechanism of oleuropein via cell cycle and apoptotic pathways in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Gene*, 585(1), 93–99. [https://doi.org/S0378-1119\(16\)30208-6](https://doi.org/S0378-1119(16)30208-6)
- Shamshoum, H., Vlacheski, F., & Tsiani, E. (2017). Anticancer effects of oleuropein. *BioFactors (Oxford, England)*, 43(4), 517–528. <https://doi.org/10.1002/biof.1366>

Response from the Authors

We are very thankful to Moran and others for deep analysis of our review paper. His concern about noninclusion of his research work is definitely his right. I want to clarify that answer of this concern is the title of our review paper “Antitumor Perspectives of Oleuropein and Its Metabolite Hydroxytyrosol: Recent Updates”. It indicates directions of the authors and their analysis is about antitumor prospective only. The reference for his study was not included as there is need of more work on the cytotoxic effect. Moreover, our focus to antitumor perspectives rather than cytotoxic effect. We are comprising a new study that will compare both cytotoxic and therapeutic, will contain all relevant study.

Sincerely,

Muhammad Wasim Sajid
Dept. of BioSciences, COMSATS Institute of Information
Technology

VII. 3. Publicación N° 3.

“P-53-independent apoptosis of human osteosarcoma cells after exposure to oleuropein”

VII. 3. 1. Presentación de la publicación.

· **Título:** P-53-independent apoptosis of human osteosarcoma cells after exposure to oleuropein.

· **Autores:** Olga Leal-Hernández, Raúl Roncero-Martín, Ignacio Aliaga, María Pedrera-Canal, José M. Morán, Sergio Rico, Luis M. Puerto Parejo, Jesús M. Lavado-García.

· **Filiación:** Grupo de Investigación en Enfermedades Metabólicas Óseas, Departamento de Enfermería, Universidad de Extremadura, Cáceres, España.

· **Revista:** Latin American Journal of Pharmacy

In press.

VII. 3. 2. Informe.

El trabajo titulado “P-53-independent apoptosis of human osteosarcoma cells after exposure to oleuropein” se publicó en la revista Latin American Journal of Pharmacy. Dicha publicación se encuentra indexada en numerosas bases de datos de referencia de entre las que destacamos:

- BioScience Information Service (Biological Abstracts)
- Chemical Abstracts Service
- EMBASE (Elsevier)
- International Pharmaceutical Abstracts Service
- International Pharmaceutical Technology & Product Manufacture Abstracts, Referativnyi Zhurnal (Institut of Scientific Information, Russian Academy of Sciences)
- Journal Citation Reports/Science Edition (Clarivate Analytics)
- LATINDEX
- LILACS (Latin American and Caribbean Health Sciences Literature)
- Periodica (Index of Latin American Scientific Journals)

Respecto del **Journal Citation Reports**, los últimos datos publicados indican que la revista ocupa la posición 263 de 267 revistas en el área de Farmacología y Farmacia equivalente a un 4º Cuartil (Q4). El índice de impacto de la revista en el área es de 0.290. Durante los últimos 5 años la revista ha mantenido una posición Q4 dentro del área. El índice de impacto a 5 años de la revista es de 0.287.

Contribución de la doctoranda:

La doctoranda ha participado activamente en el diseño del estudio, la adquisición y procesamiento de los datos, en el análisis de los mismos y en la redacción del manuscrito.

La doctoranda ocupa la primera posición en el orden de los autores compartida con el Dr. Raúl Roncero-Martín.

Contribución de los co-autores

José M. Morán y Raúl Roncero-Martín contribuyeron al diseño del estudio.

Ignacio Aliaga, Luis M. Puerto Parejo y María Pedrera-Canal contribuyeron a la adquisición y procesamiento de los datos.

Sergio Rico, Jesús M. Lavado-García, y José M. Morán participaron en el análisis de los datos.

José M. Morán escribió el manuscrito.

Todos los co-autores han leído y comentado activamente el manuscrito y aprobaron la versión final del mismo.

Fdo. El Director de la Tesis

Dr. José M. Morán García.

VII. 3. 3. Resumen en castellano.

El osteosarcoma es uno de los tumores óseos primarios malignos más recurrentes. Las células humanas de osteosarcoma MG-63 carentes de p-53, fueron expuestas a la oleuropeína, un compuesto del aceite de oliva comúnmente encontrado en la dieta mediterránea. La actividad de caspasa-3 se midió mediante un ensayo colorimétrico.

Además, la expresión del mRNA de Bax, Bcl-2 y p-53 fue determinada por PCR en tiempo real después de 24 horas de exposición. Tanto la relación entre la expresión del mRNA de Bax/Bcl-2 como la actividad de la caspasa-3 aumentaron en las células expuestas a la oleuropeína en comparación con las del control no expuesto ($P < 0.05$). Como se esperaba, no se detectó ningún mRNA de p-53 en las células MG-63.

Aunque con frecuencia se observa un fallo en la función p-53 en pacientes con osteosarcoma, nuestros resultados muestran que la oleuropeína induce apoptosis independiente de p-53 en células humanas de osteosarcoma MG-63.

VII. 3. 4. Copia de la publicación (In press).

De: **Latin American Journal of Pharmacy** <info@latamjpharm.org>
Date: dom., 22 dic. 2019 11:18
Subject: Answer to the Presentation of Manuscript
To: Jose M. Moran <jmmorang@unex.es>, Jose M. Moran <jmmorang@unex.es>

December 22nd, 2019

Jose M. Moran
University of Extremadura (jmmorang@unex.es)

Manuscript Identification Number: LAJP 6468-19

Dear author:

I am glad to inform you that your article '**P-53-independent apoptosis of human osteosarcoma cells after exposure to oleuropein.**' by *Olga Leal-Hernández, Raúl Roncero-Martín, Ignacio Aliaga, María Pedrera-Canal, Jose M. Moran, Sergio Rico, Luis M. Puerto Parejo, Jesus M. Lavado-García* has been accepted for publication in Latin American Journal of Pharmacy. In due moment you will receive the page proof consigning the issue where your article will be included.

Many thanks for your interest in our journal.

Reviewer's comments:

"P-53-Independent Apoptosis of Human Osteosarcoma Cells After Exposure to Oleuropein" by Olga Leal-Hernández, Raúl Roncero-Martín, Ignacio Aliaga, María Pedrera-Canal, Jose M. Morán, Sergio Rico, Luis M. Puerto Parejo & Jesús M. Lavado-García, is a very good contribution where p-53-null MG-63 human osteosarcoma cells were exposed to oleuropein, observed that oleuropein induces p-53-independent apoptosis in MG-63 human osteosarcoma cells. The objective falls within the scope of the journal and can be accepted as it is.

Yours sincerely,

Prof. Néstor O. Caffini, Editor
Latin American Journal of Pharmacy
E-mail: caffini@biol.unlp.edu.ar

Capítulo VIII. DISCUSIÓN INTEGRADORA

Capítulo VIII. DISCUSIÓN INTEGRADORA.

VIII. 1. Discusión sobre la citotoxicidad de la oleuropeína en cultivos celulares de osteosarcoma.

Con respecto a la metodología utilizada para realizar los cultivos celulares para los posteriores experimentos en la línea celular MG-63, se ha encontrado correspondencia, entre otros, con el estudio de García-Martínez (García-Martínez et al., 2014) en el que además de utilizar la misma línea celular, estudia cómo intervienen los diferentes componentes fenólicos del aceite de oliva virgen en la proliferación celular. Sus resultados, sin embargo, no son comparables al no realizar estudios individuales con oleuropeína.

Uno de los principales factores de riesgo para la aparición de diferentes patologías como el cáncer, es el aumento de la esperanza de vida. Con el objetivo de buscar un envejecimiento saludable y debido a la alta asociación de este aspecto con la dieta mediterránea, existe una revisión que analiza la ingesta de aceite de oliva con respecto a diferentes patologías. Pese a que se necesitan más estudios, los resultados obtenidos en los mecanismos moleculares de modelos humanos y animales muestran efectos beneficiosos y de protección por sus propiedades antioxidantes (de Pablos et al., 2019).

La oleuropeína ha sido señalada como la responsable principal de la actividad antitumoral atribuida al aceite de oliva virgen en diferentes líneas celulares estudiadas (Barbaro et al., 2014). Esta propiedad parece ser el resultado del efecto antiproliferativo e inductor de la apoptosis de este polifenol, coincidiendo con los resultados obtenidos en esta tesis.

Una revisión reciente (Celano et al., 2019) apoya dichos resultados en los cuales se estudian diferentes secoiridoides fenólicos de la aceituna, dentro de los que se encuentra la oleuropeína. Aunque no hay evidencia de la acción terapéutica directa en cáncer humano debido a la falta de validación de estudios, las dianas moleculares analizadas sugieren que son un gran potencial

coadyuvante con tratamientos anticancerígenos en los estudios in vitro analizados, dentro de los que se encuentra nuestro resultado en osteosarcoma.

Todos estos mecanismos de actuación sobre el aumento de la apoptosis y la disminución de la proliferación y la viabilidad, han sido ampliamente analizados (Gorzynik-Debicka et al., 2018) y además de mostrar los beneficios del aceite de oliva y de sus diferentes componentes, destacan el papel antitumoral de la oleuropeína, al igual que en los resultados obtenidos en nuestros estudios.

También se han analizado los mecanismos sobre los que actúa tanto la oleuropeína como el hidroxitirosol en diferentes tipos de cáncer. Entre ellos, al igual que en la presente tesis, se analizó la vía de Bcl-2 en cáncer colorrectal al ser un modulador de la apoptosis (inhibidor) a tener en cuenta en este tipo de procesos (Imran et al., 2018).

Nuestra elección para determinar el mecanismo por el que se produce la muerte celular corresponde con el utilizado en el trabajo de Sherif (Sherif & Al-Gayyar, 2018), que también se decantó por la evaluación de la caspasa-3 con una PCR en tiempo real, entre otros.

Los datos obtenidos en nuestro primer estudio muestran por primera vez un potencial efecto anticancerígeno en líneas celulares humanas de osteosarcoma (MG-63 y Saos-2). Posteriormente se han publicado resultados con otra línea celular humana de osteosarcoma (143B OS) en los que la oleuropeína, tanto de forma aislada como es combinación con un agente quimioterapéutico, sigue teniendo ese efecto anticancerígeno (Przychodzen et al., 2019). De esta forma, se apoyan los resultados ya obtenidos en cáncer de hueso, debido a que hasta la fecha no había bibliografía con la que poder compararla.

VIII. 2. Discusión sobre los mecanismos de apoptosis.

Con respecto a los datos obtenidos en el último artículo de la presente tesis, observamos que a una concentración de oleuropeína de 200 μ M se detuvo la proliferación de células humanas de osteosarcoma (MG-63). También caracterizamos los cambios observados en los cultivos de células humanas de osteosarcoma que son compatibles con la apoptosis celular, no sólo morfológicamente sino también con el aumento de la actividad de la proteína apoptótica celular y un aumento de la relación Bax/Bcl-2.

La apoptosis es un proceso complejo que conduce a la destrucción de una célula (Hengartner, 2000) y un elemento necesario en la investigación de fármacos contra el cáncer (Leon et al., 2013; Leon et al., 2014). La caspasa-3 es importante para procesos particulares relacionados con la apoptosis de la célula y la formación de cuerpos apoptóticos. La activación de la caspasa-3 puede conducir a la apoptosis celular a través de varias vías de señalización. Observamos que la exposición de células MG-63 a la oleuropeína aumentó la actividad de caspasa-3, que es compatible con la apoptosis celular (Porter & Janicke, 1999). La activación de caspasa-3 por oleuropeína se ha descrito previamente en varios modelos in vitro de investigación contra el cáncer (Boukes & van de Venter, 2016; Cao et al., 2017; Goldsmith et al., 2018; Secme et al., 2016; Sherif & Al-Gayyar, 2018; W. Wang et al., 2019).

Además, la familia de genes Bcl-2 desempeña un papel importante en la regulación de la apoptosis celular, principalmente estimulando la apoptosis celular, pero también suprimiéndola. Las proteínas de la familia Bcl-2 regulan sus características antiapoptóticas y pro-apoptóticas mediante la regulación de la liberación de factores proapoptóticos de las mitocondrias (Tsujimoto, 1998). Bcl-2 y Bax son las proteínas clásicas para prevenir la apoptosis celular (Bcl-2) y mejorar la apoptosis celular (Bax) promoviendo la permeabilidad de la membrana mitocondrial y desencadenando la apoptosis (Brady & Gil-Gomez, 1998; Yip & Reed, 2008).

En nuestro estudio, observamos que después de la exposición a la oleuropeína, la expresión del mRNA de Bcl-2 fue regulada en comparación con

la de las células del control, mientras que la expresión del mRNA de Bax fue regulada después de 200 μ M de exposición a oleuropeína. En general, la proporción de Bax/Bcl-2 aumentó, lo que inhibió la proliferación de células de osteosarcoma, de manera similar a la observada en otras líneas celulares de osteosarcoma (Hu & Xiao, 2015). La apoptosis inducida por agonistas puede surtir efecto a través de vías mediadas por receptores (extrínsecas) o de vías mitocondriales (intrínsecas), que desencadenan la activación de una cascada de caspasas (Nunez et al., 1998).

Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que la oleuropeína induce una vía compatible con la apoptosis en las células humanas de osteosarcoma a través del mecanismo intrínseco.

La línea celular MG-63 es una línea celular de osteosarcoma humano que conlleva mutaciones de p-53. Se sabe que el supresor tumoral p-53 desencadena la apoptosis a través de múltiples vías, una de las cuales requiere la modulación de la expresión de proteínas de la familia de proteínas Bcl-2 (Roepke et al., 2007). Las células MG-63 fueron descritas inicialmente como carentes de p-53 (Billiau et al., 1977) y fue corroborado en la literatura posterior cuando no se detectó ninguna expresión de p-53 en las células MG-63 (Chandar et al., 1992).

Estos resultados confirman nuestros hallazgos, ya que no observamos la expresión de p-53 en nuestro modelo de células humanas de osteosarcoma MG-63. Sin embargo, otros investigadores han reportado expresión mutada (J. Wang et al., 2017) o incluso expresión funcional (Xia et al., 2015) de p-53 en el mismo modelo de células osteosarcoma. Esta variabilidad inesperada en lo que debería ser un modelo biológico único ha aumentado la atención sobre la necesidad de la autenticación celular, ya que el número de líneas celulares mal identificadas/contaminadas ha aumentado (Cosme et al., 2017).

Nuestros resultados son consistentes con el fenotipo inicial de las células MG-63 descritos en la literatura y por lo tanto son compatibles con la inducción de la apoptosis después de la exposición a la oleuropeína en células con carencia de p-53. Esta observación sugiere que la oleuropeína podría inducir apoptosis independiente de p-53 en células MG-63 mediante la activación de la

vía intrínseca. La relación Bax/Bcl-2 es un determinante decisivo del umbral de una célula para someterse a apoptosis (Roepke et al., 2007).

Estos cambios hacen que la oligomerización de Bax, que conduce a la permeabilización de la membrana mitocondrial liberando el citocromo c (que activa dianas sucesivas, como la caspasa-3), desencadene la apoptosis (Roepke et al., 2007; Sharpe et al., 2004).

Del mismo modo, como se describió anteriormente en el modelo MG-63 (Roepke et al., 2007), observamos que la exposición a oleuropeína causó un aumento significativo en la relación Bax/Bcl-2 en las células de osteosarcoma humano MG-63, lo que sugiere que la apoptosis inducida por la oleuropeína no se debió únicamente a la regulación de la expresión de las proteínas pro-apoptóticas (Bax) y antiapoptóticas (Bcl-2).

Se ha propuesto que la respuesta apoptótica más fuerte en las células humanas de osteosarcomas MG-63 carentes de p53 puede ser una consecuencia secundaria de la falta de inducción de la detención del ciclo celular dependiente de p-53/p-21WAF1 (Roepke et al., 2007).

VIII. 4. Fortalezas.

Durante la revisión bibliográfica de los estudios publicados sobre la citotoxicidad de la oleuropeína en líneas celulares cancerígenas, se observó que no existen publicaciones sobre osteosarcoma.

En los diferentes tipos de cáncer en los que sí se ha estudiado en profundidad cómo afecta este polifenol, se ha observado su importante papel como regulador de la proliferación de estas células malignas y altamente invasoras.

La citotoxicidad de la oleuropeína en los diferentes tipos de cáncer estudiados, sugiere la necesidad de investigar en líneas celulares de osteosarcoma. Debido al hecho de que exista una gran prevalencia en edades tempranas, el control de esta enfermedad podría evitar las graves consecuencias

físicas que se pudieran producir derivadas de mutilaciones o largos periodos de rehabilitación en las personas que lo padecen.

La elaboración de esta tesis supone abrir nuevas líneas de investigación en dicho campo.

VIII. 5. Limitaciones.

Al tratarse de un estudio experimental *in vitro*, no es posible extrapolar los resultados obtenidos de ensayos en laboratorio con líneas celulares humanas de osteosarcoma a pacientes con cáncer.

Por tanto, debemos ser cautelosos para evitar la mala interpretación de los resultados, que a veces puede llevar a conclusiones erróneas acerca de tratamientos a pacientes que padecen esta enfermedad.

Para poder realizar esas afirmaciones, sería necesario realizar ensayos clínicos con oleuropeína a pacientes con osteosarcoma, como ya se ha realizado con pacientes con otros tipos de cáncer.

Reconocemos una limitación importante en nuestro estudio con respecto a la falta de datos de expresión de proteínas o de citometría de flujo, pero creemos que nuestros resultados son suficientes para concluir que la oleuropeína tiene potentes propiedades contra el cáncer en las células del osteosarcoma humano y por lo tanto justifica más investigación por su posible uso como agente quimioterapéutico contra el osteosarcoma.

**Capítulo IX. OTRAS CONTRIBUCIONES
DERIVADAS DEL PRESENTE TRABAJO DE
TESIS DOCTORAL**

Capítulo IX. OTRAS CONTRIBUCIONES DERIVADAS DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL.

IX. 1. Póster: IV Jornadas doctorales del G-9. Pamplona 2016.

Título: "Propiedades antiproliferativas de la oleuropeína en células humanas de osteosarcoma"

IX. 1. 1. Certificado de la jornada donde fue expuesto.



PROPIEDADES ANTIPROLIFERATIVAS DE LA OLEUROPEÍNA EN CÉLULAS HUMANAS DE OSTEOSARCOMA

Leal-Hernandez O., Moran JM. ¹, Roncero-Martin R., Pedrera-Canal M., Guerrero-Bonmatty R., Lavado-García JM., Pedrera-Zamorano JD.

¹- José María Morán García. Director de la tesis.



FACULTAD DE ENFERMERÍA
Y TERAPIA OCUPACIONAL

Grupo de Investigación en Enfermedades Metabólicas Óseas. Programa de Doctorado en Investigación Biomédica Aplicada. Departamento de Enfermería, Universidad de Extremadura, Cáceres, España.

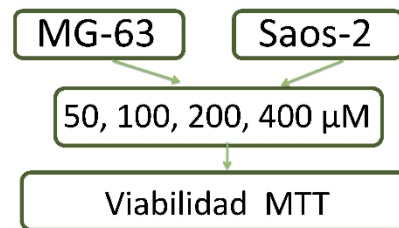
RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Los productos naturales han sido considerados como importantes fuentes potenciales de agentes quimioterapéuticos. Las propiedades antioxidantes y antiproliferativas de estos compuestos, y en concreto de la oleuropeína, han sido ampliamente estudiadas en diferentes tipos de cáncer con importantes resultados anticancerosos. En este estudio, se evaluó la actividad antiproliferativa de la oleuropeína, un compuesto del aceite de oliva que se encuentra tradicionalmente en la dieta mediterránea, en dos líneas celulares humanas de osteosarcoma (MG-63 y Saos-2).

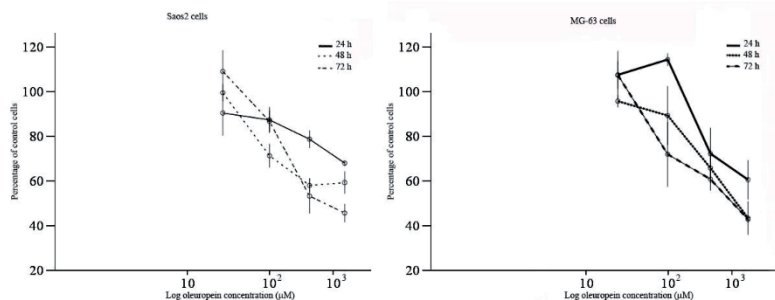
OBJETIVOS

Investigar el efecto antiproliferativo in vitro de la oleuropeína en dos líneas celulares humanas de osteosarcoma.

DESARROLLO



RESULTADOS



Porcentaje del control de la viabilidad a diferentes tiempos de las dos líneas celulares expuestas a 50-400 µM de oleuropeína.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran por primera vez la citotoxicidad de la oleuropeína en líneas celulares de osteosarcoma. Estos resultados son relevantes para futuras aplicaciones de la oleuropeína en el suministro de medicamentos y en la realización de ensayos controlados.

REFERENCIAS

- Pautke C, Schieker M, Tischer T, Kolk A, Neth P, Mutschler W, Milz S. (2004) Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Res.*, 24, 3743-3748.
- Cardeno A, Sanchez-Hidalgo M, Rosillo MA, Alarcon dIL. (2013) Oleuropein, a secoiridoid derived from olive tree, inhibits the proliferation of human colorectal cancer cell through downregulation of HIF-1alpha. *Nutr.Cancer*, 65, 147-156.

IX. 2. Abstract: 43rd Annual European Calcified Tissue Society Congress. Rome, Italy. 14 - 17 May 2016.

Título: “Antiproliferative properties of oleuropein in human osteosarcoma cells”

IX. 2. 1. Portada de la revista donde fue publicado.



IX. 2. 2. Página donde fue publicado.

ECTS 2016

P106

The Rho GTPases RhoA and CDC42 mediate apoptosis by a combination of statins and zoledronic acid in human bone-seeking breast cancer cellsAndy Göbel¹, Stefanie Thiele¹, Andrew J Browne¹, Martina Rauner¹, Lorenz C Hofbauer^{1,2} & Tilman D Rachner¹¹Division of Endocrinology, Diabetes, and Bone Diseases, Department of Medicine III, Technische Universität Dresden, Dresden, Germany; ²German Cancer Consortium (DKTK), partner site Dresden and German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany.

Breast cancer is the most frequent malignancy in women and frequently results in osteolytic bone metastases. Amino-bisphosphonates are a standard bone protective therapy and, similarly to statins, inhibit the mevalonate pathway that is crucial for posttranslational protein modifications (farnesylation and geranylation). Direct anti-tumor effects of amino-bisphosphonates and statins have been suggested but high concentrations are necessary to achieve meaningful effects. Our study aimed to assess the potential of combining amino-bisphosphonates with statins to reach anti-tumor effects at lower doses.

We demonstrate that the expression levels of both targets of statins and amino-bisphosphonates, the 3-hydroxy-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMGCR) and the farnesyl diphosphate synthase (FDPS), show a positive correlation in clinical samples of breast cancer ($P \leq 0.0001$) pointing to a potential benefit of simultaneously targeting both enzymes. Treating different osteotropic human cancer cell lines (MDA-MB-231, MDA-BONE, MDA-MET, MDA-453s, and PC3) with a combination of low concentrated statins (atorvastatin, simvastatin and rosuvastatin) and zoledronic acid resulted in significant anti-tumor-effects (50% reduction of cell vitality and fourfold induction of apoptosis; $P < 0.05$). Apoptosis was the result of blocked geranylation rather than farnesylation. Rho GTPases like RhoA, Rac1, and CDC42 represent a major class of geranylated proteins. Surprisingly, the treatments with mevalonate pathway inhibitors, individually or in combination, caused an accumulation of GTP-bound RhoA and CDC42 but not of Rac1. Importantly the knockdown of RhoA and CDC42 prior to the treatment with simvastatin and zoledronic acid reduced the caspase 3/7 activation by up to 60% and the cleaved PARP accumulation by up to 80% in MDA-MB-231 human breast cancer cells ($P < 0.01$). The observations point to a contribution of these Rho GTPases in the anti-tumor effects by statins and zoledronic acid.

Our results suggest the combination of statins and zoledronic acid as an effective approach for the adjuvant treatment of breast cancer.

DOI: 10.1530/boneabs.5.P106

P107

Biological effects of Cabozantinib on bone microenvironmentFrancesco Pantano, Marco Fioramonti, Michele Iuliani, Giulia Ribelli, Bruno Vincenzi, Giuseppe Tonini & Daniele Santini
Campus Bio-Medico University of Rome, Rome, Italy.

Background

Cabozantinib (CBZ) is a receptor tyrosine kinase inhibitor with activity against MET, VEGFR2, FLT3, c-KIT, and RET. Pre-clinical studies in models of prostate cancer bone metastasis demonstrated that CBZ treatment induced both a suppression of tumour growth and an alteration in bone remodelling, suggesting that both tumour and bone microenvironment represented potential CBZ targets. This is the first study exploring the potential direct activity of CBZ in bone using a totally human model of primary osteoclasts (OCLs) and osteoblasts (OBLs).

Methods

Primary OCLs were differentiated from CD14+ monocytes; primary OBLs were obtained from mesenchymal stem cells. OCL differentiation and activity were evaluated by TRAP and Bone Resorption assays; OBL differentiation was analysed by ALP and Alizarin Red assays. Gene expression analyses was performed by Real Time PCR and OPG and RANKL protein secretion measured by ELISA.

Results

Our results showed that non-cytotoxic doses of CBZ had a statistically significant inhibitory effect on OCL differentiation ($P = 0.0145$) and bone resorption activity ($P = 0.0252$). Moreover, we found that CBZ down-modulated the expression of OCL marker genes: TRAP ($P = 0.006$) and CATHEPSIN K ($P = 0.004$). On the other hand CBZ treatment had no significant impact on OBLs vitality, differentiation and activity. Intriguingly we found that CBZ induced in OBLs an alteration of RANKL/OPG balance increasing OPG mRNA levels ($P = 0.015$) and down-modulating RANKL expression ($P < 0.001$). A significant drop in RANKL secretion ($P = 0.043$) and an increase of OPG production ($P = 0.004$) was confirmed by ELISA.

Conclusion

Overall, this is the first evidence in human of the 'direct' effect of CBZ on OCLs and 'indirect' osteoblast-mediated through a modulation of RANKL/OPG balance. These multiple effects of CBZ on the cells of bone microenvironment are consistent with its effectiveness in reducing lesions from prostate cancer metastases.

DOI: 10.1530/boneabs.5.P107

P108

Clinical and experimental evidence suggest a protective effect of Paget's disease of bone against skeletal metastasization from solid tumorsDaniela Merlotti^{1,2}, Nadia Rucci³, Domenico Rendina⁴, Simone Bianciardi², Isabella Anna Evangelista², Argia Ucci³, Stefano Rotatori², Guido Sebastiani², Francesco Dotta², Simone Cenci¹, Pasquale Strazzullo⁴, Ranuccio Nuti², Anna Teti³ & Luigi Gennari²¹Division of Genetics and Cell Biology, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy; ²Department of Medicine, Surgery and Neurosciences, University of Siena, Siena, Italy; ³Department of Biotechnological and Applied Clinical Sciences, University of L'Aquila, L'Aquila, Italy; ⁴Department of Clinical and Experimental Medicine, Federico II University, Naples, Italy.

Paget's disease of bone (PDB) is a common disorder of bone metabolism characterized by focal areas of excessive and rapid bone resorption and formation, leading to bone pain, deformity and fractures. Despite the well documented increase in the risk of primary bone tumors due to neoplastic degeneration of pagetic tissue, a large retrospective analysis suggested that patients with prostate cancer and PDB have delayed time to bone metastases and improved overall survival than do patients with prostate cancer alone (*Br J Cancer* 2012;107:646–51). This association is unexpected since metastatic cells seed in skeletal sites under active turnover containing dense marrow cellularity and high bone turnover markers (as typically observed in PDB) have been consistently related with negative clinical outcomes and increased skeletal metastasization from prostate cancer or other solid tumors. Based on this observation, we performed a survey of retrospective clinical databases in 893 patients from the Italian PDB Registry (of whom 79 with documented prostate or breast cancer) and we observed a significantly decreased prevalence of skeletal metastases from both tumors with respect to the estimates from the general population, with a total absence of metastases in the 43 cases with the occurrence of cancer after the diagnosis of PDB, despite a mean observation period of 10.5 ± 4.3 years. Consistent with this observation, in a preliminary *in vitro* analysis, the conditioned media (CM) from osteoclasts derived from peripheral blood leucocytes of patients with active PDB was able to decrease the proliferation of the osteotropic breast cancer cell line MDA-MB-231, as assessed by the MTT test, with respect to CM of controls. Taken together, these results indicate that PDB patients have a distinct bone condition or a unique bone microenvironment that protects them from bone metastasis and strongly encourage further analyses in order to identify the underlying molecular mechanisms.

DOI: 10.1530/boneabs.5.P108

P109

Antiproliferative properties of oleuropein in human osteosarcoma cells

Jose M Moran, Olga Leal-Hernandez, Maria L Canal-Macias, Jesus M Lavado-Garcia, Raul Roncero-Martin, Ignacio Aliaga & Juan D Pedrera-Zamorano

Metabolic Bone Diseases Research Group, University of Extremadura, Caceres, Spain.

Background

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. Natural products have been regarded as important sources of potential chemotherapeutic agents. In this study, we evaluated the antiproliferative activity of oleuropein, an olive oil compound traditionally found in the Mediterranean diet.

Design and Methods

The antiproliferative activity on two human osteosarcoma cell lines (MG-63 and Saos2) was evaluated *in vitro* using the MTT colorimetric methods. The median inhibitory concentration values (IC_{50}) and 95% confidence interval (CI) for oleuropein were established by the weighted Probit method for both cell lines at 24, 48 and 72 h of exposure.

Results

Oleuropein exhibited obvious cytotoxic effects on human osteosarcoma cells in a concentration- and time-dependent manner. Statistical analysis of IC_{50} by the Probit regression method suggested that oleuropein had similar toxic effects on both cell lines tested (IC_{50} range from 247.41 to 474.97 μ M for MG63 cells and IC_{50} range from 798.69 to 359.91 μ M for Saos2 cells).

Conclusion

This is the first study showing an antiproliferative activity of oleuropein in human osteosarcoma cell lines.

DOI: 10.1530/boneabs.5.P109

P110**Role of the receptors FZD8 and RYK in mediating the anti-tumor effects of WNT5A on prostate cancer cells**

Stefanie Thiele¹, Andy Göbel¹, Sandra Hippauf¹, Tilman Rachner¹, Martina Rauner¹ & Lorenz C Hofbauer^{1,2}

¹Technical University Dresden, Dresden, Germany; ²German Cancer Consortium (DKTK), partner site Dresden and German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany.

Wnt proteins and their cognate receptors play a significant role in malignant diseases, in particular in prostate cancer (PCa). We previously showed that WNT5A inhibits PCa cell proliferation and induces apoptosis *in vitro*, leading to reduced PCa growth *in vivo*. However, the involved receptors remain unknown. Here, we determine the role of two Wnt receptors (FZD8, RYK) and their influence on the WNT5A-induced effects on PCa cells.

The expression of the Wnt receptors Frizzled (FZD) 8 and RYK was analyzed in three human (PC3, C42B, MDA-PCa-2b) and two mouse (RM1, TRAMP-C2) PCa cell lines. RYK (CT-value 18-23) is higher expressed in all prostate cancer cell lines than FZD8 (CT-value 24-33). Further, FZD8 showed the lowest expression levels in the osteoblastic PCa cell line MDA-PCa-2b (CT-value 33). To determine which receptor mediates the pro-apoptotic and anti-proliferative effects of WNT5A in PCa, we knocked down RYK and FZD8 with specific siRNA in PC3 cells 24 h before the induction of WNT5A overexpression. Knock-down of FZD8 induced a further increase of apoptosis after WNT5A overexpression (2.2-fold, $P < 0.01$). In contrast, knock-down of RYK fully reversed the induction of apoptosis after WNT5A overexpression ($P < 0.05$). Interestingly, the decrease of proliferation after WNT5A overexpression was not reversed by neither knock-down of RYK nor FZD8, suggesting another receptor involved in this process. After knock-down of RYK, WNT5A was still able to suppress proliferation by 28%. Of note, FZD8 knock-down even further decreased (from 27 to 55%) proliferation after WNT5A overexpression. To validate our findings *in vivo*, a cDNA array containing samples from nine healthy and 39 patients with prostate cancer was evaluated for WNT5A and RYK expression. RYK mRNA expression correlated highly positively with WNT5A expression ($r^2 = 0.9309$, $P < 0.001$).

These data suggest that RYK, but not FZD8, mediates the pro-apoptotic effects of WNT5A on prostate cancer cells.

DOI: 10.1530/boneabs.5.P110

P111**Changes in monocyte and NK-like cell subpopulations in the peripheral blood of patients treated with zoledronic acid**

Athanassios Kyrgidis¹, Maria Yavropoulou², Rosa Lagoudaki², Anna Andreadou³, Charalambos Andreadis³, John Yovos¹ & Dimitrios Kouvelas³

¹Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece;

²Division of Clinical and Molecular Endocrinology, AHEPA University Hospital, Thessaloniki, Greece; ³Department of Clinical Oncology, Theagenio Cancer Hospital, Thessaloniki, Greece.

Osteonecrosis of the jaws (ONJ) is a relatively new adverse effect associated with bisphosphonate therapy, but no causal association has been established. By definition, a patient is considered to suffer from ONJ if he has current or previous treatment with a bisphosphonate, exposed bone in the maxillofacial region that has persisted for more than 8 weeks and no history of radiation therapy to the jaws. It has been proposed that ONJ could be linked with impaired topical immune response due to the toxicity exerted by bisphosphonates on macrophages, further to their toxicity in osteoclasts. The aim of the present study was to test this

theory and examine the effect of zoledronate administration in peripheral blood monocyte and NK-like cell populations.

Methods

In this pilot study, we included six breast cancer patients, on hormone therapy, who were treated with zoledronic acid for a period of at least 6 months and who did not receive chemotherapy for a period of at least 1 year. Monocytes (CD45+, CD14+CD23+, CD14+CD23-, CD14-CD23+, CD14+CD123+, CD14+CD123- and CD14-CD123+) and NK-like cells populations (CD45+CD3+, CD45+CD3-, CD45+CD16+CD56+, CD3+CD16+CD56+, CD3-CD16+CD56+, CD3+CD16+CD56- and CD19+CD45+) were examined (immune phenotype quantified sampling profile - IPQSP via flow cytometry and antibody-based fluorescence). The IPQSP was conducted prior to zoledronic acid infusion and 48 h after, on peripheral blood samples.

Results

In this preliminary clinical sample, we were able to detect a significant increase in CD14-CD123+ (Pearson's χ^2 , $P = 0.042$), CD45+CD3- ($P = 0.004$), CD3+CD16+CD56+ ($P = 0.036$) and CD3-CD16+CD56+ ($P = 0.026$) populations. We were also able to detect a significant decrease in the CD45+CD16+CD56+ population ($P < 0.0001$).

Conclusions

We demonstrate changes in the monocyte and NK-like cell populations, following zoledronic acid administration in patients with breast cancer on hormone therapy. The effects of bisphosphonates in those cells may be causatively linked with the development of ONJ.

DOI: 10.1530/boneabs.5.P111

P112**Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) mediate the positive feedback loop of prostate tumor-bone interactions**

Serk in Park

Korea University College of Medicine, Seoul, Republic of Korea.

Advanced-stage prostate and breast cancer patients commonly develop bone metastases, accounting for significant clinical problems such as pain, fracture, immobility and death. Bone is comprised of diverse cell types that are potentially involved in metastatic progression. However, how cancer cells interact with these cells within the bone microenvironment to support their expansion and activity remains unclear. Recent data from our laboratory highlighted a novel feed-forward mechanism underlying the interactions between prostate cancer cells and a pro-tumorigenic subset of immature myeloid cells in the bone marrow. Briefly, levels of tumor derived parathyroid hormone-related protein (PTHrP) correlated with myeloid-derived suppressor cell (MDSC) recruitment in the tumor tissue, with further evidence for tumor-derived PTHrP potentiates MDSC activity and function within the bone marrow of tumor hosts. Mechanistic investigations *in vivo* revealed that PTHrP elevated Y418 phosphorylation levels in Src family kinases in MDSC via osteoblast-derived interleukin-6 and VEGF-A, thereby upregulating MMP-9. Taken together, our results showed that prostate cancer-derived PTHrP acts in the bone marrow to potentiate MDSCs, which are recruited to tumor tissue where they contribute to tumor angiogenesis and growth. Furthermore, we demonstrated that osteal macrophages mediate anabolic actions of parathyroid hormone. Collectively, this presentation will describe the distinct roles of myeloid-lineage bone marrow cells in bone during the progression of bone metastasis, and will discuss the potential therapeutic approaches.

DOI: 10.1530/boneabs.5.P112

P113**Dendritic glycopolymers as efficient drug delivery systems for retarded release of bortezomib from calcium phosphate cements**

Bettina Mamitzsch^{1,2}, Christin Striegler^{1,2}, Matthias Schumacher³, Michael Gelinsky³, Martin Müller¹, Anja Seckinger⁴, Brigitte Voit^{1,2} & Dietmar Appelhans¹

¹Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V, Dresden, Germany;

²Technische Universität Dresden, Organische Chemie der Polymere, Dresden, Germany; ³Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Dresden, Germany; ⁴Medizinische Klinik V, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg, Germany.

Calcium phosphate cements (CPC) are used as bone graft substitute, e.g. in the treatment of lytic bone lesions in multiple myeloma. CPC provide crucial advantages, such as osteoconductivity, biodegradability and the potential drug loading. Though, it lacks retarded drug release for short-/long-term treatment due

Capítulo X. CONCLUSIONES

Capítulo X. CONCLUSIONES.

1. La exposición de las líneas celulares de osteosarcoma MG-63 y Saos-2 a oleuropeína disminuye la viabilidad de las mismas.
2. La citotoxicidad de la oleuropeína en las células humanas de osteosarcoma parece ser compatible con un proceso de apoptosis.
3. Al carecer la línea de células humanas de osteosarcoma MG-63 de un gen p-53 funcional, este aparente proceso de apoptosis inducido por oleuropeína es independiente de esta proteína supresora de tumores.
4. Se evidencia que la exposición a oleuropeína de las células humanas de osteosarcoma MG-63 provoca cambios en los niveles de expresión génica de la proteína pro-apoptótica Bax y la proteína antiapoptótica Bcl-2, cambios que desempeñan un papel decisivo en la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis.
5. Es necesario confirmar los resultados obtenidos mediante la cumplimentación de estudios que evidencien la presencia de apoptosis mediante citometría de flujo para valorar de forma más precisa los mecanismos reguladores de ésta en el modelo biológico estudiado.
6. Dado que la oleuropeína es un componente fundamental del aceite de oliva y éste lo es de la dieta mediterránea, las evidencias aportadas apoyan el continuar investigando las potencialidades de este compuesto como un posible agente antitumoral.

Capítulo XI. BIBLIOGRAFÍA

- Acquaviva, R., Di Giacomo, C., Sorrenti, V., Galvano, F., Santangelo, R., Cardile, V., Gangia, S., D'Orazio, N., Abraham, N. G., & Vanella, L. (2012). Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *International Journal of Oncology*, 41(1), 31-38. <https://10.3892/ijo.2012.1428> [doi]
- Ahmad Farooqi, A., Fayyaz, S., Silva, A. S., Sureda, A., Nabavi, S. F., Mocan, A., Nabavi, S. M., & Bishayee, A. (2017). Oleuropein and Cancer Chemoprevention: The Link is Hot. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(5), 10.3390/molecules22050705. <https://E705> [pii]
- An, J., Hao, D., Zhang, Q., Chen, B., Zhang, R., Wang, Y., & Yang, H. (2016). Natural products for treatment of bone erosive diseases: The effects and mechanisms on inhibiting osteoclastogenesis and bone resorption. *International Immunopharmacology*, 36, 118-131. <https://10.1016/j.intimp.2016.04.024> [doi]
- Angulo, P., Kaushik, G., Subramaniam, D., Dandawate, P., Neville, K., Chastain, K., & Anant, S. (2017). Natural compounds targeting major cell signaling pathways: a novel paradigm for osteosarcoma therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1), 10-016-0373-z. <https://10.1186/s13045-016-0373-z> [doi]
- Barbaro, B., Toietta, G., Maggio, R., Arciello, M., Tarocchi, M., Galli, A., & Balsano, C. (2014). Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 18508-18524. <https://10.3390/ijms151018508> [doi]

- Berrino, F. (2016). Mediterranean Diet and Its Association With Reduced Invasive Breast Cancer Risk. *JAMA Oncology*, 2(4), 535-536. <https://10.1001/jamaoncol.2015.5679> [doi]
- Billiau, A., Edy, V. G., Heremans, H., Van Damme, J., Desmyter, J., Georgiades, J. A., & De Somer, P. (1977). Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 12(1), 11-15. <https://10.1128/aac.12.1.11> [doi]
- Blanden, A. R., Yu, X., Loh, S. N., Levine, A. J., & Carpizo, D. R. (2015). Reactivating mutant p53 using small molecules as zinc metallochaperones: awakening a sleeping giant in cancer. *Drug Discovery Today*, 20(11), 1391-1397. <https://10.1016/j.drudis.2015.07.006> [doi]
- Boss, A., Bishop, K. S., Marlow, G., Barnett, M. P., & Ferguson, L. R. (2016). Evidence to Support the Anti-Cancer Effect of Olive Leaf Extract and Future Directions. *Nutrients*, 8(8), 10.3390/nu8080513. <https://10.3390/nu8080513> [doi]
- Boukes, G. J., & van de Venter, M. (2016). The apoptotic and autophagic properties of two natural occurring prodrugs, hyperoside and hypoxoside, against pancreatic cancer cell lines. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 83, 617-626. [https://S0753-3322\(16\)30735-1](https://S0753-3322(16)30735-1) [pii]
- Braakhuis, A. J., Campion, P., & Bishop, K. S. (2016). Reducing Breast Cancer Recurrence: The Role of Dietary Polyphenolics. *Nutrients*, 8(9), 10.3390/nu8090547. <https://10.3390/nu8090547> [doi]

- Brady, H. J., & Gil-Gomez, G. (1998). Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30(6), 647-650. <https://S1357272598000065> [pii]
- Bulotta, S., Corradino, R., Celano, M., Maiuolo, J., D'Agostino, M., Oliverio, M., Procopio, A., Filetti, S., & Russo, D. (2013). Antioxidant and antigrowth action of peracetylated oleuropein in thyroid cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, 51(1), 181-189. <https://10.1530/JME-12-0241> [doi]
- Byberg, L., Bellavia, A., Larsson, S. C., Orsini, N., Wolk, A., & Michaelsson, K. (2016). Mediterranean Diet and Hip Fracture in Swedish Men and Women. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 31(12), 2098-2105. <https://10.1002/jbmr.2896> [doi]
- Calderon-Garcia, J. F., Moran, J. M., Roncero-Martin, R., Rey-Sanchez, P., Rodriguez-Velasco, F. J., & Pedrera-Zamorano, J. D. (2012). Dietary habits, nutrients and bone mass in Spanish premenopausal women: the contribution of fish to better bone health. *Nutrients*, 5(1), 10-22. <https://10.3390/nu5010010> [doi]
- Cao, S., Zhu, X., & Du, L. (2017). P38 MAP kinase is involved in oleuropein-induced apoptosis in A549 cells by a mitochondrial apoptotic cascade. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 95, 1425-1435. [https://S0753-3322\(17\)32146-7](https://S0753-3322(17)32146-7) [pii]

- Cardeno, A., Sanchez-Hidalgo, M., & Alarcon-de-la-Lastra, C. (2013). An update of olive oil phenols in inflammation and cancer: molecular mechanisms and clinical implications. *Current Medicinal Chemistry*, 20(37), 4758-4776. <https://CMC-EPUB-20-03-07-2013> [pii]
- Cardeno, A., Sanchez-Hidalgo, M., Rosillo, M. A., & Alarcon de la Lastra, C. (2013). Oleuropein, a secoiridoid derived from olive tree, inhibits the proliferation of human colorectal cancer cell through downregulation of HIF-1alpha. *Nutrition and Cancer*, 65(1), 147-156. <https://10.1080/01635581.2013.741758> [doi]
- Cauley, J. A. (2017). Osteoporosis: fracture epidemiology update 2016. *Current Opinion in Rheumatology*, 29(2), 150-156. <https://10.1097/BOR.0000000000000365> [doi]
- Celano, M., Maggisano, V., Lepore, S. M., Russo, D., & Bulotta, S. (2019). Secoiridoids of olive and derivatives as potential coadjuvant drugs in cancer: A critical analysis of experimental studies. *Pharmacological Research*, 142, 77-86. [https://S1043-6618\(18\)31884-X](https://S1043-6618(18)31884-X) [pii]
- Chandar, N., Billig, B., McMaster, J., & Novak, J. (1992). Inactivation of p53 gene in human and murine osteosarcoma cells. *British Journal of Cancer*, 65(2), 208-214. <https://10.1038/bjc.1992.43> [doi]
- Chang, R., Sun, L., & Webster, T. J. (2014). Short communication: selective cytotoxicity of curcumin on osteosarcoma cells compared to healthy osteoblasts. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 461-465. <https://10.2147/IJN.S55505> [doi]

- Chang, R., Sun, L., & Webster, T. J. (2015). Selective inhibition of MG-63 osteosarcoma cell proliferation induced by curcumin-loaded self-assembled arginine-rich-RGD nanospheres. *International Journal of Nanomedicine*, *10*, 3351-3365. <https://10.2147/IJN.S78756> [doi]
- Chang, Z., Xing, J., & Yu, X. (2014). Curcumin induces osteosarcoma MG63 cells apoptosis via ROS/Cyto-C/Caspase-3 pathway. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *35*(1), 753-758. <https://10.1007/s13277-013-1102-7> [doi]
- Chen, G. D., Dong, X. W., Zhu, Y. Y., Tian, H. Y., He, J., & Chen, Y. M. (2016). Adherence to the Mediterranean diet is associated with a higher BMD in middle-aged and elderly Chinese. *Scientific Reports*, *6*, 25662. <https://10.1038/srep25662> [doi]
- Chen, Z., Xue, J., Shen, T., Ba, G., Yu, D., & Fu, Q. (2016). Curcumin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis by protecting osteoblasts from apoptosis in vivo and in vitro. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, *43*(2), 268-276. <https://10.1111/1440-1681.12513> [doi]
- Chimento, A., Casaburi, I., Rosano, C., Avena, P., De Luca, A., Campana, C., Martire, E., Santolla, M. F., Maggiolini, M., Pezzi, V., & Sirianni, R. (2014). Oleuropein and hydroxytyrosol activate GPER/ GPR30-dependent pathways leading to apoptosis of ER-negative SKBR3 breast cancer cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, *58*(3), 478-489. <https://10.1002/mnfr.201300323> [doi]

- Chin, K. Y., & Ima-Nirwana, S. (2016). Olives and Bone: A Green Osteoporosis Prevention Option. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(8), 10.3390/ijerph13080755.
<https://10.3390/ijerph13080755> [doi]
- Cicerale, S., Lucas, L., & Keast, R. (2010). Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 458-479. <https://10.3390/ijms11020458> [doi]
- Cory, S., Huang, D. C., & Adams, J. M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, 22(53), 8590-8607.
<https://10.1038/sj.onc.1207102> [doi]
- Cosme, B., Falagan-Lotsch, P., Ribeiro, M., Napoleao, K., Granjeiro, J. M., & Moura-Neto, R. (2017). Are your results valid? Cellular authentication a need from the past, an emergency on the present. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 53(5), 430-434. <https://10.1007/s11626-016-0124-z> [doi]
- Davis, C., Bryan, J., Hodgson, J., & Murphy, K. (2015). Definition of the Mediterranean Diet; a Literature Review. *Nutrients*, 7(11), 9139-9153.
<https://10.3390/nu7115459> [doi]
- de Pablos, R. M., Espinosa-Oliva, A. M., Hornedo-Ortega, R., Cano, M., & Arguelles, S. (2019). Hydroxytyrosol protects from aging process via AMPK and autophagy; a review of its effects on cancer, metabolic syndrome, osteoporosis, immune-mediated and neurodegenerative diseases.

Pharmacological Research, 143, 58-72. [https://S1043-6618\(19\)30104-5](https://S1043-6618(19)30104-5)
[pii]

Di Daniele, N., Noce, A., Vidiri, M. F., Moriconi, E., Marrone, G., Annicchiarico-Petruzzelli, M., D'Urso, G., Tesauro, M., Rovella, V., & De Lorenzo, A. (2017). Impact of Mediterranean diet on metabolic syndrome, cancer and longevity. *Oncotarget*, 8(5), 8947-8979. <https://10.18632/oncotarget.13553>
[doi]

Dussailant, C., Echeverria, G., Urquiaga, I., Velasco, N., & Rigotti, A. (2016). Current evidence on health benefits of the mediterranean diet. [Evidencia actual sobre los beneficios de la dieta mediterranea en salud] *Revista Medica De Chile*, 144(8), 1044-1052. <https://S0034-98872016000800012>
[pii]

Elamin, M. H., Elmahi, A. B., Daghestani, M. H., Al-Olayan, E. M., Al-Ajmi, R. A., Alkhuriji, A. F., Hamed, S. S., & Elkhadragey, M. F. (2017). Synergistic Anti-Breast-Cancer Effects of Combined Treatment With Oleuropein and Doxorubicin In Vivo. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, <https://AT5644> [pii]

Fabiani, R. (2016). Anti-cancer properties of olive oil secoiridoid phenols: a systematic review of in vivo studies. *Food & Function*, 7(10), 4145-4159. <https://10.1039/c6fo00958a> [doi]

Fayyaz, S., Aydin, T., Cakir, A., Gasparri, M. L., Panici, P. B., & Farooqi, A. A. (2016). Oleuropein Mediated Targeting of Signaling Network in Cancer.

Current Topics in Medicinal Chemistry, 16(22), 2477-2483. <https://CTMC-E PUB-73650> [pii]

Garcia-Martinez, O., De Luna-Bertos, E., Ramos-Torrecillas, J., Ruiz, C., Milia, E., Lorenzo, M. L., Jimenez, B., Sanchez-Ortiz, A., & Rivas, A. (2016). Phenolic Compounds in Extra Virgin Olive Oil Stimulate Human Osteoblastic Cell Proliferation. *PloS One*, 11(3), e0150045. <https://10.1371/journal.pone.0150045> [doi]

García-Martínez, O., Mazzaglia, G., Sánchez-Ortiz, A., Ocaña-Peinado, F. M., & Rivas, A. (2014). Phenolic content of Sicilian virgin olive oils and their effect on MG-63 human osteoblastic cell proliferation. *65*, e032. <https://doi.org/10.3989/gya.0111141>.

Giner, E., Recio, M. C., Rios, J. L., Cerda-Nicolas, J. M., & Giner, R. M. (2016). Chemopreventive effect of oleuropein in colitis-associated colorectal cancer in c57bl/6 mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(2), 242-255. <https://10.1002/mnfr.201500605> [doi]

Giraldi, L., Panic, N., Cadoni, G., Boccia, S., & Leoncini, E. (2016). Association between Mediterranean diet and head and neck cancer: results of a large case-control study in Italy. *European Journal of Cancer Prevention : The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, <https://10.1097/CEJ.0000000000000277> [doi]

Goldsmith, C. D., Bond, D. R., Jankowski, H., Weidenhofer, J., Stathopoulos, C. E., Roach, P. D., & Scarlett, C. J. (2018). The Olive Biophenols Oleuropein and Hydroxytyrosol Selectively Reduce Proliferation, Influence the Cell

- Cycle, and Induce Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 10.3390/ijms19071937. <https://E1937> [pii]
- Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Marino Gammazza, A., Knap, N., Wozniak, M., & Gorska-Ponikowska, M. (2018). Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 10.3390/ijms19030686. <https://E686> [pii]
- Hagiwara, K., Goto, T., Araki, M., Miyazaki, H., & Hagiwara, H. (2011). Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *European Journal of Pharmacology*, 662(1-3), 78-84. <https://10.1016/j.ejphar.2011.04.023> [doi]
- Hamdi, H. K., & Castellon, R. (2005). Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334(3), 769-778. [https://S0006-291X\(05\)01340-9](https://S0006-291X(05)01340-9) [pii]
- Haring, B., Crandall, C. J., Wu, C., LeBlanc, E. S., Shikany, J. M., Carbone, L., Orchard, T., Thomas, F., Wactawaski-Wende, J., Li, W., Cauley, J. A., & Wassertheil-Smoller, S. (2016). Dietary Patterns and Fractures in Postmenopausal Women: Results From the Women's Health Initiative. *JAMA Internal Medicine*, 176(5), 645-652. <https://10.1001/jamainternmed.2016.0482> [doi]
- Hassan, Z. K., Elamin, M. H., Daghestani, M. H., Omer, S. A., Al-Olayan, E. M., Elobeid, M. A., Virk, P., & Mohammed, O. B. (2012). Oleuropein induces

- anti-metastatic effects in breast cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 13(9), 4555-4559.
- Hassan, Z. K., Elamin, M. H., Omer, S. A., Daghestani, M. H., Al-Olayan, E. S., Elobeid, M. A., & Virk, P. (2014). Oleuropein induces apoptosis via the p53 pathway in breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 14(11), 6739-6742.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776. <https://10.1038/35037710> [doi]
- Hodge, A. M., Bassett, J. K., Shivappa, N., Hebert, J. R., English, D. R., Giles, G. G., & Severi, G. (2016). Dietary inflammatory index, Mediterranean diet score, and lung cancer: a prospective study. *Cancer Causes & Control : CCC*, 27(7), 907-917. <https://10.1007/s10552-016-0770-1> [doi]
- Hu, W., & Xiao, Z. (2015). Formononetin induces apoptosis of human osteosarcoma cell line U2OS by regulating the expression of Bcl-2, Bax and MiR-375 in vitro and in vivo. *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 37(3), 933-939. <https://10.1159/000430220> [doi]
- Impellizzeri, D., Esposito, E., Mazzon, E., Paterniti, I., Di Paola, R., Morittu, V. M., Procopio, A., Britti, D., & Cuzzocrea, S. (2011). Oleuropein aglycone, an olive oil compound, ameliorates development of arthritis caused by injection of collagen type II in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 339(3), 859-869. <https://10.1124/jpet.111.182808> [doi]

- Imran, M., Nadeem, M., Gilani, S. A., Khan, S., Sajid, M. W., & Amir, R. M. (2018). Antitumor Perspectives of Oleuropein and Its Metabolite Hydroxytyrosol: Recent Updates. *Journal of Food Science*, 83(7), 1781-1791. <https://10.1111/1750-3841.14198> [doi]
- Imran, M., Saeed, F., Nadeem, M., Arshad, M. U., Ullah, A., & Suleria, H. A. (2016). Curcumin; Anticancer and Antitumor Perspectives - A Comprehensive Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, , 0. <https://10.1080/10408398.2016.1252711> [doi]
- Kwan, H. Y., Chao, X., Su, T., Fu, X., Tse, A. K., Fong, W. F., & Yu, Z. L. (2017). The anticancer and antiobesity effects of Mediterranean diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(1), 82-94. <https://10.1080/10408398.2013.852510> [doi]
- Leal-Hernandez, O., Moran, J. M., Lavado-Garcia, J. M., Roncero-Martin, R., Aliaga, I., Pedrera-Canal, M., & Pedrera-Zamorano, J. D. (2015). Clinical potential of curcumin in the treatment of cancer: a minireview of clinical trials. *4*(2), 57-60. <https://10.5455/oams.070915.rv.018>
- Leon, I. E., Di Virgilio, A. L., Porro, V., Muglia, C. I., Naso, L. G., Williams, P. A., Bollati-Fogolin, M., & Etcheverry, S. B. (2013). Antitumor properties of a vanadyl(IV) complex with the flavonoid chrysin [VO(chrysin)₂EtOH]₂ in a human osteosarcoma model: the role of oxidative stress and apoptosis. *Dalton Transactions (Cambridge, England : 2003)*, 42(33), 11868-11880. <https://10.1039/c3dt50524c> [doi]

- Leon, I. E., Porro, V., Di Virgilio, A. L., Naso, L. G., Williams, P. A., Bollati-Fogolin, M., & Etcheverry, S. B. (2014). Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of an oxidovanadium(IV) complex with the flavonoid silibinin against osteosarcoma cells. *Journal of Biological Inorganic Chemistry : JBIC : A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 19(1), 59-74. <https://10.1007/s00775-013-1061-x> [doi]
- Levine, A. J., & Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Reviews.Cancer*, 9(10), 749-758. <https://10.1038/nrc2723> [doi]
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-408. <https://10.1006/meth.2001.1262> [doi]
- Maalej, A., Bouallagui, Z., Hadrich, F., Isoda, H., & Sayadi, S. (2017). Assessment of *Olea europaea* L. fruit extracts: Phytochemical characterization and anticancer pathway investigation. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 90, 179-186. [https://S0753-3322\(16\)32806-2](https://S0753-3322(16)32806-2) [pii]
- Moran, J. M., Rodriguez-Velasco, F. J., Roncero-Martin, R., Vera, V., & Pedrera-Zamorano, J. D. (2014). Cytotoxic effects of curcumin in osteosarcoma cells. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 5273-5275. <https://10.2147/IJN.S75005> [doi]

- Moran, J. M., Roncero-Martin, R., Rodriguez-Velasco, F. J., Calderon-Garcia, J. F., Rey-Sanchez, P., Vera, V., Canal-Macias, M. L., & Pedrera-Zamorano, J. D. (2012). Effects of curcumin on the proliferation and mineralization of human osteoblast-like cells: implications of nitric oxide. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 16104-16118.
<https://10.3390/ijms131216104> [doi]
- Movassagh, E. Z., & Vatanparast, H. (2017). Current Evidence on the Association of Dietary Patterns and Bone Health: A Scoping Review. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 8(1), 1-16.
<https://10.3945/an.116.013326> [doi]
- Negro, C., Aprile, A., Luvisi, A., Nicoli, F., Nutricati, E., Vergine, M., Miceli, A., Blando, F., Sabella, E., & De Bellis, L. (2019). Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Italian Monovarietal Extra Virgin Olive Oils. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(6), 10.3390/antiox8060161.
<https://E161> [pii]
- Nunez, G., Benedict, M. A., Hu, Y., & Inohara, N. (1998). Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*, 17(25), 3237-3245.
<https://10.1038/sj.onc.1202581> [doi]
- Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Wurtele, G., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000). Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *The Lancet.Oncology*, 1, 107-112.

- Parkinson, L., & Cicerale, S. (2016). The Health Benefiting Mechanisms of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(12), 10.3390/molecules21121734. <https://doi.org/10.3390/molecules21121734> [pii]
- Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S. V., Hainaut, P., & Olivier, M. (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human Mutation*, 28(6), 622-629. <https://doi.org/10.1002/humu.20495> [doi]
- Porter, A. G., & Janicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 6(2), 99-104. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400476> [doi]
- Potentas, E., Witkowska, A. M., & Zujko, M. E. (2015). Mediterranean diet for breast cancer prevention and treatment in postmenopausal women. *Przegląd Menopauzalny = Menopause Review*, 14(4), 247-253. <https://doi.org/10.5114/pm.2015.56381> [doi]
- Przychodzen, P., Wyszowska, R., Gorzynik-Debicka, M., Kostrzewa, T., Kuban-Jankowska, A., & Gorska-Ponikowska, M. (2019). Anticancer Potential of Oleuropein, the Polyphenol of Olive Oil, With 2-Methoxyestradiol, Separately or in Combination, in Human Osteosarcoma Cells. *Anticancer Research*, 39(3), 1243-1251. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13234> [doi]
- Puel, C., Mathey, J., Agalias, A., Kati-Coulibaly, S., Mardon, J., Obled, C., Davicco, M. J., Lebecque, P., Horcajada, M. N., Skaltsounis, A. L., &

- Coxam, V. (2006). Dose-response study of effect of oleuropein, an olive oil polyphenol, in an ovariectomy/inflammation experimental model of bone loss in the rat. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 25(5), 859-868. [https://S0261-5614\(06\)00080-X](https://S0261-5614(06)00080-X) [pii]
- Puel, C., Quintin, A., Agalias, A., Mathey, J., Obled, C., Mazur, A., Davicco, M. J., Lebecque, P., Skaltsounis, A. L., & Coxam, V. (2004). Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomised rat. *The British Journal of Nutrition*, 92(1), 119-127. <https://10.1079/BJN20041181> [doi]
- Ramírez-García, M., Márquez-González, H., Barranco-Lampón, G., & López-Aguilar, J. (2014). Bcl-2: su papel en el ciclo celular, apoptosis y cáncer. *Residente*, 9(3), 84. <https://www.medigraphic.com/pdfs/residente/rr-2014/rr143b.pdf>
- Ratjen, I., Schafmayer, C., di Giuseppe, R., Waniek, S., Plachta-Danielzik, S., Koch, M., Nothlings, U., Hampe, J., Schlesinger, S., & Lieb, W. (2017). Postdiagnostic Mediterranean and Healthy Nordic Dietary Patterns Are Inversely Associated with All-Cause Mortality in Long-Term Colorectal Cancer Survivors. *The Journal of Nutrition*, <https://jn244129> [pii]
- Roepke, M., Diestel, A., Bajbouj, K., Walluscheck, D., Schonfeld, P., Roessner, A., Schneider-Stock, R., & Gali-Muhtasib, H. (2007). Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer Biology & Therapy*, 6(2), 160-169. <https://3575> [pii]

- Rohanizadeh, R., Deng, Y., & Verron, E. (2016). Therapeutic actions of curcumin in bone disorders. *BoneKEy Reports*, 5, 793.
<https://10.1038/bonekey.2016.20> [doi]
- Romero, C., Medina, E., Mateo, M. A., & Brenes, M. (2017). Quantification of bioactive compounds in Picual and Arbequina olive leaves and fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(6), 1725-1732.
<https://10.1002/jsfa.7920> [doi]
- Rosato, V., Guercio, V., Bosetti, C., Negri, E., Serraino, D., Giacosa, A., Montella, M., La Vecchia, C., & Tavani, A. (2016). Mediterranean diet and colorectal cancer risk: a pooled analysis of three Italian case-control studies. *British Journal of Cancer*, 115(7), 862-865.
<https://10.1038/bjc.2016.245> [doi]
- Sahin, S., & Bilgin, M. (2017). Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, <https://10.1002/jsfa.8619> [doi]
- Sahin, S., Sayim, E., & Bilgin, M. (2017). Effect of olive leaf extract rich in oleuropein on the quality of virgin olive oil. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1721-1728. <https://10.1007/s13197-017-2607-7> [doi]
- Salakou, S., Kardamakis, D., Tsamandas, A. C., Zolota, V., Apostolakis, E., Tzelepi, V., Papathanasopoulos, P., Bonikos, D. S., Papapetropoulos, T., Petsas, T., & Dougenis, D. (2007). Increased Bax/Bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis. *In Vivo (Athens, Greece)*, 21(1), 123-132.

- Samara, P., Christoforidou, N., Lemus, C., Argyropoulou, A., Ioannou, K., Vougogiannopoulou, K., Aligiannis, N., Paronis, E., Gaboriaud-Kolar, N., Tsitsilonis, O., & Skaltsounis, A. L. (2017). New semi-synthetic analogs of oleuropein show improved anticancer activity in vitro and in vivo. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 137, 11-29. [https://S0223-5234\(17\)30389-6](https://S0223-5234(17)30389-6) [pii]
- Schwingshackl, L., & Hoffmann, G. (2016). Does a Mediterranean-Type Diet Reduce Cancer Risk? *Current Nutrition Reports*, 5, 9-17. <https://10.1007/s13668-015-0141-7> [doi]
- Secme, M., Eroglu, C., Dodurga, Y., & Bagci, G. (2016). Investigation of anticancer mechanism of oleuropein via cell cycle and apoptotic pathways in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Gene*, 585(1), 93-99. [https://S0378-1119\(16\)30208-6](https://S0378-1119(16)30208-6) [pii]
- Shahnazari, M., Turner, R. T., Iwaniec, U. T., Wronski, T. J., Li, M., Ferruzzi, M. G., Nissenson, R. A., & Halloran, B. P. (2016). Dietary dried plum increases bone mass, suppresses proinflammatory cytokines and promotes attainment of peak bone mass in male mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 34, 73-82. <https://10.1016/j.jnutbio.2016.04.007> [doi]
- Shamshoum, H., Vlavcheski, F., & Tsiani, E. (2017). Anticancer effects of oleuropein. *BioFactors (Oxford, England)*, 43(4), 517-528. <https://10.1002/biof.1366> [doi]
- Shareck, M., Rousseau, M. C., Koushik, A., Siemiatycki, J., & Parent, M. E. (2017). Inverse Association between Dietary Intake of Selected

- Carotenoids and Vitamin C and Risk of Lung Cancer. *Frontiers in Oncology*, 7, 23. <https://10.3389/fonc.2017.00023> [doi]
- Sharpe, J. C., Arnoult, D., & Youle, R. J. (2004). Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1644(2-3), 107-113. <https://10.1016/j.bbamcr.2003.10.016> [doi]
- Shehzad, A., Lee, J., & Lee, Y. S. (2013). Curcumin in various cancers. *BioFactors (Oxford, England)*, 39(1), 56-68. <https://10.1002/biof.1068> [doi]
- Sherif, I. O., & Al-Gayyar, M. M. H. (2018). Oleuropein potentiates anti-tumor activity of cisplatin against HepG2 through affecting proNGF/NGF balance. *Life Sciences*, 198, 87-93. [https://S0024-3205\(18\)30083-3](https://S0024-3205(18)30083-3) [pii]
- Shirzad, H., Niknam, V., Taheri, M., & Ebrahimzadeh, H. (2017). Ultrasound-assisted extraction process of phenolic antioxidants from Olive leaves: a nutraceutical study using RSM and LC-ESI-DAD-MS. *Journal of Food Science and Technology*, 54(8), 2361-2371. <https://10.1007/s13197-017-2676-7> [doi]
- Sirianni, R., Chimento, A., De Luca, A., Casaburi, I., Rizza, P., Onofrio, A., Iacopetta, D., Puoci, F., Ando, S., Maggiolini, M., & Pezzi, V. (2010). Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(6), 833-840. <https://10.1002/mnfr.200900111> [doi]
- Sun, W., Frost, B., & Liu, J. (2017). Oleuropein, unexpected benefits! *Oncotarget*, 8(11), 17409. <https://10.18632/oncotarget.15538> [doi]

- Tagliaferri, C., Davicco, M. J., Lebecque, P., George, S., Amiot, M. J., Mercier, S., Dhaussy, A., Huertas, A., Walrand, S., Wittrant, Y., & Coxam, V. (2014). Olive oil and vitamin D synergistically prevent bone loss in mice. *PloS One*, 9(12), e115817. [https://10.1371/journal.pone.0115817](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115817) [doi]
- Torre, E. (2017). Molecular signaling mechanisms behind polyphenol-induced bone anabolism. *Phytochemistry Reviews : Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 16(6), 1183-1226. [https://10.1007/s11101-017-9529-x](https://doi.org/10.1007/s11101-017-9529-x) [doi]
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., & La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 18(1), 98-112. [https://10.1079/NRR200495](https://doi.org/10.1079/NRR200495) [doi]
- Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 3(11), 697-707. [https://10.1046/j.1365-2443.1998.00223.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1998.00223.x) [doi]
- Turati, F., Bravi, F., Polesel, J., Bosetti, C., Negri, E., Garavello, W., Taborelli, M., Serraino, D., Libra, M., Montella, M., Decarli, A., Ferraroni, M., & La Vecchia, C. (2017). Adherence to the Mediterranean diet and nasopharyngeal cancer risk in Italy. *Cancer Causes & Control : CCC*, 28(2), 89-95. [https://10.1007/s10552-017-0850-x](https://doi.org/10.1007/s10552-017-0850-x) [doi]
- Unger, T., Mietz, J. A., Scheffner, M., Yee, C. L., & Howley, P. M. (1993). Functional domains of wild-type and mutant p53 proteins involved in

transcriptional regulation, transdominant inhibition, and transformation suppression. *Molecular and Cellular Biology*, 13(9), 5186-5194.

Vadde, R., Radhakrishnan, S., Reddivari, L., & Vanamala, J. K. (2015). Triphala Extract Suppresses Proliferation and Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Stem Cells via Suppressing c-Myc/Cyclin D1 and Elevation of Bax/Bcl-2 Ratio. *BioMed Research International*, 2015, 649263. <https://10.1155/2015/649263> [doi]

van den Brandt, P. A., & Schulp, M. (2017). Mediterranean diet adherence and risk of postmenopausal breast cancer: results of a cohort study and meta-analysis. *International Journal of Cancer*, <https://10.1002/ijc.30654> [doi]

Veronese, N., Stubbs, B., Noale, M., Solmi, M., Luchini, C., Smith, T. O., Cooper, C., Guglielmi, G., Reginster, J. Y., Rizzoli, R., & Maggi, S. (2016). Adherence to a Mediterranean diet is associated with lower prevalence of osteoarthritis: Data from the osteoarthritis initiative. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, [https://S0261-5614\(16\)31279-1](https://S0261-5614(16)31279-1) [pii]

Vogel, P., Kasper Machado, I., Garavaglia, J., Zani, V. T., de Souza, D., & Morelo Dal Bosco, S. (2014). Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health. *Nutricion Hospitalaria*, 31(3), 1427-1433. <https://10.3305/nh.2015.31.3.8400> [doi]

Wang, J., Chen, P., Jiang, W., & Gong, M. (2017). Experimental study on curcumin inhibiting proliferation and invasion of human osteosarcoma cells. *Biomedical Research*, 28(10), 4396-4401.

- Wang, W., Wu, J., Zhang, Q., Li, X., Zhu, X., Wang, Q., Cao, S., & Du, L. (2019). Mitochondria-mediated apoptosis was induced by oleuropein in H1299 cells involving activation of p38 MAP kinase. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(4), 5480-5494. <https://doi.org/10.1002/jcb.27827> [doi]
- Waterman, E., & Lockwood, B. (2007). Active components and clinical applications of olive oil. *Alternative Medicine Review : A Journal of Clinical Therapeutic*, 12(4), 331-342.
- Wu, J., Ding, M., Mao, N., Wu, Y., Wang, C., Yuan, J., Miao, X., Li, J., & Shi, Z. (2017). Celastrol inhibits chondrosarcoma proliferation, migration and invasion through suppression CIP2A/c-MYC signaling pathway. *Journal of Pharmacological Sciences*, 134(1), 22-28. [https://doi.org/S1347-8613\(17\)30057-9](https://doi.org/S1347-8613(17)30057-9) [pii]
- Xia, P., Sun, Y., Zheng, C., Hou, T., Kang, M., & Yang, X. (2015). p53 mediated apoptosis in osteosarcoma MG-63 cells by inhibition of FANCD2 gene expression. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(7), 11101-11108.
- Yan, C. M., Chai, E. Q., Cai, H. Y., Miao, G. Y., & Ma, W. (2015). Oleuropein induces apoptosis via activation of caspases and suppression of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in HepG2 human hepatoma cell line. *Molecular Medicine Reports*, 11(6), 4617-4624. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3266> [doi]
- Yao, J., Wu, J., Yang, X., Yang, J., Zhang, Y., & Du, L. (2014). Oleuropein induced apoptosis in HeLa cells via a mitochondrial apoptotic cascade

associated with activation of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Journal of Pharmacological Sciences*, 125(3), 300-311.

<https://DN/JST.JSTAGE/jphs/14012FP> [pii]

Yip, K. W., & Reed, J. C. (2008). Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*, 27(50), 6398-6406. <https://10.1038/onc.2008.307> [doi]

Yu, D., An, F., He, X., & Cao, X. (2015). Curcumin inhibits the proliferation and invasion of human osteosarcoma cell line MG-63 by regulating miR-138. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(11), 14946-14952.

Zamora-Ros, R., Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventos, R. M., Berenguer, T., Jakszyn, P., Barricarte, A., Ardanaz, E., Amiano, P., Dorronsoro, M., Larranaga, N., Martinez, C., Sanchez, M. J., Navarro, C., Chirlaque, M. D., Tormo, M. J., Quiros, J. R., & Gonzalez, C. A. (2010). Estimation of dietary sources and flavonoid intake in a Spanish adult population (EPIC-Spain). *Journal of the American Dietetic Association*, 110(3), 390-398. <https://10.1016/j.jada.2009.11.024> [doi]

Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D. P., Li, S., Chen, Y. M., & Li, H. B. (2016). Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. *Nutrients*, 8(8), 10.3390/nu8080515. <https://10.3390/nu8080515> [doi]