

Efecto de la Melatonina asociada a la Capecitabina en el cáncer de páncreas experimental

Autora: REYES VAZQUEZ EZQUERRA.

Directores: F.JAVIER PADILLO

F.JAVIER BRICEÑO

PEDRO MONTILLA

TITULO: *EFEECTO DE LA MELATONINA ASOCIADA A LA CAPECITABINA EN
EL CÁNCER DE PANCREAS EXPERIMENTAL*

AUTOR: *REYES VAZQUEZ EZQUERRA*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2008
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ISBN-13: 978-84-7801-918-2
D.L.: CO-72/2009

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis compañeros y amigos, Juan, Lola, Eva, Álvaro y David...por nuestro trabajo en equipo.

Gracias a mi director de tesis, Javier, por el ánimo y apoyo.

Gracias a Isaac Túnez, MCarmen Villanueva y Fernando López Rubio, por su gran colaboración.

Y gracias a mi familia, por ser mi pilar de apoyo, como siempre...

Indice

| | |
|--|----|
| I.- INTRODUCCION | |
| I-1. ASPECTOS GENERALES DEL CANCER DE PANCREAS | 17 |
| • EPIDEMIOLOGÍA | |
| • FACTORES ETIOLOGICOS | |
| • ANATOMIA PATOLOGICA | |
| I-2. RADICALES LIBRES: ESTRÉS OXIDATIVO | 27 |
| I-3. ESTRÉS OXIDATIVO Y DESARROLLO DE CANCER. IMPLICACION EN EL CANCER DE PANCREAS | 49 |
| I-4. TERAPEUTICA ANTIOXIDANTE. PAPEL EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER | 55 |
| I-5 . MELATONINA. FUNDAMENTOS Y SU UTILIZACION COMO TERAPEUTICA EN EL CANCER | 65 |
| I-6. TRATAMIENTO DEL CANCER DE PANCREAS TRATAMIENTO QUIRURGICO TRATAMIENTO NO QUIRURGICO | 79 |
| I-7. CAPECITABINA EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER DE PANCREAS | 85 |
| I-8.- MELATONINA EN EL CANCER DE PANCREAS | 87 |
| II. HIPÓTESIS DE TRABAJO | 89 |
| III. OBJETIVOS | 93 |

8

| | |
|----------------------------------|-----|
| IV.- MATERIAL Y METODO | 96 |
| V. RESULTADOS | 117 |
| VI. DISCUSIÓN | 139 |
| VII. CONCLUSIONES | 152 |
| VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 155 |

Indice de Abreviaturas

ADN : Ácido desoxirribonucleico

AIP: Acido 3-indol propiónico

AMP : Adenosin monofosfato

AMPc : Adenosin monofosfato cíclico

AMK: N1-acetil-5-metoxikinuramina

APC: gen de la poliposis cólica familiar

ATP : Adenosin trifosfato

BOP: N-nitrosobis(2- oxopropyl)amina

C : Factor de complemento

Ca : Calcio

CAT : Catalasa

c-erb-2 (HER2): receptor relacionado con EGFR

c-erb-3 (HER3):receptor relacionado con EGFR

c-erb-4 (HER4):receptor relacionado con EGFR

C1 : Cloro

Cu : Cobre

DCC: gen delecionado en el cáncer colorrectal

DMPO : Dimetil-pirrol-N-óxido

DMSO : Dimetilsulfóxido

EDTA : Ácido etilendiaminotetracético

EGFR: Familia del receptor de crecimiento epidérmico.

ELAM : Molécula de adhesión endotelial leucocitaria

ELISA : Técnica de radioinmunoanálisis

FEM : Factor estimulador de la monopoyesis

Fe : Hierro

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

FGFR: Receptores de FGF

5-FU: 5-fluoruracilo

gr: Gramo

G-CSF : Factor estimulador de colonia de granulocitos

GMPc : Guanosin monofosfato cíclico

- GM-CSF** : Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos
- GSH** : Glutación reducido
- GSH-Px** : Glutación peroxidasa
- GSSG** : Glutación oxidado
- GSSG-Rd** : Glutación reductasa
- H** : Hidrógeno
- HDL**: lipoproteína de alta densidad
- HLA** : Antígenos de histocompatibilidad
- H₂O₂** : Peróxido de Hidrógeno
- ICAM** : Molécula de adhesión intercelular
- IL** : Interleukina
- IFN** : Interferón
- K** : Potasio
- LDL**: lipoproteína de baja densidad
- M** : Molar
- M-CSF** : Factor estimulador de colonias de monocitos
- MDA+4HNE** : Lipoperóxidos malondialdehído + 4-hidroxinonales
- MEL** : Melatonina
- mg** : Miligramo
- µg** : Microgramo
- µl** : Microlitro
- µM** : Micromol
- min** : Minuto
- ml** : Mililitro
- ML1**: receptor de melatonina de alta afinidad
- ML2**: receptor de melatonina de baja afinidad
- mmol** : Milimoles
- MMPT**: Transición de permeabilidad de membrana mitocondrial
- Mn** : Manganeso
- Na** : Sodio
- NAC** : N-acetilcisteína

NAD : Nicotinamida adenín dinucleótido
NADH : Nicotinamida adenín dinucleótido reducido
NADPH : Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido
NK : Natural Killer
NO : Óxido nítrico
NO· : Radical óxido nítrico
NOs : Óxido nítrico sintasa
O₂⁻ : Radical superóxido
OH· : Radical hidróxilo
ONOO-: Anión Peroxinitrito
ONOOH: Ácido Peroxinitroso
OTC : Ácido L-2-oxotiazolidin-4-carboxílico
3-OHM: 3-hidroximelatonina.
8-OHdG : 8 - hidroxideoxiguanoxina
PAF : Factor activador de plaquetas
PCR: reacción en cadena de polimerasa
PG : Prostaglandinas (PGD2, PGE2, PGF2)
PGI₂ : Prostaciclína
PMN : Polimorfonucleares

PPF: Fracción proteíca del plasma
RB1: Gen del Retinoblastoma.

RIA : Radioinmunoanálisis
RLO : Radicales libres de oxígeno
RNA : Ácido ribonucleico
RNA_m : Ácido ribonucleico mensajero
rpm : revoluciones por minuto
SH: sulfídrico
SOD : Superóxido dismutasa
SMAD4: gen deletado del carcinoma de páncreas

14

TGF- α : Factor transformador del crecimiento α

TGF- β : Factor transformador del crecimiento β

TNF : Factor de necrosis tumoral

U : Unidad

UI : Unidad internacional

vs : Versus

XD : Xantina deshidrogenasa

XO : Xantina oxidasa

Zn : Zinc

Introducción

I-1.- ASPECTOS GENERALES DEL CANCER DEL PANCREAS

EPIDEMIOLOGIA

1- **INCIDENCIA Y PREVALENCIA:** El cáncer de páncreas es la quinta causa de muerte por cáncer en los países desarrollados¹ y el décimo cáncer más común en Europa². En 2002 se diagnosticaron más de 78.000 nuevos casos de cáncer de páncreas en Europa y cada año alrededor de 82.000 personas fallecen por esta causa.

El cáncer de páncreas ha incrementado su incidencia 2 a 3 veces desde 1.930^(1,2). En Estados Unidos se presentan 10 nuevos casos por cada 100.000 habitantes al año^(2,3). En nuestro país se ha observado igualmente esta tendencia en las últimas décadas, apreciándose una disminución progresiva en la separación de las curvas de incidencia del cáncer gástrico, de colon y pancreático, en base, fundamentalmente, a un incremento de los tumores pancreáticos^(4,5).

2- **EDAD:** La incidencia de cáncer de páncreas aumenta con la edad⁽⁶⁾. La mayoría de estadísticas coinciden en que la media de edad de presentación del cáncer de páncreas se encuentra alrededor de los 60 años⁽⁷⁻⁹⁾. Por debajo de 40 años su incidencia es inferior al 2%⁽¹⁰⁾.

Respecto a la relación edad/sexo se ha observado un aumento en la media de edad en las mujeres, oscilando alrededor de los 70 años^(3,11).

3- **SEXO:** El cáncer de páncreas presenta un predominio por el sexo masculino con proporción de 1.5/1^(7,11,12).

4- **RAZA**; Se considera que el cáncer de páncreas tiene una mayor incidencia en individuos de raza negra ⁽¹³⁻¹⁵⁾, si bien estas diferencias parecen estar relacionadas más directamente con factores ambientales que actúan sobre el individuo que los factores propiamente genéticos ⁽¹⁶⁾.

FACTORES ETIOLOGICOS

1- TABACO; Clásicamente, el tabaco ha sido considerado como un factor potencialmente cancerígeno en los tumores pancreáticos ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Estudios posteriores han concluido que el tabaco es el único factor de riesgo implicado en la etiología de este tumor que ha podido ser claramente establecido ⁽¹⁹⁾. Existe una relación dosis-dependiente, que disminuye cuando el consumo de tabaco es muy elevado momento en el que aumenta la mortalidad por otras enfermedades relacionadas con el tabaco ^(20,21). No se han encontrado diferencias entre los distintos tipos de tabaco. Entre los posibles cancerígenos encontrados en el humo del tabaco destacan los fluorantrenos, benzopireno y las nitrosaminas ⁽²²⁾.

2- DIETA; Se ha relacionado la ingesta de café ^(23,24) y de alcohol ^(21,25) con una mayor incidencia de cáncer de páncreas, si bien esta relación no ha podido ser demostrada ⁽²⁶⁾.

En un reciente estudio ⁽²⁷⁾ se ha observado que el consumo de abundantes productos ricos en proteínas vegetales tales como lentejas, guisantes, judías así como las frutas reducían significativamente el riesgo de padecer esta enfermedad.

3- SUSTANCIAS INDUSTRIALES; Se han comunicado una mayor prevalencia en trabajadores del metal e industrias químicas en las que se manejan sustancias alquilantes, naftalina B, bencidina y asbesto ^(3,,20,27), sobre todo en personas con más de 10 años de trabajo.

4- ENTIDADES CLINICAS ASOCIADAS:

- **Pancreatitis Crónica.** Se ha observado una asociación clínica entre la pancreatitis crónica calcificante y el cáncer de páncreas tipo ductal relacionado con la obstrucción de los conductos pancreáticos, como paso previo al desarrollo de hipertrofia pancreática ^(3,28). No ha podido ser demostrado estadísticamente que exista tal predisposición ⁽²⁰⁾.

- **Diabetes.** Al igual que ocurre con la pancreatitis crónica, se ha observado que la frecuencia de cáncer de páncreas es dos veces mayor en los pacientes con diabetes mellitus ^(29,30) difícil establecer una relación causa-efecto, puesto que el cáncer de páncreas puede condicionar una diabetes o intolerancia a la sobrecarga de glucosa que ocurriría en el 20% de casos.

- **Litiasis biliar.** En series de autopsias se ha observado que un 14% de los varones y un 40% de mujeres fallecidas por este tumor tenían litiasis biliar. Así mismo, un 15% de pacientes diagnosticados de este proceso habían sido sometidos a colecistectomía previamente ⁽²⁰⁾.

En un intento de explicar la génesis de la transformación tumoral de las células pancreáticas, **ROSENBERG** ⁽³¹⁾ provocó experimentalmente la obstrucción del conducto pancreático, comprobando cómo el estancamiento de la secreción pancreática origina hiper y metaplasia ductal.

ANATOMIA PATOLOGICA

I- CLASIFICACION HISTOPATOLOGICA.

Analizaremos la clasificación propuesta por **LEGG** ⁽³²⁾ en 1.983, bastante similar al esquema clásico propuesto por **CUBILLA** y **FITZGERALD** (1.979) ⁽³³⁾, que dividen los tumores del páncreas exocrino según su procedencia.

I-A. ORIGEN EN LA CELULA DUCTAL.

De él derivan el 90% de los tumores pancreáticos ^(20,33).

1- Adenocarcinoma: Es la variedad más frecuente y supone el 75-80% de los tumores malignos del páncreas exocrino ^(20,32) (Figura 1). Puede aparecer en cualquier localización, si bien en el 65% de casos asienta en la cabeza de la glándula ^(29,34).

Tiene un carácter infiltrativo, siendo difícil definir sus límites. Esta invasión se haría preferentemente por vía perineural, lo que explicaría la alta incidencia de dolor abdominal en estos pacientes.

A menudo está rodeado de una zona de pancreatitis crónica que puede constituir hasta dos terceras partes del volumen inicialmente atribuido al tumor ^(34,35).

Histológicamente están conformados por estructuras glandulares o cordones celulares, preferentemente poco diferenciados (63% en grados III y IV de BRODES) ⁽³²⁾.

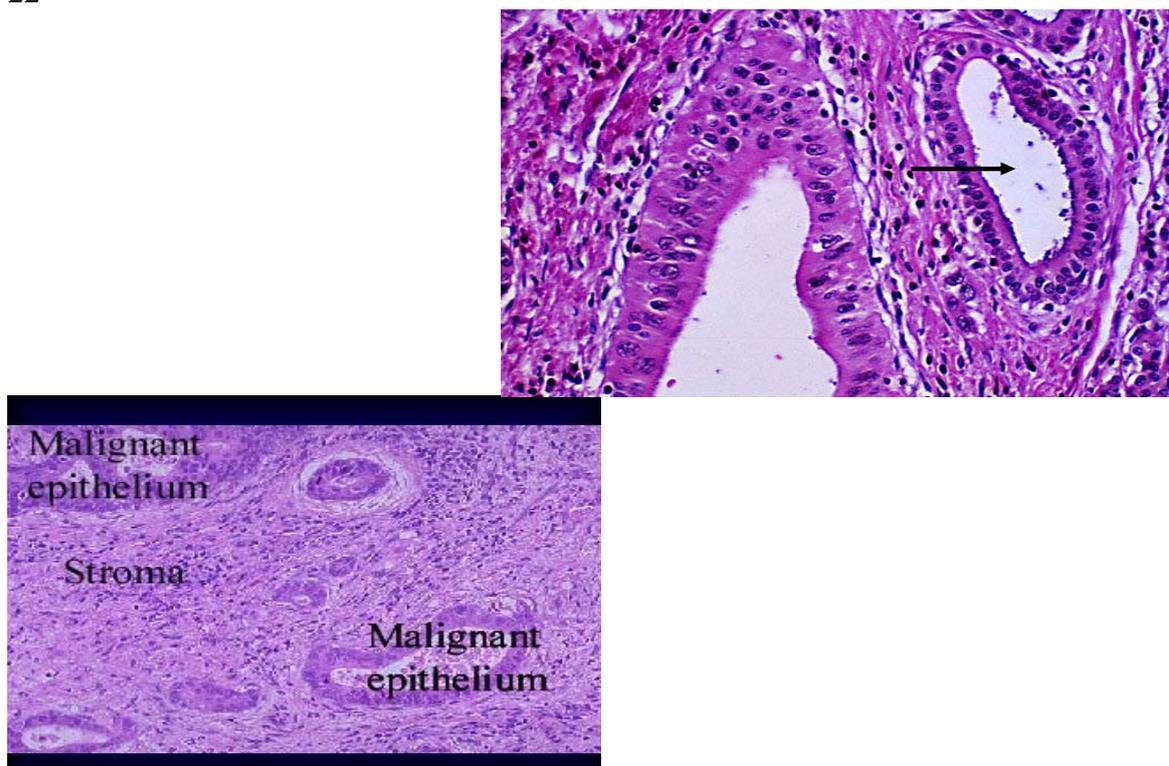


Figura 1.- Cortes histológicos de cáncer de páncreas

2- Carcinoma de células escamosas (Epidermoide). Se presenta en la mayoría de las ocasiones con un patrón mixto, asociado a células ductales y su pronóstico es similar al adenocarcinoma.

3- Carcinoma de células gigantes. Suponen menos del 5% de los tumores exocrinos pancreáticos. Está formado por células acidófilas, pleomórficas y con escaso estroma.

4- Carcinosarcoma. Constituido por tejido conectivo y epitelial.

5- Cistoadenocarcinoma mucinoso. Presentan quistes uni o multiloculares rellenos de moco y con un epitelio de revestimiento bien diferenciado. También pueden apreciarse prolongaciones papilares desde el epitelio de revestimiento a la luz del quiste.

I-B ORIGEN EN LA CELULA ACINAR.

Adenocarcinoma de células acinares. Constituye el 1% de los tumores malignos exocrinos. Está formado por células polimórficas que adoptan un patrón alveolar.

I-C ORIGEN INDETERMINADO.

1- Carcinoma papilar y quístico. Su origen es controvertido, pudiendo representar una variedad de carcinoma de células acinares o bien una entidad de origen diferente. Se presenta en edades más jóvenes que el adenocarcinoma y afecta con mayor frecuencia al sexo femenino.

2- Pancreatoblastoma. Se presenta en la infancia, y recuerda en su morfología a estructuras pancreáticas fetales.

3- Carcinoma indiferenciado. En él se engloban los tumores de origen epitelial en los que las células no muestran ningún tipo de diferenciación estructural. Son muy agresivos.

I-D ORIGEN CONECTIVO

Son muy raros. En ocasiones se trata de tumores retro-peritoneales con extensión al páncreas.

I-E METASTASICOS.

Los tumores que desarrollan más metástasis en el páncreas son los de pulmón, estómago, colon, mama o riñón.

II- LOCALIZACION

El adenocarcinoma se localiza con mayor frecuencia en la cabeza del páncreas, a la que corresponde del 60-65% de los casos ^(29,35,36). En el cuerpo se localizan en un 13% y en un 5% en la cola. En el 21-24% de casos se presenta como una afectación multifocal ^(37,38).

El cistoadenocarcinoma, segundo tumor en importancia, se localiza con más frecuencia en el cuerpo y cola de la glándula ^(32,39).

El tamaño de la lesión varía según la localización. Los de localización cefálica llegan a alcanzar 5 cm. de diámetro, mientras que los localizados en el cuerpo o cola alcanzan diámetros de 10 cm. Estas diferencias se atribuyen a que los tumores localizados en la cabeza del páncreas provocan sintomatología más precoz que las lesiones del cuerpo y cola con lo que se diagnostican antes.

III- VIAS DE PROPAGACION.

En el momento del diagnóstico, tan sólo un 10% de los tumores se encuentran limitados al páncreas ^(20,34). La diseminación tumoral se lleva a cabo:

1- Por propagación directa: siendo el colédoco el órgano afectado con mayor frecuencia, seguido del duodeno ⁽⁴⁰⁾. También se afectan el eje espleno-porto-meseraico, el retroperitoneo y bazo (Figura 2).

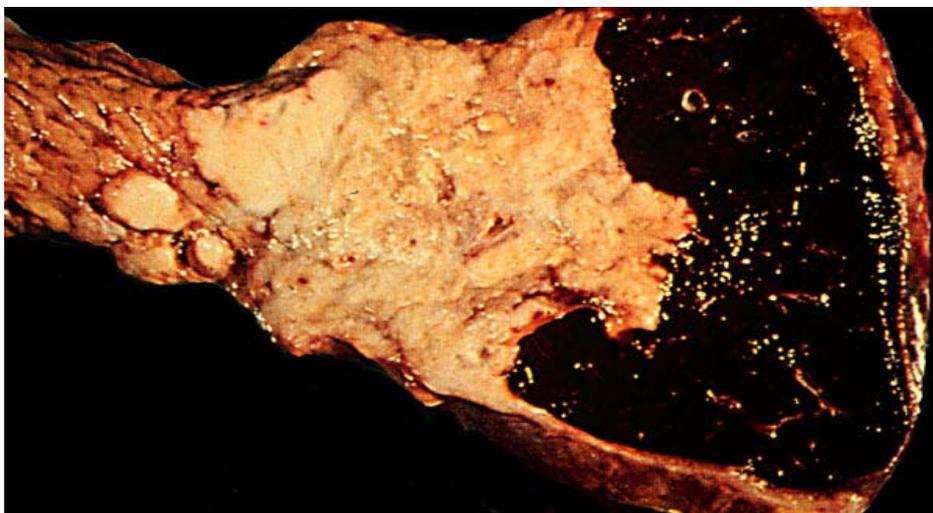


Figura 2.- Invasión esplénica por adenocarcinoma de páncreas.

2- Invasión linfoganglionar: Los ganglios más frecuente-mente afectados son ^(40,41):

- A- Superiores: Gástricos; Superiores de cabeza y cuerpo.
- B- Inferiores: de cabeza y cuerpo.

- C- Anteriores: Pancreaticoduodenales anteriores, pilóricos y mesentéricos.
- D- Posteriores: Pancreaticoduodenales posteriores y coledocianos.
- E- Esplénicos: De cola de páncreas y de hilio esplénico.

3- Invasión vascular: dando lugar a metástasis a distancia. El hígado es el órgano más frecuentemente invadido (65-71%) (Figura 3) pudiendo afectar también a pulmón, suprarrenal, bazo o riñón ^(42,43).

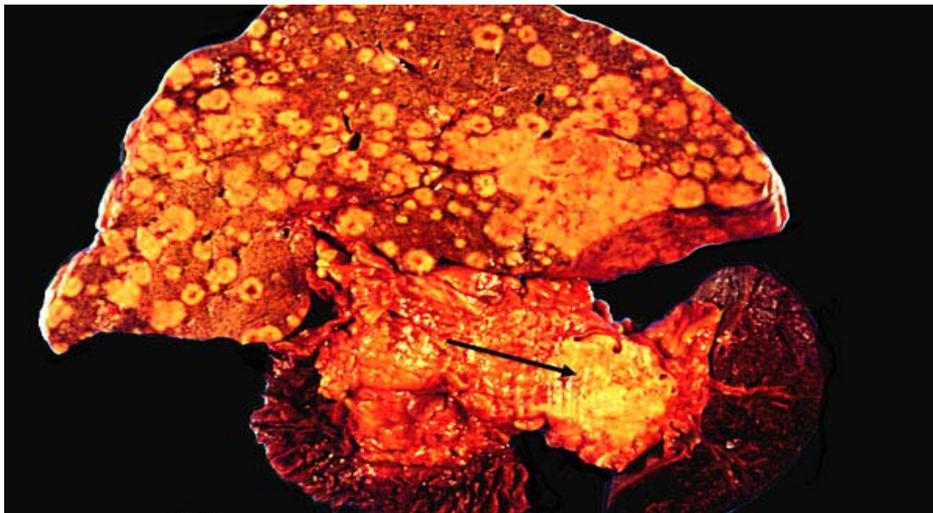


Figura 3.- Tumor de páncreas con metástasis hepáticas

4- Invasión perineural: a la que algunos autores dan gran relevancia al ser responsable del dolor abdominal que presentan estos pacientes.

I.2.- RADICALES LIBRES DE OXÍGENO: EL ESTRÉS OXIDATIVO

CONCEPTO Y ORIGEN DE LOS RADICALES LIBRES DE OXÍGENO

El descubrimiento del oxígeno fue llevado a cabo por Sheele y Joseph Priestley en 1775⁽⁴⁴⁾. Los primeros experimentos controlados que demostraron el efecto tóxico del oxígeno sobre los organismos animales fueron realizados por Paul Bert a finales del siglo XIX. Sin embargo, Sheele ya describe por primera vez los efectos negativos del oxígeno sobre los seres vivos en 1777⁽⁴⁵⁾. A pesar de la gran acumulación de descripciones sobre los efectos nocivos del oxígeno a diferentes niveles, durante mucho tiempo se careció de teorías que pudiesen explicar su toxicidad. La mayor parte del daño oxidativo en los sistemas biológicos se debe a que la utilización del oxígeno por las células da lugar a la generación de RLO⁽⁴⁶⁾. La teoría de la toxicidad del oxígeno por RLO fue propuesta por primera vez por la investigadora argentina Rebeca Gershman en 1954⁽⁴⁷⁾ aunque no recibió un impulso definitivo hasta el descubrimiento de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en 1969 por Joe McCord e Irving Fridovic⁽⁴⁸⁾, lo que puso de manifiesto la existencia y relevancia de un radical libre (el superóxido) en las células aerobias; según esta teoría, la toxicidad del oxígeno es debida a la formación en exceso de radicales superóxidos y que la enzima SOD es un importante medio de defensa antioxidante^(49,50). A pesar de que el oxígeno es indispensable para la vida aeróbica, tiene características tóxicas y su uso en los procesos metabólicos solo es posible si los organismos cuentan con una batería de moléculas que los protejan de los RLO.

Un radical libre es cualquier átomo o molécula que contenga uno o más electrones no apareados (número total impar de electrones) ⁽⁵¹⁾. Los radicales son por lo general muy reactivos ya que desencadenan reacciones en cadena que pueden dañar los diferentes constituyentes de los organismos vivos.

El oxígeno molecular es fundamentalmente un birradical, ya que contiene dos electrones no apareados en su orbital externo, lo que impide que capte dos electrones simultáneamente en las reacciones en las que interviene, ya que un donador de un par de electrones cede necesariamente un par antiparalelo; por esta razón solo puede intervenir en reacciones univalentes y aceptar los electrones de uno en uno. Si al oxígeno molecular se le suministra energía suficiente, uno de sus electrones desapareados sufre una inversión de espín quedando ambos antiparalelos, lo que le confiere una gran reactividad (oxígeno singlete), aunque la mayoría de autores han dejado de considerar al singlete como iniciador biológico del daño oxidativo⁽⁴⁶⁾.

El oxígeno en estado basal debe ser previamente activado para manifestar su toxicidad.

Esta activación puede hacerse por varias vías:

- Activación fotodinámica dando como resultado fundamentalmente oxígeno singlete.
- Reducción con formación secuencial del anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($OH\cdot$); este último es la especie química más reactiva del mundo biológico.



- Dicha reducción está acelerada en presencia de metales de transición como el hierro o el cobre. Estas activaciones intervienen en los diferentes compartimentos celulares (mitocondrias, microsomas, peroxisomas y

membrana citoplasmática)⁽⁴⁹⁾.

TIPOS DE REACCIÓN DE LOS RLO

1. Radical más radical

Los RLO buscan con avidez completar su par electrónico que puede lograrse mediante una reacción entre dos radicales a través de un enlace covalente. De este modo pueden combinarse el superóxido y el óxido nítrico:

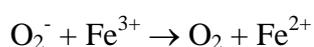


2. Radical más no-radical

La mayoría de las moléculas en el organismo no son radicales. Por lo tanto cualquier radical libre generado tiene probabilidad de reaccionar con una molécula no-radical⁴⁸; este mecanismo puede dar lugar a reacciones en cadena, cuyo resultado es la formación de nuevos radicales. El ataque de radicales reactivos a lipoproteínas de membrana da lugar al inicio de la peroxidación lipídica; en estas reacciones los RLO sustraen un átomo de hidrógeno de la cadena lateral de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana de lipoproteínas que deja un carbono con un electrón no apareado; al final, la reacción de un radical libre reactivo puede oxidar múltiples cadenas laterales de ácidos grasos a lipoperóxidos, dañando las proteínas de membrana y eventualmente causando descomposición completa de las membranas. Si los radicales hidroxilo son generados cerca del ácido desoxirribonucleico (ADN), ellos pueden atacar las bases púricas y pirimidínicas causando mutaciones⁽⁵²⁾.

3. Los metales de transición fomentan las reacciones de RLO

Varias sales de metales de transición reaccionan con H_2O_2 para formar $\text{OH}\cdot$, pero en cuanto a la posibilidad de generar $\text{OH}\cdot$ *in vivo* la atención ha sido dirigida al hierro. Las sales ferrosas reaccionan con H_2O_2 para formar $\text{OH}\cdot$ por la llamada reacción de Haber-Weiss o de Fenton:



En esta reacción, el superóxido reduce el hierro férrico a ferroso, y éste reduce monoelectronicamente al peróxido de hidrógeno, dando lugar al altamente reactivo radical hidroxilo.

Ha sido argumentado que, lo mismo que el estrés oxidativo puede causar una elevación del Ca^{2+} libre intracelular que interfiere con los mecanismos de secuestro de Ca^{2+} , el estrés oxidativo puede incrementar las concentraciones de ión hierro dentro de las células que pueden catalizar reacciones de RLO. Ferrari y cols. ⁽⁵³⁾ han demostrado que la liberación de ión hierro juega un importante papel en la mediación de los efectos tóxicos del alcohol en ratones. La importancia de los iones hierro en la mediación del daño oxidativo lleva a cuestionar de qué forma este metal puede ser capaz de catalizar reacciones de radicales *in vivo* ⁽⁵⁰⁾.

El metabolismo del hierro está sometido a una estrecha regulación. Así, la utilización tanto de proteínas transportadoras (transferrina) como formas de almacenaje (ferritina y hemosiderina) han permitido minimizar la cantidad de hierro libre en los fluidos

extracelulares y en el interior de las células. Sin embargo, el estrés oxidativo puede, por sí mismo, suministrar hierro para las reacciones de RLO. Así el O_2^- puede movilizar hierro de la ferritina, aunque la cantidad de hierro liberado por el superóxido es pequeña, ya que el hierro unido a ferritina es mucho más seguro que la cantidad equivalente de hierro libre (55).

PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE RLO

Los radicales o prorradicales más abundantes y reactivos en los sistemas biológicos son el oxígeno molecular (O_2) y los productos de su reducción tetravalente en agua, esto es, el O_2^- , el H_2O_2 y el $OH\cdot$.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), al igual que otros peróxidos orgánicos como los lipoperóxidos, no es propiamente un radical libre, pues no posee electrones desapareados, pero tiene una alta tendencia a transformarse en ellos e inducir reacciones oxidativas en cadena al aceptar fácilmente electrones procedentes de metales reducidos como el Fe^{2+} y el Cu^+ (56).

El anión superóxido resulta de la unión de un electrón al oxígeno molecular. Es en general poco reactivo. Algunas moléculas de superóxido son la consecuencia de “accidentes químicos”, en los cuales muchas moléculas del organismo reaccionan directamente con el oxígeno dando lugar al O_2^- (ej. catecolaminas, tetrahidrofolatos). Otra parte importante de la producción de superóxido es realizado deliberadamente; por ejemplo, los fagocitos activados generan gran cantidad de superóxido como parte de los mecanismos mediante los cuales los cuerpos extraños son destruidos; esta es la fuente más importante de

producción de radicales superóxidos *in vivo*: la descarga respiratoria (aumento súbito del consumo de oxígeno) de las células fagocitarias activadas al contacto con partículas extrañas. En la membrana citoplasmática de estas células se encuentra un complejo enzimático denominado nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado (NADPH), oxidasa que cataliza la reacción $2O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow 2O_2^- + NADP^+$.

La presencia en el citoplasma del fagocito de la enzima SOD, produce la siguiente reacción: $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$

El aumento del consumo de oxígeno en la descarga respiratoria está destinado a producir una gran cantidad de metabolitos del oxígeno (radical O_2^- , H_2O_2 y singlete de oxígeno) que tienen poder bactericida, aún cuando no todos sean propiamente radicales; también está aumentado el consumo de oxígeno en la inflamación crónica.

Una pequeña proporción de O_2 utilizado en la respiración mitocondrial, escapa como superóxido (1-2 % del oxígeno consumido). Dado que el organismo consume una gran cantidad de oxígeno, si el 1% del O_2 utilizado en la respiración se transforma en O_2^- se calcula que podremos producir alrededor de 0.15 mol/día, es decir, dos kilos de superóxido al año. Por lo tanto, los RLO representan la mayor cantidad de metabolitos del organismo⁵³. Por el contrario, Barja y cols.⁽⁴⁶⁾ opinan que en los tejidos sanos, la fuente principal de RLO son las mitocondrias; esto se debe a que estos orgánulos son responsables de más del 90% del consumo del oxígeno celular y a que los RLO en los sistemas biológicos proceden siempre en último término del metabolismo del oxígeno por la vía univalente.

Radical hidroxilo: El H_2O_2 , a pesar de no ser en sí un radical, tiene gran importancia, ya que en presencia de los metales de transición cobre o hierro da lugar a la reacción de Fenton (descrita en 1894): $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH\cdot$, con la producción del $OH\cdot$.

La coexistencia del O_2^- y de H_2O_2 , en un medio biológico que inevitablemente contiene hierro, es muy peligrosa, ya que el $OH\cdot$ formado es un oxidante extremadamente reactivo que interacciona con casi todas las moléculas que se encuentran en el organismo a velocidades solo limitadas por su difusión. Este terrible radical *in vivo* tiene un tiempo de vida muy corto porque reacciona en el lugar de su formación, normalmente dejando detrás un legado de reacciones en cadena que propagan RLO ⁽⁵²⁾.

Singlete de oxígeno: No constituye un radical en sí, pero por su gran reactividad participa en muchas reacciones en las que interviene el oxígeno molecular. Además, tiene gran capacidad oxidante frente a muchas moléculas biológicas, sobre todo lípidos de las membranas y tiende a formarse en grandes cantidades en los tejidos.

Óxido Nítrico: $NO\cdot$ es sintetizado por el endotelio vascular como factor relajante, aunque también por fagocitos y por el cerebro. Aunque su función es fisiológica, un exceso de óxido nítrico puede ser tóxico para las células. El óxido nítrico es una molécula con un electrón único desapareado, por lo tanto un radical libre. Si hay una sobreproducción de $NO\cdot$, se puede producir un daño en los tejidos. La sobreproducción de $NO\cdot$ ha sido implicada en el daño producido por la isquemia-reperfusión, shock séptico, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide o la enfermedad inflamatoria intestinal ⁽⁵⁷⁾.

Los radicales libres y otras especies oxigenadas reactivas proceden de fuentes metabólicas endógenas o de agresiones oxidativas externas ⁽⁵⁶⁾.

*** Fuentes endógenas de producción de radicales libres :**

34

- 1) La cadena electrónica mitocondrial, en la que una mayor proporción de anión superóxido escaparía al control de los citocromos ⁽⁵⁸⁾.
- 2) Una excesiva actividad de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado (NADPH) oxidasa fagocitaria ⁽⁵⁹⁾.
- 3) La activación del metabolismo del ácido araquidónico en los procesos inflamatorios ⁽⁶⁰⁾.
- 4) La deslocación de metales de transición como el Fe^{2+} y el Cu^+ de sus lugares de depósito, proteínas transportadoras, grupos prostéticos, etc.
- 5) Hiperactividad de la xantina oxidasa que en la reperfusión tras situaciones de isquemia utiliza el O_2 en lugar del NAD^+ para la oxidación citosólica de hipoxantina y xantina hasta ácido úrico con la consiguiente reducción de O_2 en anión superóxido ⁽⁶¹⁾.
- 6) Activación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOs) por acción de citocinas, endotoxinas o del aumento del calcio intracelular ⁽⁶²⁾
- 7) Una deficitaria capacidad de los mecanismos protectores antioxidantes ⁽⁶³⁾.

*** Fuentes exógenas de producción de radicales libres:**

- 1) Radiaciones ionizantes (rayos X, radiación ultravioleta) ⁽⁶⁴⁾.
- 2) Aumento en la disponibilidad de metales de transición como sucede en algunas enfermedades metabólicas (hemocromatosis, enf. Wilson) o en los procesos inflamatorios ⁽⁶⁵⁾.
- 3) La acción de xenobióticos y fármacos con capacidad *redox cycling* o capacidad de generar anión superóxido por acción enzimática a través de la óxido-reducción cíclica de flavoproteínas.

4) El exceso en la concentración de oxígeno o los procesos en que concurren fenómenos de isquemia-reperfusión, como ocurre en ciertos tipos de cirugía ⁽⁶⁶⁾.

El daño de estas especies, por tanto depende de la concentración local que puedan alcanzar, de la capacidad de difusión determinada por su vida media y su solubilidad en el medio, de la capacidad reactiva de la molécula y de los mecanismos amplificadores o neutralizadores del entorno en que se produce la acción oxidativa.

DEFENSAS BIOLÓGICAS CONTRA RLO

Los sistemas de defensa antioxidante se oponen a la acción de los RLO. Algunos son generados en el organismo humano, como p.ej. la enzima superóxido dismutasa; otros, en cambio, proceden de la dieta. El organismo humano no sintetiza una cantidad excesiva de antioxidantes. De hecho, aparece una especie de balance en el organismo entre la producción de RLO y niveles de defensa antioxidante; por lo tanto, el daño oxidativo no es prevenido totalmente.

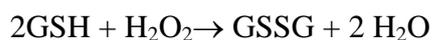
Los seres vivos han desarrollado mecanismos de defensa antioxidantes de protección frente a los RLO. Estas defensas presentan 5 niveles:

1. El primer nivel consiste en evitar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar la reducción tetravalente consecutiva sin liberar los intermediarios. Esto lo logra con gran eficacia el **sistema citocromo-oxidasa**, que origina más del 90% de la reducción del oxígeno en el organismo humano.
2. El segundo nivel lo constituyen las **enzimas especializadas SODs**, que son metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical O_2^- para dar oxígeno molecular y H_2O_2 . En las células de los organismos eucarióticos existen dos subtipos de enzimas. Una es citoplasmática y contiene un átomo de Cu^{2+} y otro de Zn^{2+} en su sitio activo; la otra es mitocondrial y posee Mn^{3+} en su sitio activo. La SOD transforma el superóxido en H_2O_2 : $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ y representa un importante mecanismo antioxidante en los organismos aerobios aunque cantidades excesivas de superóxido dismutasa (en relación con la actividad de enzimas que neutralizan H_2O_2) puede en algunas ocasiones resultar deletéreo ⁽⁶⁷⁾.

3. El tercer nivel de defensa viene dado por un grupo de enzimas especializadas como la **catalasa**, que se encuentra en los peroxisomas y que cataliza la reacción:

$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$, eliminando probablemente el peróxido generado por las enzimas oxidasas peroxisomales.

Otro grupo de enzimas lo constituyen las peroxidases, que catalizan la reducción de H_2O_2 por diversos donadores de electrones. En los mamíferos, la enzima **glutati6n-peroxidasa (GSH-Px)** es la m6s importante ya que cataliza la siguiente reacci6n: $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$. La GSH-Px es la enzima que mejor “scavenging” el H_2O_2 generado por la SOD en el citosol y en la mitocondria, mediante la oxidaci6n del tetrap6ptido GSH (glutati6n reducido) a GSSG (glutati6n oxidado):



De este modo, esta enzima juega un papel muy importante tanto en la detoxificaci6n de H_2O_2 como de hidroper6xidos org6nicos, as6 como en la protecci6n de las membranas lip6dicas contra la oxidaci6n. La GSH-Px presenta selenio en su sitio activo, esencial para su funci6n catal6tica ^(68,69), localizado en el sitio activo de cada una de sus cuatro subunidades ^(70,71).

Esta enzima, junto con la **GSH transferasa** selenio-independiente y la catalasa forman los principales mecanismos de defensa antioxidante solubles en agua en relaci6n con la neutralizaci6n de H_2O_2 y otros per6xidos.

Por otra parte, el GSH est6 ampliamente distribuido en las c6lulas y se encuentra a concentraciones milimolares en todas ellas; particularmente se encuentra a altas concentraciones en el h6gado. El GSH juega un importante papel en la neutralizaci6n de per6xidos y de radicales hidroxilos, asimismo, tambi6n es importante en el mantenimiento del estado reducido de la vitamina E y del 6cido

ascórbico ^(72,73).

Otras defensas antioxidantes son encontradas en el medio extracelular; se incluyen aquí la transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, donde tanto el hierro como el cobre respectivamente no potencian la formación de RLO. Además, la albúmina puede “barrer” radicales y unir iones cobre ⁽⁷⁴⁾.

4. En cuarto nivel, el OH· puede ser neutralizado por la **α-tocoferol**, excelente antioxidante, localizado tanto intracelular como extracelularmente, ya que por su hidrofobicidad se encuentra en las membranas biológicas donde su protección es particularmente efectiva. El α-tocoferol bloquea las reacciones en cadena de la hiperoxidación barriendo radicales peróxidos. El radical tocoferol (T·) es mucho menos reactivo en atacar las cadenas laterales adyacentes de los ácidos grasos y puede ser convertido en α-tocoferol mediante la vitamina C.

5. A pesar de todos los antioxidantes, algunos RLO escapan y pueden causar lesiones. Una vez producido el daño molecular, el quinto nivel de defensa lo constituye la **reparación**; de este modo, el DNA sufre constante daño oxidativo y debe ser reparado ⁽⁵²⁾.

ESTRÉS OXIDATIVO

El llamado estrés oxidativo es un término usado con frecuencia en la literatura y referido a los RLO. A pesar de ser un término vago, es utilizado para medir un grave desequilibrio entre la generación de RLO y sustancias antioxidantes. El estrés oxidativo leve puede llevar a la célula a tener más resistencia para insultos posteriores en una buena regulación de los sistemas de defensa antioxidantes. Por el contrario, si el estrés oxidativo es muy intenso, el daño oxidativo afectaría a todos los componentes de la célula (ADN, lípidos y proteínas). Uno de los resultados es la interferencia con el metabolismo energético celular (síntesis de ATP). Si el estrés oxidativo es particularmente intenso, puede producirse la muerte celular que puede ocurrir por necrosis, pero en determinados tipos celulares como en las neuronas, un insulto leve puede poner en funcionamiento el proceso de apoptosis, activando la vía del suicidio intrínseco presente en todas las células ⁽⁵⁷⁾.

Dado que las defensas antioxidantes no son completamente eficientes, un incremento en la formación de RLO en el organismo llevaría probablemente a un incremento en el daño celular; a esto se refiere el término “estrés oxidativo” ⁽⁷⁵⁾. Los RLO pueden inducir muerte celular mediante necrosis o apoptosis; en este último caso los genes antiapoptosis pueden codificar proteínas barredoras de RLO.

DAÑO BIOLÓGICO MEDIADO POR ESTRÉS OXIDATIVO

El mecanismo fisiopatológico nocivo que puede provocar el estrés oxidativo en los sistemas biológicos deriva de la capacidad que tienen los radicales libres de atacar y reaccionar con componentes moleculares de estructuras celulares como son los lípidos de membrana, las proteínas estructurales y enzimáticas, y los ácidos nucleicos ⁽⁷⁶⁾. Como podemos ver en el siguiente esquema (Figura 4), todos los mecanismos, tanto bioquímicos como funcionales de daño biológico por estrés oxidativo, pueden llevar por diversas vías a la destrucción de la célula bien sea por necrosis o por apoptosis. La exposición a bajas dosis (10-100 μM) de H_2O_2 induce apoptosis en una gran variedad de células, mientras que la exposición a dosis más altas induce necrosis, lo que sugiere que la severidad del insulto determina la forma en que la célula muere ⁽⁷⁷⁾.

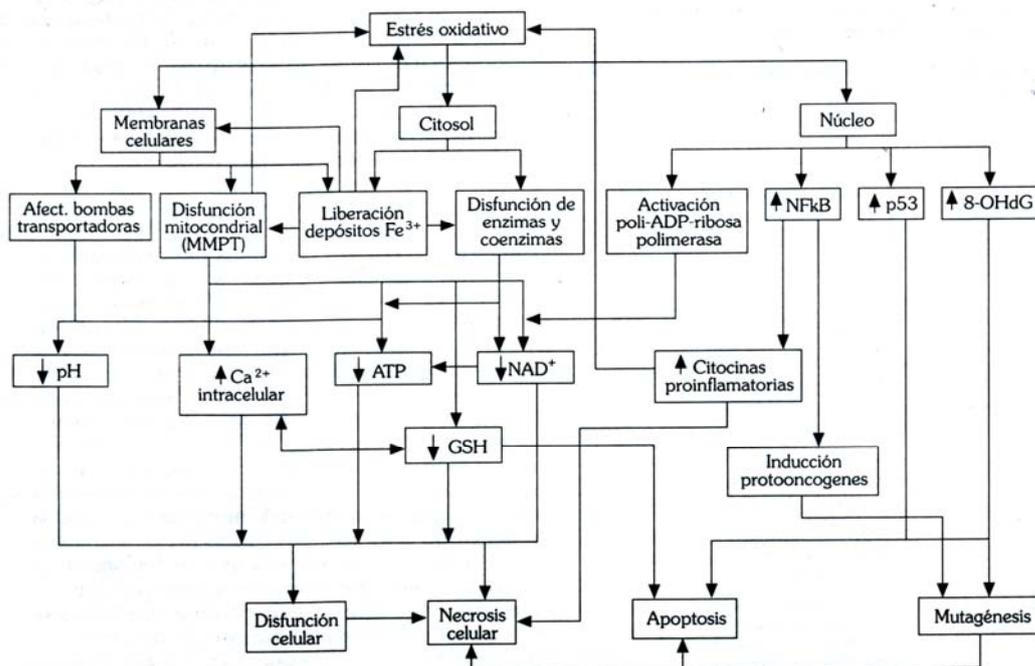


Figura 4. Representación de las complejas vías por las que el estrés oxidativo provoca toxicidad y muerte celular ⁽⁵⁶⁾

El daño por estrés oxidativo en una célula ocurre a diversos niveles que se pueden simplificar de la manera siguiente:

Ataque sobre membranas celulares y subcelulares

Provoca los siguientes efectos:

- 1) Alteración de las propiedades fisicoquímicas de la membrana: mayor rigidez y menor permeabilidad celular ^(78,79).
- 2) Amplificación del daño oxidativo a través de las reacciones en cadena de peroxidación lipídica ⁽⁸⁰⁾.

- 3) Disfunción de proteínas de membrana (bombas de transporte, enzimas), produciéndose pérdida de la homeostasis del Ca^+ citosólico y compartimental, activando diversas fosfolipasas y proteasas ^(81,82).
- 4) Alteración de la cadena electrónica mitocondrial con inhibición en la síntesis de ATP y desacoplamiento del flujo de electrones ⁽⁸³⁾. Se produce un incremento del índice intracelular NADH/NAD^+ , un descenso del índice ATP/ADP y un mayor aporte de intermediarios oxigenados reactivos al medio.
- 5) Alteraciones en la permeabilidad mitocondrial. En situaciones de daño oxidativo se produce un aumento brusco de la permeabilidad conocida como “transición de permeabilidad de la membrana mitocondrial” (MMPT) ⁽⁸⁴⁾.
- 6) Aceleración de la fibrogénesis inducida por los productos de la peroxidación lipídica ⁽⁸⁵⁾.

Mecanismos de daño oxidativo sobre estructuras en el citosol

La acción de productos oxigenados y otros radicales sobre proteínas, cofactores y grupos prostéticos del citosol provocan su modificación o inactivación por mecanismos oxidativos. De esto se derivan diversos trastornos del metabolismo. Disminuye la producción de ATP por bloqueo de la glucólisis mediante la inhibición de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa por el H_2O_2 ⁽⁸⁶⁾. Este déficit de ATP conduce, por un lado, a la inactivación de la bomba Na^+/K^+ ATP-asa, con la consiguiente pérdida del gradiente iónico, osmótico y eléctrico y acumulación de Ca^+ intracelular, y por otro, a la progresiva acidificación de la célula por generación de ácido láctico desde el metabolismo anaerobio, liberación de protones de la hidrólisis de nucleósidos de fosfato y por inhibición de la bomba Na^+/H^+ . La acidosis celular protege contra la necrosis celular,

mientras que la alcalinización favorece la muerte celular durante la depleción de ATP y el estrés oxidativo, es lo que se conoce como la paradoja del pH ⁽⁸⁷⁾.

Además, el aumento de Ca^{2+} intracitosólico conduce a la activación de proteasas y de la fosfolipasa A_2 , involucradas en los mecanismos de necrosis celular ^(88,89). La activación de proteasas resulta en la degradación de enzimas esenciales y componentes del citoesqueleto y en la proteólisis activadora (como es el caso de la xantina oxidasa) o inhibidora de diversas enzimas; la actividad de la fosfolipasa provoca daño en las membranas celulares. Asimismo, el incremento del Ca^{2+} altera la función mitocondrial y conduce a una pérdida de su potencial de membrana con el consiguiente bloqueo de la actividad ATP-sintasa.

El radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) se puede formar por un mecanismo Ca^{2+} dependiente o por otro citocina-dependiente. Este, en presencia de O_2^- , es capaz de formar el tóxico peroxinitrito, involucrado en la oxidación directa de grupos sulfhidrilos y la iniciación de la peroxidación lipídica sin el concurso de metales de transición ⁽⁹⁰⁾.

Se ha visto previamente el papel amplificador que poseen ciertos metales de transición en la generación de productos oxigenados altamente reactivos como el radical hidroxilo o los radicales alcoxilo, peroxilo, etc. Estos metales suelen ser secuestrados en depósitos o proteínas transportadoras, pudiendo ser movilizados mediante diversos mecanismos. La liberación del hierro desde la ferritina está estimulada por agentes reductores como el ácido ascórbico, el glutatión (GSH) o el anión superóxido ⁽⁹¹⁾. Un pH ácido, un exceso de NADH o de NADPH o un incremento en la actividad de la xantina oxidasa favorecen la liberación de hierro desde la ferritina y la hemosiderina ⁽⁹²⁾ facilitando su papel catalítico.

Acción sobre estructuras nucleares

El ADN está considerado como la principal diana del ataque por sustancias oxidantes *in vivo*, habiéndose calculado una media de más de 10^3 lesiones por daño oxidativo al día en el ser humano. Podemos resumir los siguientes mecanismos fisiopatológicos ⁽⁵⁶⁾:

- 1) Rotura monocatenaria o bicatenaria de ADN mediante radicales $\text{OH}\cdot$:

El radical $\text{OH}\cdot$ es el principal agente involucrado en el daño directo del ADN.

- 2) Activación de la enzima poli-ADP-ribosa polimerasa:

Cuando la molécula de ADN se daña, uno de los sucesos que ocurre inmediatamente es la activación de esta enzima nuclear cuya finalidad celular pudiera estar relacionada con los mecanismos de reparación del ADN ⁽⁹³⁾. Esta enzima al utilizar como sustrato los nucleótidos de nicotinamida para formar polímeros que se unen a la cadena de ADN lesionada depleciona los depósitos celulares de NAD^+ y con ello inhabilita las vías metabólicas de síntesis de ATP y la consiguiente capacidad de mantener la homeostasis del calcio intracelular ^(90,91).

- 3) Alteraciones de la transcripción y expresión de genes e interacción de radicales con el ARNm y los ribosomas:

El daño oxidativo subletal ha sido asociado con estos efectos mencionados ^(85,96).

- 4) Activación del gen y la proteína p53:

La acumulación de p53 lleva a un bloqueo del ciclo en G_1 , lo que le permite a la célula poner en marcha su mecanismo enzimático de reparación del ADN. Si el daño es extenso e irreparable la célula sigue la vía de la apoptosis como mecanismo defensivo para protegerse de las consecuencias de una mutación sostenida ⁽⁹⁷⁾.

5) Activación del factor de transcripción NFκB:

Un estado de estrés oxidativo en la célula induce la activación del NFκB. El NFκB es un factor de transcripción nuclear citoplasmático que tras su activación induce la expresión en el núcleo de un variado número de genes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria ⁽⁹⁸⁾ (antígenos HLA de clase I, TNFα, IL-6, IL-1β, el receptor para IL-2, moléculas de adhesión como VCAM-1 y ELAM-1, etc.). Además de activar de forma directa al NFκB citoplasmático, las especies oxigenadas reactivas inducen un incremento en la transcripción de su ARNm ⁽⁹⁹⁾. De ello se deduce que el estrés oxidativo a través del NFκB contribuye al aumento de síntesis de diversas proteínas celulares como las moléculas de HLA, citocinas e incluso protooncogenes con las consecuencias que ello trae sobre los fenómenos inflamatorios, inmunológicos y carcinogénicos.

6) Hidroxilación de deoxiguanosina en 8-hidroxi-deoxiguanosina:

El radical OH· provoca la hidroxilación de deoxiguanosina (dG) para formar 8-OHdG, que es capaz de promover en la célula un efecto mutagénico y carcinogénico ⁽¹⁰⁰⁾.

7) Liberación de metales de transición:

Con el daño oxidativo sobre el núcleo se liberan metales de transición que se encuentran unidos a la molécula de ADN o que en situaciones de estrés oxidativo son capaces de unírsele rápidamente, lo que provoca una significativa amplificación del daño oxidativo ⁽¹⁰¹⁾.

I-3.- ESTRÉS OXIDATIVO Y CANCER. IMPLICACION EN EL CANCER DE PANCREAS

Un número importante de factores exógenos y endógenos asociados a la aparición de cáncer son generadores de radicales libres de oxígeno ⁽¹⁰²⁾ . El desarrollo de cáncer, se considera en la actualidad como un proceso de microevolución que requiere la participación acumulada de múltiples eventos. Estos eventos se iniciarían en un clon de células e incluiría 3 estadios:

- 1.- Iniciación: inducción de la mutación de DNS en una célula somática.
- 2.- Promoción: en la que se produce la estimulación de la expansión tumoral de un clon de células.
- 3.- Progresión: en el que se produce la conversión de las células tumorales en cáncer.

A continuación se expondrá el papel del estrés oxidativo en cada una de las fases de desarrollo tumoral.

PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA INICIACION DEL TUMOR

La iniciación tumoral requiere una modificación permanente del material genético de una célula. Se estima que en el humano, el número de daños oxidativos al DNA está en torno a 10000 por célula y día ⁽¹⁰²⁾ . El daño del DNA a partir de los RLO se está reparando de forma continua por mecanismos específicos o no específicos.

Sin embargo, una pequeña parte de estas alteraciones del DNA escapan a los mecanismos reparadores y representan un importante potencial para el desarrollo de mutagenesis que

se incrementa con la edad. Se aquí que la exposición continua de las células al estrés oxidativo incrementa la mutagénesis ⁽¹⁰³⁾.

De alguna forma se considera que existe una relación “dosis-efecto” en relación a la exposición a los RLO y las mutagénesis (Figura 5), aunque en la práctica, la aparición del cáncer dependerá también de otros factores ⁽¹⁰⁴⁾.

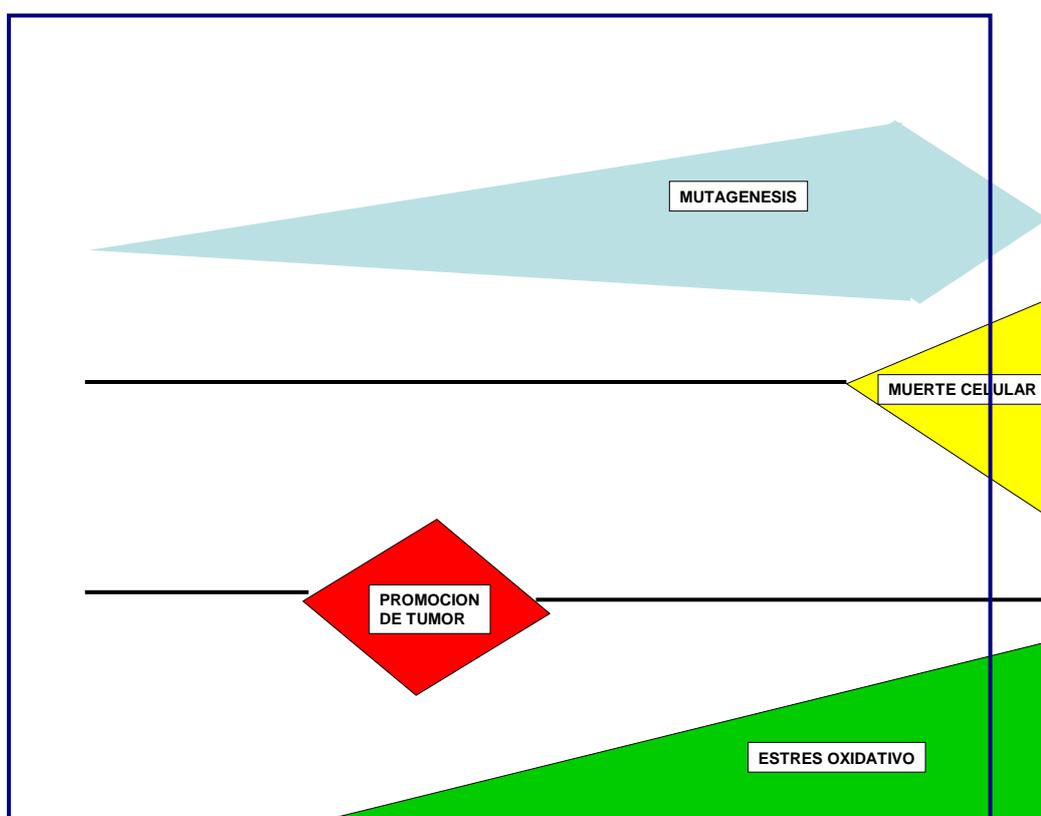


Figura 5. Modelo hipotético de la relación dosis-respuesta entre los RLO, estrés oxidativo y efecto carcinogénico ⁽¹⁰⁴⁾

El daño inicial del DNA por estrés oxidativo es a la vez químico y estructural.

El estado de óxido - reducción de la célula está determinado por el equilibrio entre las formas oxidadas y reducidas de los distintos compuestos biológicos presentes en ella,

principalmente de aquellos que se encuentran en mayor proporción. El tripéptido glutathion (GSH, g-L-glutamyl-L-cisteinil-glicina), debido a su alta concentración intracelular (5-10 mM), se considera un regulador homeostático del estado de óxido- reducción celular. Este metabolito se encuentra presente en su forma oxidada en sólo un 1 % del total, es decir que predomina ampliamente su forma reducida (GSH) sobre la oxidada (GSSG). Esto trae como consecuencia que un ligero desplazamiento del equilibrio hacia la forma oxidada afecta drásticamente el estado de óxido-reducción general, debido a su participación en muchos equilibrios de óxido reducción acoplados. En particular esto es crítico para la regulación (prendido o apagado) de algunos factores de transcripción , cuya actividad depende del estado de óxido-reducción en el que se encuentren. En la figura 6 se presentan los procesos que pueden ocurrir, relacionados al prendido y apagado de genes, bajo condiciones de estrés (-S* grupo sulfhidrilo modificado).

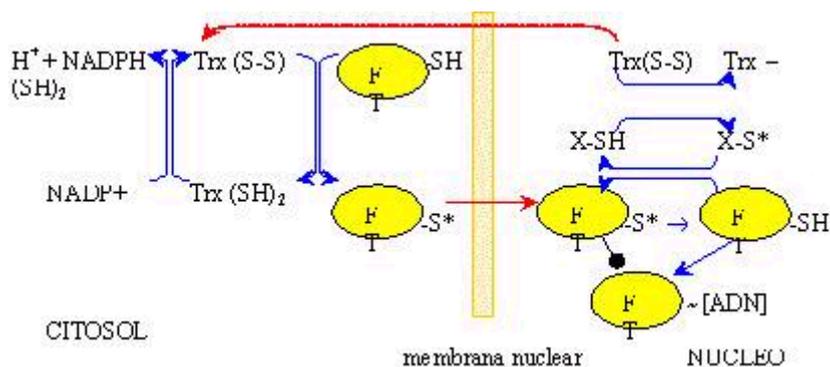


Figura 6.- Fenómenos de alteración de genes bajo condiciones de estrés.

Cuando un grupo -SH crítico sufre una modificación oxidativa la proteína afectada puede perder su funcionalidad. Así se alteran por un lado las bases púricas y pirimidínicas del DNA, así como la desoxiribosa.

Junto a las alteraciones químicas, se produce también una distorsión de la hélice del DNA. La suma de ambos efectos lleva a una inestabilidad genómica de un clon de células que favorecen la progresión y la caracterización de las células del cáncer.

En relación al cáncer de páncreas el nivel de daño de las cadenas aromáticas de DNA se ha correlacionado con un amplio espectro de mutaciones del K-ras en el tumor. Las mutaciones de los genes p53 y K-ras en el cáncer pancreático es similar al observado en los de vejiga o pulmón. La alta proporción de transiciones G y a en los tumours de pancreas sugieren la participación de nitrosaminas o agentes alquilantes en el fenómeno de la carcinogénesis.

Las mutaciones del K-ras en el cancer de pancreas se han asociado también al consumo de alcohol y hábitos dietéticos ⁽¹⁰⁴⁾.

PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA PROMOCION DEL TUMOR

De forma añadida a la mutagénesis que se produce en la fase de iniciación, el estrés oxidativo puede estimular la expansión de los clones de células mutadas por una modulación temporal de los genes relacionados con la proliferación o muerte celular ⁽¹⁰⁵⁾.

No obstante es importante tener en cuenta que niveles muy altos de estrés oxidativo puede inhibir la proliferación, produciendo la muerte celular por efecto citotóxico, mientras que cifras distintas pueden estimular la división celular y favorecer el crecimiento tumoral

(Figura 5). Esto podría explicar el por qué los RLO pueden de forma selectiva promover el crecimiento de células iniciales, mientras que puede tener un efecto tóxico en una población celular normal.

Junto a esto se plantea en la actualidad que los RLO tienen un rol más general en la promoción del tumor, basado en la hipótesis de que algunos promotores químicos como los esteres de formol actuarían a través de una vía intracelular para estimular la producción de los RLO.

PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA PROGRESION DEL TUMOR

El estadio final del desarrollo de cáncer es la adquisición de las propiedades malignas por parte del tumor.

Estas propiedades incluyen el crecimiento acelerado, el escape a las barreras inmunes, la invasión tisular y la aparición de metástasis. En la mayoría de estos cambios participa la lesión del DNA. Se ha postulado que la generación de importantes niveles de RLO en las células tumorales causa un estado persistente de estrés oxidativo que incrementa la inestabilidad genómica ⁽¹⁰⁶⁾. Por otro lado, la sensibilidad de las células tumorales a los RLO puede verse incrementada por niveles de actividad bajos de las enzimas antioxidantes ⁽¹⁰⁶⁾.

En esta fase, la relación dosis-respuesta de la exposición a los RLO y la progresión tumoral es similar a la que se comentaba previamente en la fase de iniciación tumoral (Figura 5). No obstante, estos efectos no explican totalmente el role de los RLO en la progresión del cáncer ⁽¹⁰⁴⁾.

I-4.- TERAPÉUTICA ANTIOXIDANTE. PAPEL EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER

La célula posee un sofisticado y complejo sistema de mecanismos antioxidantes que le permiten defenderse de los ataques provocados por el estrés oxidativo. Este sistema es en apariencia redundante, como suele ocurrir con los sistemas de control decisivos para la viabilidad biológica de la célula y se puede agrupar en dos grandes grupos: sistemas enzimáticos y sistemas no enzimáticos. Desde el punto de vista terapéutico existen sustancias exógenas que pueden prevenir el daño oxidativo utilizando mecanismos análogos a estos sistemas antioxidantes endógenos, inhibiendo o previniendo la generación de radicales libres, potenciando la actividad enzimática antioxidante o bloqueando la amplificación del daño oxidativo ^(56, 107)

*** Sustancias con actividad enzimática antioxidante:**

La *superóxido dismutasa (SOD)* es el sistema enzimático encargado de promover la reducción del radical superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Esta reacción se puede realizar de forma espontánea, aunque ocurre de una manera muy lenta. Si la SOD cataliza dicha reacción la velocidad se aumenta más de 10^9 veces. Se ha utilizado SOD recombinante en la práctica clínica, pero su eficacia está limitada por la escasa vida media (6 segundos) que presenta ⁽¹⁰⁸⁾. Se han empleado diversos métodos para obviar este problema y facilitar su difusión celular, como son su unión covalente con polietilen-glicol (PEG), prolongando su vida media hasta 40 horas o su incorporación en lisosomas, con lo que se consigue también una buena difusión celular y una vida media de 4 horas ⁽¹⁰⁹⁾.

Existen diversas sustancias que, sin presentar actividad enzimática, pueden realizar la misma función que la SOD. El *ácido diisopropilsalicílico de cobre (Cu-DIPS)* es lipofílico, puede atravesar membranas y actuar intracelularmente neutralizando aniones superóxido. El *desferal-Mn*, un complejo formado por desferroxiamina y manganeso, puede actuar de la misma manera, aunque el manganeso intracelular puede resultar tóxico ⁽¹¹⁰⁾. La *catalasa*, enzima encargada de la eliminación intracelular de H₂O₂, se puede utilizar de forma análoga a la SOD conjugada con PEG o incorporada en lisosomas, lo que mejora su biodisponibilidad y vida media ⁽¹¹¹⁾. El *oltipraz* es una molécula sintética de ditiol-tiona con efectos anticancerígenos que parece actuar mediante la inducción de las isoenzimas de la glutatión-S-transferasa con capacidad de neutralizar lipoperóxidos ⁽¹¹²⁾. El *ebsele*n es un compuesto selenoorgánico de escasa toxicidad que posee una actividad análoga a la de la enzima GSH-peroxidasa. Asimismo, posee propiedades antiinflamatorias, antiarterioscleróticas y citoprotectoras. Posiblemente el ebselen actúe inhibiendo la migración transendotelial de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y la actividad enzimática de la NADPH-oxidasa, la lipooxigenasa y la óxido nítrico sintetasa ⁽¹¹³⁾.

*** Inhibidores de los sistemas enzimáticos prooxidantes:**

- Inhibidores de la xantina-oxidasa:

Tanto el *alopurinol* como su metabolito activo, el *oxipurinol*, son análogos estructurales de la hipoxantina, que bloquean de forma competitiva la acción de la enzima xantina oxidasa/deshidrogenasa en el catabolismo de los derivados purínicos hasta ácido úrico. El alopurinol reduce la formación de radicales libres, por lo que puede utilizarse en aquellos

procesos que cursan con un desequilibrio entre la producción y la neutralización o scavenging de estos elementos. El *ácido fólico* y el compuesto *pterin-aldehído* también inhiben de forma competitiva la actividad de la enzima. El *tungsteno* impide la correcta incorporación de la molécula de molibdeno en el núcleo activo de la xantina oxidasa, favoreciendo la producción de enzima inactiva⁽¹¹⁴⁾.

- Inhibidores de la NADPH-oxidasa:

Los *anestésicos locales*, los *bloqueadores de los canales del calcio* o los *antiinflamatorios no esteroideos* pueden interferir de forma inespecífica con la función de NADPH-oxidasa. El *yoduro de difenilene* -un agente lipofílico que reduce la formación de radicales libres- inhibe específicamente la NADPH-oxidasa al unirse al componente flavoproteico de la oxidasa. La *adenosina* puede modular la generación de anión superóxido actuando sobre un receptor A₂ del neutrófilo. Por último, la actividad de la NADPH-oxidasa puede ser bloqueada en un 90% mediante un *anticuerpo monoclonal específico*⁽¹¹⁵⁾.

* **Minerales antioxidantes:**

El *cobre*, *manganeso*, *zinc*, *hierro* y *selenio* son cofactores necesarios para el buen funcionamiento de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa, y la glutatión peroxidasa⁽¹¹⁶⁾. El zinc, además de ser cofactor de esas enzimas, presenta acciones inmunomoduladoras, favoreciendo la producción de anticuerpos por linfocitos B y la actividad de las células *natural killer* (NK). Tanto el cobre como el zinc están comercializados en asociación a otros complejos vitamínicos.

*** Precusores de GSH:**

El GSH es el tiol intracelular más prevalente, y entre sus múltiples funciones se encuentra la de poseer una actividad antioxidante intracelular decisiva; se ha descrito que las células privadas de glutatión típicamente sufren un severo daño oxidativo asociado a degeneración mitocondrial ⁽¹¹⁷⁾.

- N-acetilcisteína:

La N-acetilcisteína (NAC) es un fármaco bien tolerado que reacciona con los reactivos intermediarios del oxígeno e incrementa los niveles intracelulares de glutatión. La NAC inhibe la acción del NFκB, probablemente gracias al mantenimiento del potencial redox dentro de la célula. El NFκB puede ser inducido por diversos radicales libres, como el peróxido de hidrógeno y algunas citocinas: TNF-α e IL-1. El NFκB a su vez induce la transcripción de múltiples genes proinflamatorios, como ya hemos comentado. La NAC a dosis elevadas, administrada por vía parenteral, se considera el tratamiento de elección para neutralizar el estrés oxidativo inducido por la intoxicación con paracetamol. Dada su escasa toxicidad este fármaco podría utilizarse en múltiples procesos inflamatorios secundarios a daño tisular, y en otras patologías donde el estrés oxidativo y la formación de radicales libres desempeñan un papel importante.

Más recientemente, se ha comprobado el efecto inhibitor de la NAC sobre la apoptosis celular, al igual que su capacidad de inhibir la mutagenicidad inducida por diversos compuestos químicos ^(118,119).

- Otros:

En la clínica habitual también se utilizan otros precursores del GSH como la *S-adenosil-metionina* en el tratamiento y prevención de hepatopatías e intoxicación por fármacos. El *ácido L-2-oxotiazolidin-4-carboxílico (OTC)* es otro precursor del glutatión que ha sido utilizado en experimentación animal y humana con finalidad antioxidante. Asimismo, de forma experimental, se han utilizado los *monoésteres de glutatión* que pueden penetrar directamente en la célula, siendo hidrolizado el GSH en su interior ⁽¹²⁰⁾.

* **Vitaminas:**

- Vitamina E (α -tocoferol)

La vitamina E es una vitamina liposoluble esencial que incluye ocho formas o esteroisómeros, siendo el más conocido el α -tocoferol. Se localiza preferentemente en las membranas celulares, donde funciona como protector frente al daño producido por radicales libres. De hecho, la vitamina E es un antioxidante natural liposoluble que puede inhibir la peroxidación lipídica en las membranas celulares, constituyendo el antioxidante lipofílico más importante ⁽¹²¹⁾. Se encuentra principalmente en vegetales, semillas de soja y trigo, nueces, etc., siendo la dosis diaria recomendada entre 8-10 mg. Por su acción antioxidante la vitamina E parece desempeñar un papel protector en el daño por radicales libres asociado a cáncer, enfermedad cardiovascular y en el envejecimiento prematuro. El α -tocoferol inhibe la claudicación intermitente y el daño por isquemia-reperfusión que se origina en la cirugía cardíaca extracorpórea; un suplemento, previo a la cirugía, de α -tocoferol ejerce un factor protector atenuando el daño peroxidativo ⁽¹²²⁾. Igualmente ha

demostrado, en estudio experimental, atenuar el daño de isquemia-reperfusión en el músculo esquelético ⁽¹²³⁾.

Diversos experimentos y estudios epidemiológicos sugieren que la vitamina E puede reducir el riesgo de cáncer. Esta vitamina inhibe la mutagénesis y transformación celular, principalmente a través de su acción antioxidante, eliminando radicales libres de oxígeno y disminuyendo el daño sobre el ADN. Se necesitan estudios más extensos respecto al número de pacientes y al tiempo, así como dosis más altas de vitamina E para valorar su posible acción terapéutica en la profilaxis oncológica.

- Vitamina C (ácido ascórbico):

El ácido ascórbico o vitamina C ($C_6H_8O_8$) es una querolactona, estructuralmente similar a la glucosa. La vitamina C está presente fundamentalmente en frutas frescas (cítricos, tomates y pimientos verdes), patatas y vegetales, aunque también se encuentra en algunos derivados animales como la leche. Algunas frutas como las bayas (300mg/100g) o las uvas pasas (150-230mg/100g) son particularmente ricas en ácido ascórbico. Los requerimientos diarios de ácido ascórbico oscilan entre 60-100 mg. Entre sus funciones, la vitamina C actúa como cofactor de múltiples enzimas implicadas en la síntesis de carnitina, catecolaminas, oxitocina y hormona antidiurética; posee una acción antihistamínica y estimula la síntesis de colágeno, proteoglicanos y otros constituyentes orgánicos de la matriz intercelular, favoreciendo la cicatrización de heridas. Asimismo, el ácido ascórbico es considerado un potente antioxidante, reaccionando rápidamente con radicales superóxido, peróxido, hidroxilo y tífico; también actúa como scavenger del oxígeno "singlete" y se combina con el ácido hipocloroso, eliminando rápidamente este oxidante que se produce en los procesos inflamatorios. Esta unión a radicales libres es

especialmente importante en los ojos y en el fluido extracelular pulmonar, donde protege frente a agentes oxidantes como el ozono. Es clásico el papel inmunomodulador del ácido ascórbico, aumentando la movilidad leucocitaria y protegiendo su membrana del estrés oxidativo ^(124,125). Su posible acción antitumoral, al igual que la de la vitamina E, es controvertida.

- Carotenoides:

Los carotenoides (precursores de la vitamina A derivados de las plantas) constituyen pigmentos liposolubles que originan el color amarillo-naranja de muchas frutas y vegetales. Existen más de 600 tipos diferentes, aunque sólo a unos 50 se les ha demostrado actividad biológica propia de la vitamina A, siendo los más conocidos y abundantes los beta-carotenos. Los animales-incluyendo los seres humanos- no son capaces de sintetizar de *novo* beta-carotenos, siendo su fuente principal los vegetales (patatas, zanahorias) y frutas, leche y derivados, peces y crustáceos.

Aunque la vitamina A no es considerada una sustancia antioxidante, los carotenoides sí actúan como tal, inhibiendo fundamentalmente la peroxidación lipídica en condiciones de baja concentración de oxígeno. Es posible que esta acción consista esencialmente en transformar el radical α -tocoferóxilo en α -tocoferol, regenerando de esta manera el potencial antioxidante de esta vitamina¹³¹. A concentraciones normales de oxígeno son menos eficaces y complementan la acción de otras moléculas antioxidantes como la catalasa, la glutatión peroxidasa y las vitaminas E y C.

- Flavonoides:

Los efectos beneficiosos de frutas y vegetales, tradicionalmente atribuidos al ácido ascórbico y a los carotenoides, en parte son debidos a los flavonoides y otros polifenoles derivados de plantas. La ingesta diaria de estos compuestos, de los que se conocen más de 4000 especies, es significativa, pudiendo ser de aproximadamente 1g/día en una dieta mediterránea convencional. A los flavonoides se les atribuye actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antihelmíntica, antivírica, antihormonal, hepatoprotectora, antitrombótica y antineoplásica.

Los flavonoides poseen una gran acción antioxidante, aunque directamente no está claro si inhiben la formación de radicales libres o los eliminan una vez formados, como, por ejemplo, ocurre con el radical hidróxilo. Protegen las LDL de la lipoperoxidación, reduciendo de esta manera su aterogenicidad, e influyen positivamente sobre aquellas enfermedades en las que en su patogenia están envueltos productos de la lipoperoxidación lipídica. Indirectamente favorecen la acción del ácido ascórbico (aumentan la absorción, favorecen su estabilización y reducen el paso de dehidroascorbato a ascorbato) y mantienen la acción del α -tocoferol sobre las membranas celulares. También forman complejos con metales, que de esta manera son eliminados o permanecen inactivos. A su vez, la vitamina C mantiene la actividad biológica de los flavonoides ⁽¹²⁶⁾.

* **Otros antioxidantes:**

- Otros scavengers no enzimáticos:

El *manitol* y el *dimetilsulfóxido* son capaces de neutralizar radicales $\text{OH}\cdot$. Los *lazaroides* o 21-aminoesteroides son unos compuestos esteroideos sintéticos carentes de actividad

mineral o glucocorticoide, capaces de eliminar radicales superóxido y lipoperóxidos y de inhibir la liberación del ácido araquidónico, esencial para la posterior síntesis de endoperóxidos cíclicos.

- Quelantes del hierro:

Los quelantes de metales de transición, como la desferroxamina, funcionan como antioxidantes al evitar la formación de radicales hidróxilo altamente reactivos generados mediante las reacciones de Haber-Weiss o Fenton. El uso de quelantes del hierro ha demostrado su eficacia en el daño de isquemia-reperfusión cardiaca y renal, disminuye la toxicidad hepática mediada por H_2O_2 , puede beneficiar la evolución de ciertas enfermedades neurológicas degenerativas, disminuye la hepatotoxicidad por CCl_4 , etc ⁽¹²⁷⁾. No obstante, aún se necesitan estudios clínicos controlados a doble ciego para confirmar estos hallazgos.

- Otros inhibidores de la lipoperoxidación:

El *probucol* es un fármaco útil en las hiperlipidemias al disminuir los niveles de LDL y HDL colesterol y triglicéridos. Posee una acción antioxidante, demostrada *in vitro* como un poderoso scavenger de superóxidos, que inhibe o retrasa la aparición de arteriosclerosis, posiblemente debido a la reducción del nivel sérico de peróxidos lipídicos ⁽¹²⁸⁾.

- Melatonina:

Indolamina producida por la glándula pineal. Las acciones conocidas de la MEL en el organismo han aumentado a lo largo de los años; desde hace más de tres décadas, el

modelo de producción nocturna de MEL ha ido cambiando, llegando a ser la señal cíclica anual de reproducción en especies fotoperiódicas. Desde entonces las acciones de la MEL también se han relacionado con los ritmos circadianos, función inmune, sueño, fisiología de la retina, y funciones endocrinas en general. Sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que este indol es un eficaz scavenger de RLO y antioxidante. Estas propiedades, unidas a sus especiales características farmacocinéticas, han hecho que sea objeto de estudio por nuestro grupo de investigación. En posteriores apartados le dedicaremos una especial atención.

TERAPIA ANTIOXIDANTE EN CANCER

En conclusión, los antioxidantes son fármacos bien conocidos, generalmente con escasa toxicidad, que durante muchos años han venido utilizándose con unas indicaciones poco concretas. Últimamente se han ido conociendo efectos beneficiosos de interesante trascendencia. Algunos de estos fármacos se han propuesto como eficaces en la prevención tumoral y de la enfermedad cardiovascular, en el tratamiento y profilaxis del síndrome de isquemia-reperfusión y en la prevención del fotoenvejecimiento. También la acción antiinflamatoria de algunos antioxidantes, junto al papel que ejercen regulando la inmunidad celular y humoral, incrementa sus aplicaciones clínicas al menos desde un punto teórico. El futuro terapéutico de estos fármacos resulta prometedor, no sólo cuando se administren aisladamente, sino también usándolos como coadyuvantes de otros fármacos específicos.

No obstante, aunque existen trabajos experimentales en los que la utilización de combinaciones de antioxidantes han dado buenos resultados ⁽¹²⁹⁾, estos no se han

reproducido en trabajos clínicos al menos en lo que a prevención se refiere. Así en un metaanálisis realizado sobre la eficacia de las vitaminas antioxidantes en la prevención de tumores gastrointestinales, no observa beneficio con la administración de estos suplementos ⁽¹³⁰⁾ . Estas conclusiones no pueden ser definitivas pues a juicio de los evaluadores los estudios eran muy asimétricos y difícilmente extrapolables.

Por todo ello es preciso mantener un rigor científico y esperar los resultados de amplios estudios randomizados que confirmen estos hallazgos permitan la aplicación clínica, aislada o combinada, con una mayor eficacia y seguridad.

I-5.- MELATONINA. FUNDAMENTOS Y SU UTILIZACION COMO TERAPEUTICA EN EL CANCER

Hace tres siglos, el gran filósofo francés René Descartes describió a la glándula pineal como el centro del alma ⁽¹³¹⁾ . En 1958, Lerner y colaboradores aislaron por vez primera la melatonina (MEL) ²⁰⁷, principal sustancia secretada por la glándula pineal. En el momento actual hay evidencias ⁽¹³²⁾ que la MEL puede jugar un papel en la regulación biológica de ritmos circadianos, sueño, humor y quizás también en la fisiopatología de la reproducción, biología del crecimiento de tumores así como en el envejecimiento celular. Asimismo, desde hace años, basándose en sus características farmacocinéticas y propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras, se vienen estudiando sus posibles beneficios cuando se administra de forma exógena en determinadas patologías que implican en su fisiopatogenia a los radicales libres de oxígeno, como por ejemplo en el síndrome de isquemia-reperfusión.

MELATONINA: FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA

En la especie humana, la glándula pineal o epífisis cerebral es un pequeño órgano piriforme de color rojo grisáceo que ocupa la depresión existente entre los tubérculos cuadrigéminos superiores. Está debajo del rodete del cuerpo calloso, separada del mismo por la tela coroidea del tercer ventrículo y las venas cerebrales contenidas en ella. En la glándula pineal hay dos tipos de células:

- 1) pinealocitos, que son las células predominantes y características del parénquima pineal, productoras de indolaminas (MEL en su mayor parte) y péptidos;
- 2) células neurogliales, situadas entre los pinealocitos a los que cubren y separan parcialmente, similares a los astrocitos.

La MEL, desde el punto de vista bioquímico es la N-acetil-5-metoxitriptamina. En su biosíntesis el triptófano es convertido en primer lugar a 5-hidroxitriptófano mediante la enzima triptófano hidrolasa. El 5-hidroxitriptófano es decarboxilado a serotonina. La síntesis de MEL a partir de serotonina es catalizada por dos enzimas: arilalkilamina N-acetiltransferasa e hidroxindol-O-metiltransferasa, ambas limitadas en gran parte a la glándula pineal ^(133,134).

La glándula pineal en los mamíferos funciona como un transductor neuroendocrino, siendo la información de luz transmitida a la glándula pineal a través del núcleo supraquiasmático del hipotálamo y del sistema nervioso simpático. Las fibras nerviosas amielínicas autónomas que penetran en la glándula son de tipo noradrenérgico y proceden del ganglio cervical superior. La síntesis y liberación de MEL es estimulada por la oscuridad e inhibida por la luz. Así, durante las horas de luz del día, los fotorreceptores de la retina están hiperpolarizados, los cuales inhiben la liberación de norepinefrina ⁽¹³⁵⁾;

por lo tanto, el sistema retinohipotalámico pineal está quiescente y muy poca cantidad de MEL es secretada. Por el contrario, con la llegada de la oscuridad, los fotorreceptores liberan norepinefrina activando el sistema y aumentando el número de receptores adrenérgicos α_1 y β_1 ⁽¹³⁶⁾ ; asimismo, aumenta la actividad de la enzima arilalkilamina N-acetiltransferasa iniciándose la síntesis y liberación de MEL. Cuando se aumenta la síntesis de MEL, ésta entra en el torrente circulatorio por difusión pasiva. En el ser humano, el aumento de la secreción de MEL se produce poco después del comienzo de la oscuridad, alcanzando el pico máximo hacia la mitad de la noche (entre las 2 y las 4 horas a.m.) y descendiendo gradualmente durante la segunda mitad de la noche. La concentración de MEL sérica varía en relación con la edad de manera considerable ⁽¹³⁷⁾ . El ritmo diario en la concentración sérica de MEL corre paralelo al ciclo día-noche ^(138,139) . Sin embargo, un ritmo de casi 24 horas de duración también persiste en sujetos normales sometidos a continua oscuridad.

El ritmo circadiano de secreción de MEL es de origen endógeno, reflejo de las señales que se originan en el núcleo supraquiasmático ⁽¹⁴⁰⁾ . La luz tiene dos efectos sobre la MEL: los ciclos de luz día-noche modifican el ritmo de su secreción así como breves pulsos de luz de intensidad y duración suficientes suprimen bruscamente su producción. En individuos normales, la exposición a la luz inhibe la secreción de MEL de forma dosis dependiente ⁽¹⁴¹⁾ .

La MEL es rápidamente metabolizada, principalmente en el hígado, por hidroxilación a 6-hidroximelatonina y posteriormente es conjugada con ácido sulfúrico o con ácido glucurónico y excretada por la orina. La excreción urinaria de 6-sulfatoxi-melatonina, el principal metabolito de la MEL, se correlaciona estrechamente con la

concentración sérica de MEL⁽¹⁴¹⁾. La MEL administrada por vía intravenosa es rápidamente distribuida y eliminada, con una vida media sérica de 0.5 a 5.6 minutos⁽¹⁴²⁾. La biodisponibilidad de la MEL administrada por vía oral varía enormemente de unos individuos a otros⁽¹⁴³⁾.

No ha sido publicado ningún efecto secundario de importancia o que conlleve riesgo asociado a la administración de MEL. Sin embargo, los efectos fisiológicos dosis dependiente de la hormona (hipotermia, tendencia al sueño, descenso del estado de alerta y efectos probables en el sistema reproductor) no han sido todavía evaluados adecuadamente en personas que han tomado grandes dosis de MEL por periodos prolongados de tiempo. A pesar de la ausencia de acciones marcadamente endocrinas, un descenso en la concentración de hormona luteinizante y un aumento en la concentración sérica de prolactina han sido publicados tras la administración de dosis farmacológicas de MEL, a individuos normales⁽¹⁴⁴⁾.

Uno de los factores más importantes a tener en cuenta con el empleo de melatonina y que la hacen de gran interés clínico, es que además de su facilidad de absorción por cualquier vía administrada y su facilidad para difundir por todas las barreras morfofisiológicas, alcanzando los compartimentos celulares donde desempeñará su papel antioxidante, también posee capacidad de conservación de la mitocondria y escasa toxicidad^(145,146).

RECEPTORES DE MELATONINA

Han sido identificados dos receptores de membrana de MEL que pertenecen farmacológica y cinéticamente a grupos diferentes: ML1, receptor de alta afinidad [picomolar] y ML2, receptor de baja afinidad [nanomolar] ^(147,148). La activación de los receptores ML1, que pertenecen a la familia de los receptores acoplados a la proteína G ⁽¹⁴⁹⁾, da lugar a la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa en células blanco. Estos receptores están probablemente involucrados en las regulación de la función de la retina, ritmos circadianos y reproducción. Los receptores ML2 están acoplados a la estimulación de la hidrólisis de fosfoinositol, pero su distribución no ha sido determinada. Con el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), dos tipos de receptores de MEL de alta afinidad llamados Mel1_a y Mel1_b fueron clonados en varios mamíferos incluido el hombre ^(150,151). El receptor Mel1_a es expresado en la *pars tuberalis* de la hipófisis y en el núcleo supraquiasmático (lugares presumibles de las acciones circadianas y reproductivas de la MEL). El receptor Mel1_b es expresado principalmente en la retina y en menor medida en el cerebro.

La MEL puede actuar también en sitios intracelulares mediante la unión a la calmodulina del citosol; la hormona puede afectar directamente a señales de calcio interaccionando con enzimas blanco como la adenilato ciclasa y fosfodiesterasa, así como con proteínas estructurales ⁽¹⁵²⁾. La MEL ha sido identificada recientemente como ligando para dos receptores huérfanos (α y β) en la familia de receptores nucleares retinoides Z ⁽¹⁵³⁾. Hay evidencias de que la MEL se une a la calmodulina ^(154,155) y de este modo puede modular las principales acciones del calcio intracelular.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MELATONINA

El descubrimiento de la MEL como agente antioxidante ha abierto un nuevo campo en la investigación médica y biológica ⁽¹⁵⁶⁾. La característica estructural que la hace actuar como un potente neutralizador de RLO (conocido como “scavenger”) incluye el grupo metilo en posición 5 del grupo indol y el grupo acetilo ⁽¹⁵⁷⁾.

Tanto estudios *in vitro* como *in vivo* han demostrado que la MEL es un potente atrapador de los altamente tóxicos radicales hidroxilos (OH·) y de otros radicales derivados del oxígeno, lo que sugieren que éstas acciones de la MEL no están mediadas por receptores ⁽¹⁵⁸⁾. Tan y cols. ⁽¹⁵⁶⁾ han puesto de manifiesto la alta capacidad neutralizadora de la MEL frente a RLO OH· *in vitro*: los radicales hidroxilo se producen *in vitro* con la exposición a la luz ultravioleta (UV), 254 nm, de una solución que contenga H₂O₂. Debido a su alta reactividad, los radicales de OH· una vez formados tienen una vida muy corta (10⁻⁹ s) y ello dificulta mucho su medición; sin embargo, con el uso de 5.5-dimetil-pirrol-N-óxido (DMPO), agente “cazador” de spin, éste forma un complejo junto con los radicales OH· (DMPO-OH·), el cual tiene vida larga (horas) pudiendo así ser cuantificado. Mediante la utilización de cromatografía líquida, junto con un mecanismo de detección electroquímica (HPLC-ED *high performance liquid chromatography electrochemical detection*) para identificar y separar el complejo DMPO-OH·, pudieron confirmar su presencia por resonancia electromagnética. Posteriormente, añadieron a la solución de H₂O₂ un antioxidante conocido, como el manitol, GSH o la MEL y finalmente se fotolizó con luz UV. Cuando la MEL fue comparada con los otros dos conocidos antioxidantes, GSH y manitol, la MEL fue más eficiente como sustancia

scavenging de los radicales tóxicos; las concentraciones requeridas para neutralizar el 50% de los radicales $\text{OH}\cdot$ (representados por $\text{DMPO-OH}\cdot$) fueron 21, 123 y 283 μM para MEL, GSH y manitol respectivamente; por lo tanto, la MEL demostró tener una capacidad antioxidante 5 veces más potente que el GSH y 14 veces más potente que el manitol.

Reiter y cols. ⁽¹⁵⁷⁾ han estudiado la capacidad *scavenging* de la MEL en una variedad de sistemas *in vitro* y, sin excepción, la MEL ha proporcionado resultados muy satisfactorios. En otros estudios, Poeggeler y cols. ^(158,159) utilizaron ABTS (2,2-azio-bis(ácido 3etilen-tiazol-6-sulfónico) y $\text{OH}\cdot$ para valorar la capacidad de atenuación de los radicales por parte de la MEL, encontrando alta efectividad. Cuando una molécula no radical cede un electrón a un radical libre se convierte en un radical; si el radical resultante es igual o más tóxico que el radical al cual donó un electrón, el proceso de scavenging no beneficia al organismo. Sin embargo, cuando la MEL detoxifica al radical altamente tóxico $\text{OH}\cdot$, se convierte en un radical catión hidroxilo de mucha menor toxicidad ⁽¹⁵⁹⁻¹⁶¹⁾. Este radical “scavenging” al O_2^- y en este proceso se convierte en N^1 -acetil- N^2 formil-5-metoxikinuramina (AMFK). Esta serie de reacciones hacen de la MEL un scavenger ideal ya que no solamente neutraliza al altamente devastador $\text{OH}\cdot$ sino que, además, el producto resultante “scavenging” también al O_2^- . Ya que el O_2^- es el precursor de muchos de los $\text{OH}\cdot$ generados *in vivo*, la MEL tiene una segunda intención en reducir su producción.

Pieri y cols. ⁽¹⁶¹⁾ comprobaron la capacidad para neutralizar al radical peroxilo, estimada en unidades de capacidad de absorción de oxígeno *in vitro*; ya que la vitamina E es un conocido potente neutralizante de radical peróxilo, los autores compararon MEL

frente a Trolox (solución acuosa de vitamina E); los resultados fueron que la MEL presenta dos veces la efectividad de la vitamina E en neutralizar los radicales mencionados. En estudios realizados por nuestro grupo de investigación mediante un modelo experimental de ictericia obstructiva en ratas, se ha evidenciado que la MEL es más eficiente que la vitamina E en reducir parámetros de colestasis y de estrés oxidativo, proporcionando un mayor efecto protector hepatocelular ⁽¹⁶¹⁻¹⁶²⁾.

Se ha comprobado en diversos estudios *in vivo* que la MEL ofrece protección oxidativa a una variedad de moléculas tales como ADN, proteínas y lípidos; por lo tanto protege al núcleo, citosol y membrana celular.

a)Protección del ADN: en ratas tratadas con safrol a dosis de 300 mg/kg, carcinógeno que produce lesiones sobre el ADN hepático debido a su capacidad de generar grandes cantidades de especies activas del O₂, Tan y cols. ⁽¹⁶³⁾ demostraron que en las ratas tratadas con MEL a una dosis de 0.2 mg/kg peso el daño en el ADN fue reducido al 40%; es más, cuando las ratas fueron tratadas a una dosis de 0.4 mg/kg peso el ADN dañado fue reducido a una cantidad menor del 5% respecto al grupo control. Estas dosis de MEL, aunque pequeñas, son farmacológicas. Posteriormente realizaron el mismo estudio aunque aprovecharon el ritmo circadiano normal de la MEL; los resultados fueron que los animales a los que les fue administrado safrol durante la noche presentaron un daño del ADN un 20% inferior que los animales a los que el safrol fue administrado de día, cuando los niveles de MEL son más bajos. La novedad es que los niveles fisiológicos de MEL son suficientes para combatir el daño oxidativo provocado por el safrol. Algunas de estas ratas fueron pinealectomizadas, con lo cual las concentraciones de MEL nocturnas disminuyen considerablemente y por lo tanto se incrementó la lesión debida al safrol; cuanto a las

ratas pinealectomizadas se les administró MEL, la lesión sobre el DNA hepático descendió un 70%.

b)Protección de proteínas: En líneas generales se acepta que las cataratas se producen como consecuencia de la oxidación de proteínas en el cristalino ⁽¹⁶⁴⁾. Abe y cols. ⁽¹⁶⁵⁾ demostraron en un modelo de ratas recién nacidas tratadas con butionina sulfoximina, un inhibidor de la síntesis de GSH, que las ratas desarrollan cataratas a las dos semanas de vida; sin embargo, en ratas tratadas a su vez con MEL el número de cataratas disminuyó considerablemente.

c)Protección de lípidos: Recientes estudios han demostrado que la MEL reduce de manera importante la lipoperoxidación. Conocidos antioxidantes, en particular la vitamina E, protegen especialmente contra la destrucción de ácidos grasos poliinsaturados en virtud de su capacidad de contrarrestar a los radicales peroxilos. Así, Pieri y cols. ⁽¹⁶¹⁾ afirmaron, como vimos, que la MEL *in vitro* fue más eficiente “scavenging” que una forma soluble acuosa de vitamina E. Por otro lado, Reiter y cols. ⁽¹⁶⁶⁾ demostraron que en ratas tratadas con el herbicida tóxico paraquat apareció un descenso altamente significativo en el índice de lipoperoxidación de aquellos animales a los que previamente se les había administrado MEL.

En resumen, la MEL, principal producto secretado por la glándula pineal, es un “scavenger” directo de radicales libres y un antioxidante indirecto. En términos de su actividad “scavenging”, la MEL se ha mostrado como neutralizadora de los radicales hidroxilo, anión superóxido, oxígeno singlete, peróxilo y anión peroxinitrito. Además, las acciones antioxidantes de MEL probablemente se deriven de su efecto estimulador sobre

superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y su acción inhibitoria sobre el óxido nítrico sintetasa.

Finalmente, la MEL actúa estabilizando membranas celulares, haciéndolas más resistentes al ataque oxidante, y está desprovista de acciones prooxidantes. En modelos de estrés oxidativo, la MEL ha mostrado su resistencia a la lipoperoxidación inducida por paraquat, lipopolisacáridos, isquemia-reperfusión, L-cisteína, cianuro potásico, cloruro de cadmio, depleción de glutatión, alloxan, e ingestión de alcohol. De la misma manera, el daño inducido al DNA con radicales libres por la radiación ionizante, el cancerígeno químico safrol y lipopolisacáridos son inhibidos por la MEL. Estas conclusiones ilustran que la MEL, debido a su alta liposolubilidad y moderada hidrosolubilidad, es capaz de proteger del daño oxidativo a macromoléculas en todos los compartimentos celulares. En los seres humanos, la capacidad antioxidante total del suero es relacionada con los niveles de MEL. Así, la reducción de MEL con la edad puede ser un factor del incremento del daño oxidativo en el anciano ^(167,168) .

MELATONINA Y PANCREAS

Los estudios que relacionan a la MEL con la glándula pancreática y los RLO, en el campo del estrés oxidativo, son muy escasos. Qi y cols. ⁽¹⁶⁹⁾ comprobaron en un modelo de pancreatitis aguda inducida farmacológicamente en ratas, que el pretratamiento con MEL, 30 minutos antes, reducía significativamente el edema pancreático y los niveles de peroxidación lipídica. Por otra parte, Ebel y cols. ⁽¹⁷⁰⁾ observaron, en un estudio con células beta-pancreáticas *in vitro*, que la necrosis inducida por alloxan podía ser prevenida con la administración de MEL, relacionando dicho efecto con la posible neutralización de radicales hidroxilo. Posteriormente, Andersson y cols. ⁽¹⁷¹⁾ también en un estudio *in vitro*, con células beta del páncreas de rata, objetivaron que la MEL neutralizó la diabetes que se había inducido con la administración de streptozotocina. Vural y cols. ⁽¹⁷²⁾ realizaron un estudio similar *in vivo*, provocando una diabetes en ratas tratadas con streptozotocina intraperitoneal. Los niveles de GSH, GSH-Px y SOD eran más bajos en ratas diabéticas por streptozotocina que en el grupo control, y en el grupo tratado con streptozotocina y MEL no se encontraron diferencias con el grupo control. Estos resultados confirmaron la presencia de estrés oxidativo en las ratas diabéticas inducidas con streptozotocina e indican las propiedades antioxidantes y de “scavenger” de RLO de la MEL.

Sin embargo, en ninguna de estas investigaciones se analiza la posible actividad de la melatonina en el cáncer de páncreas.

MELATONINA Y CANCER

La asociación de alteraciones en la secreción de la hormona de la glándula pineal en los enfermos con procesos neoplásicos se ha puesto de manifiesto en diversos trabajos clínicos y experimentales ^(173,174) . Se considera que las alteraciones del sueño, con modificación de los ritmos de sueño-vigilia pueden constituir un factor que determine una evolución más agresiva en la proliferación tumoral, si bien hay trabajos que no llegan a demostrar la asociación entre los niveles séricos de melatonina y la aparición de cáncer de mama ⁽¹⁷⁵⁾ .

Los mecanismos por los cuales se produciría esto pueden ser diversos ⁽¹⁷⁶⁾ .

Por un lado, como se ha comentado previamente, la melatonina es el antioxidante endógeno más potente del organismo. El descenso no fisiológico de sus niveles en plasma y en los tejidos conllevaría una disminución de la capacidad del organismo para activar la cadena de scavengers antioxidantes, esenciales para el control, por parte del organismo, del estrés oxidativo. Siguiendo los esquemas que se han descrito anteriormente en el apartado de “estrés oxidativo y cáncer” el organismo estaría en una situación de debilidad para contrarrestar esta agresión y evitar el potencial desarrollo tumoral tanto en las fases de iniciación, como de promoción y progresión del tumor.

Por otro lado, existen múltiples receptores de melatonina por todo el organismo que explican de alguna forma los ritmos circadianos de los órganos y su papel inmunomodulador ⁽¹⁷⁷⁾ .

Así algunos tipos de cáncer, como en los de mama, se han detectado la existencia de receptores específicos de melatonina en el tumor. Estos receptores tendrían la misma significación clínica que los de estrógenos, y en función de la positividad o no de los

mismos en las muestras de tejido tumoral, se indicaría la terapia adyuvante con melatonina.

Existen trabajos también en los que se describe el papel de la melatonina en la modulación de la actividad de la aromatasa en las células MCF-7 en mujeres con tumores mamarios ⁽¹⁷⁸⁾

Desde el punto de vista de la melatonina como terapéutica en el cáncer, las experiencias son aún escasas. Sin embargo, en una publicación sobre las drogas de mayor proyección en el ámbito de los ensayos clínicos (Gateway to Clinical Trials), la melatonina se encuentra entre los fármacos más estudiados en la actualidad y con mayor proyección ⁽¹⁷⁹⁾.

Hasta el momento, los resultados obtenidos en los ensayos clínicos han sido variables. De forma global, la mayoría de los estudios en Fase II analizando el uso de melatonina en enfermos con enfermedad metastásica por cáncer de mama, se ha observado una reducción de la trombocitopenia y un incremento objetivo de la respuesta del cáncer a la terapéutica instaurada ^(180,181) ..

Los resultados obtenidos en otros tumores, como los de pulmón, los pocos trabajos que lo han estudiado, no aportan datos aclaradores, pues si bien en unos observan una respuesta tumoral manifiesta ⁽¹⁸²⁻¹⁸⁴⁾ , en otros no la obtienen ⁽¹⁸⁵⁾ .

Áunque no se ajusta de forma específica a la patología a analizar en este trabajo, si resulta interesante comentar un estudio realizado en pacientes con hepatocarcinoma avanzado, en el que se realizó quimioembolización por arteria hepática previo a otros tratamientos como

78

el abordaje quirúrgico ⁽¹⁸⁶⁾. El estudio prospectivo y randomizado, presentó dos brazos, en uno de los cuales incluyeron enfermos a los que se les administró sólo la quimioembolización y en el otro se además añadió melatonina al quimioterapico embolizado. En este trabajo, la administración de melatonina intraarterial al hepatocarcinoma asociada al quimioterapico se tradujo en una reducción significativa del tamaño tumoral y un incremento significativo de las resecciones hepáticas que pasaron de 14% a 40% cuando se administró el indol intraarterial junto a la quimioterapia.

I-6.- TRATAMIENTO DEL CANCER DE PANCREAS

TRATAMIENTO QUIRURGICO

Reseña Histórica

La primera descripción del páncreas la realizó Herofilo de Chalcedon (300 a C) debiendo su nombre a Rufo de Efeso (100 a.C.). Sin embargo, hasta el siglo XVII no se descubren las características estructurales de la glándula. En 1.642 J.G.Wirsung⁽¹⁸⁷⁾ descubre el conducto principal de la glándula, que lleva su nombre y más tarde De Graff canula el mismo y estudia la secreción pancreática demostrando su verdadera significación.

En 1.673 J. Brunner⁽¹⁸⁸⁾ lleva a cabo la primera exéresis parcial del páncreas en un perro, obteniendo resultados óptimos y relaciona la diabetes con el páncreas al observar las alteraciones sufridas por otro perro al que practicó una resección mayor, provocándole una diabetes experimental.

Aunque en diversos trabajos^(188,189) se atribuye la descripción del cáncer de páncreas a Montier (1.836) o Bayle (1.812), ésta correspondería a Bonet⁽¹⁹⁰⁾ quien en 1.679 publicó cinco casos que son considerados como tales.

En el siglo XIX se inicia el desarrollo de la cirugía pancreática en el hombre. En 1.882 Trendelenburg realiza la primera exéresis de un tumor pancreático llevando a cabo la resección del cuerpo y cola pancreática con esplenectomía.

En el mismo año Winiwater inicia la cirugía paliativa del páncreas al llevar a cabo la anastomosis de la vesícula biliar al colon.

En 1.898 el cirujano francés Codivilla ⁽¹⁹¹⁾ realiza una verdadera proeza quirúrgica al extirpar un cáncer de páncreas llevándose el duodeno y parte de la glándula, sobreviviendo el paciente 24 días tras la intervención. Sin embargo, los mediocres resultados obtenidos en la cirugía pancreática provoca un cierto letargo en su desarrollo, contribuyendo a ello la idea mantenida en aquellos años de considerar al duodeno como indispensable para la vida.

En 1.935, coincidiendo con el advenimiento de la vitamina K, que evitaba la temible hemorragia de los pacientes con ictericia, Whipple, Parson y Mullins ⁽¹⁹²⁾ describen la duodenopancreatectomía cefálica en dos tiempos para la resección de un cáncer de la región ampular.

En 1.936 Orator aplica esta técnica al tratamiento del cáncer cefálico y posteriormente Brunshwig ⁽¹⁹³⁾ en 1.939 lleva a cabo la intervención en un sólo tiempo, estableciendo así la técnica quirúrgica actualmente en vigor.

Estado actual del tratamiento quirúrgico

En la actualidad se acepta que el tratamiento de elección en el cáncer de páncreas es la resección quirúrgica, con la que se obtienen los mayores índices de supervivencia ^(194,195)

La Duodenopancreatectomía cefálica con o sin preservación de píloro, es la técnica de elección en estos pacientes ^(195,196), si bien se han descrito resecciones no estandar para casos seleccionados de pacientes ⁽¹⁹⁷⁾

Con estas técnicas la mortalidad operatoria se sitúa en torno al 5% y las tasas de supervivencia son en promedio del 10-20% a los 5 años. Estas cifras se elevan al 24% cuando la resección se realiza con márgenes libres (R0) y al 32% cuando las adenopatías son negativas ⁽¹⁹⁸⁾.

A pesar de ser la técnica de elección cuando se habla de tratamiento con intención curativa, la escasa resecabilidad obtenida en el cáncer de páncreas, expresión de la tardanza en el diagnóstico, constituye la causa fundamental de la proliferación de la cirugía paliativa. Esta va dirigida a subsanar la obstrucción biliar y/o digestiva y aliviar el dolor provocado por la obstrucción del conducto pancreático o invasión de estructuras nerviosas. Esto se logra mediante derivaciones biliar, duodenal e infiltración del plexo celíaco respectivamente.

No exenta de morbimortalidad, su objeto es el de ofertar un confort de vida adecuado en el enfermo que ha rebasado sus posibilidades curativas.

TRATAMIENTO NO QUIRURGICO.

- COLOCACIÓN DE ENDOPRÓTESIS .

Buscando una disminución de la morbimortalidad inherente a los procedimientos quirúrgicos paliativos, se ha propuesto propuso la colocación endoscópica de prótesis endobiliares que garanticen la permeabilidad bilioentérica, frecuente-mente interrumpida en los tumores pancreáticos. Siendo esta vía la ideal también puede realizarse por vía percutánea cuando la primera no es factible.

Las indicaciones para la colocación de endoprótesis serían el drenaje paliativo en pacientes con enfermedad incurable y el drenaje biliar previo a un by-pass quirúrgico paliativo .

- QUIMIOTERAPIA.

El desarrollo de la quimioterapia en el tratamiento del cáncer pancreático ha avanzado lentamente por diversas causas:

1. El cáncer de páncreas es resistente a las formas no quirúrgicas de tratamiento como la quimioterapia o la radioterapia.

2. Se han evaluado pocos quimioterápicos aisladamente y esta evaluación es verdaderamente difícil por la dificultad de encontrar parámetros objetivos para controlar la enfermedad de estos pacientes. La remisión completa se define como la normalización de todas las anomalías relacionadas con el tumor, sin evidencia clínica o de laboratorio de tumor residual.

3. Los pacientes con neoplasia pancreática avanzada frecuentemente están debilitados, con anorexia y pérdida de peso, pudiendo presentar también disfunción hepática originada por la existencia de metástasis, que alteran la farmacocinética de los quimioterápicos que se eliminan principalmente por excreción biliar .

El fármaco evaluado de forma más completa en el adenocarcinoma de páncreas es el **5 - FLUORURACILO**, habiéndose obtenido remisiones hasta en el 67% de pacientes.

Otros fármacos que han demostrado tener una actividad comparable al **5 - FLUORURACILO** son el antibiótico **MITOMICINA C** y la **ESTREPTOZOTOCINA**, si bien la primera produce mayor toxicidad medular.

En los últimos años se ha puesto especial interés en los estudios con **GEMCITABINA**, que han mejorado los resultados de regímenes precedentes ⁽¹⁹⁹⁻²⁰³⁾.

No obstante, la evolución de las investigaciones han llevado a la obtención de moléculas que aportan mayor cantidad de 5-fluouracilo dentro del tumor, como la **CAPECITABINA** que está obteniendo excelentes resultados de tolerancia y respuesta en tumores digestivos como los de colon. Las características de esta droga y su aplicación en el cáncer de páncreas se expondrán en el apartado siguiente, al ser un elemento a evaluar en nuestro este trabajo.

Por otro lado, los resultados modestos con monoterapia han llevado a la asociación de diferentes drogas, como el irinotecan y el oxaliplatino ⁽²⁰⁴⁾.

Junto al desarrollo de nuevos fármacos quimioterápicos en los últimos años se han desarrollado líneas de trabajo para estudiar la utilidad en el cáncer de páncreas de farnesyl inhibidores de la transferasa, inhibidores de la matriz de la metaloproteasa, inhibidores del factor de crecimiento epidérmico, inhibidores de la angiogénesis y algunas formas de inmunoterapia o de terapia molecular. Todas estas líneas están en fase de desarrollo ^(205,206).

- RADIOTERAPIA.

La radioterapia externa se introdujo en el tratamiento del cáncer de páncreas en 1.973 considerándose en la mayoría de los trabajos publicados como una opción paliativa en los tumores no resecables, a muchos de los cuales tan sólo se les realiza laparotomía exploradora sin practicar derivación.

A dosis de 6.000-7.000 Rads., repartidos en 7 a 9 semanas, se consiguieron efectos paliativos objetivos, observándose una supervivencia después de 36 meses similar a pacientes tratados con cirugía paliativa .

Cuando se asoció radioterapia a dosis de 4.000 a 6.000 Rads. con 5 - FLUORURACILO, los efectos paliativos sobre los síntomas mejoraron así como la supervivencia ^(207,208).

I-7.- CAPECITABINA (XELODA®) EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER DE PANCREAS

GENERALIDADES

La Capecitabina (XELODA®), es un carbamato de fluoropirimidina con actividad antineoplásica. Es una prodroga sistémica de administración oral, la 5'deoxifluoridina (5'DFUR) que se transforma a 5 fluoruracilo.

Farmacocinética

Tras ser administrado por vía oral, se absorbe con facilidad en el tubo digestivo. En el hígado, una carboxiesterasa hidroliza gran parte del componente, transformándolo en 5'deoxi-5 fluorocitidina. A continuación la histidina deaminasa, una enzima presente en la mayoría de los tejidos, incluso en los tumores, convierte la 5'deoxi-5fluorocitidina en deso-5-fluorouridina. Luego la enzima timidita fosforilasa hidroliza esta última en la droga activa el 5 FLUORURACILO (5-FU) ⁽²⁰⁹⁾. Varios tejidos del organismo expresan la timidita fosforilasa. Algunos carcinomas expresan esta enzima en concentraciones más altas que las registradas en tejidos circundantes normales.

Mecanismo de acción

Las células normales y tumorales metabolizan el 5-FU transformándolo en 5-fluoro-2-deoxiuridina monofosfato y en 5-fluoridina trifosfato. Estos metabolitos provocan lesiones celulares mediante 2 mecanismos diferentes ⁽²⁰⁹⁾. En primer lugar bloquean la síntesis de DNA al impedir la formación de timidita trifosfato que es esencial para la síntesis de aquel. De esta forma se **inhibe la división celular**. El segundo mecanismo se basa en que las enzimas de transcripción nuclear, por error, pueden incorporar la 5-fluoridina en lugar de la uridina trifosfato durante la síntesis de RNA. Este error metabólico puede interferir **en el procesamiento del ARN y la síntesis proteica**.

CAPECITABINA EN EL CANCER DE PANCREAS

Las primeras indicaciones de la capecitabina como antineoplásico se realizaron en los tumores de mama y colorectal ^(209,210). En ambas localizaciones, los resultados con esta droga han sido muy prometedores, por lo que los trabajos se extendieron a otras indicaciones.

En estudios de Fase II ⁽²¹¹⁾ para evaluar la seguridad y eficacia de la capecitabina en el cáncer de páncreas, ya se observó una mejora clínica significativa así como una buena respuesta tumoral. Junto a esto, la tolerancia a la droga fue buena con escasos efectos secundarios, entre los que destacaron fundamentalmente los digestivos con diarrea, náuseas, No se han observado fallecimientos por toxicidad con esta droga.

Comparada con los fármacos de referencia hasta esos momentos, la Gemcitabina y el 5-fluoruracilo, la eficacia clínica es similar a la gemcitabina y bastante superior al 5-FU. De igual forma la supervivencia de los pacientes es mayor en los dos primeros que en el 5-FU.

A diferencia de la Gemcitabina, la Capecitabina parece ser mejor tolerada por los pacientes.

En un intento de mejorar los resultados, se están realizando estudios en los que combinan la gemcitabina y capecitabina ^(209,210). Clásicamente se han estado aplicando regímenes combinados de gemcitabina oral y 5-FU . La alta incidencia de complicaciones, debido al sinergismo de ambas drogas ha llevado a la puesta en marcha de estos trabajos. Hasta el momento parece que la combinación de gemcitabina con capecitabina es mejor tolerada, si bien es aún pronto para evaluar sus resultados, recomendándose la realización de estudios en fase III.

En estos momentos, por tanto, dada la buena tolerancia de la capecitabina y sus buenos resultados en clínica se la considera la droga con mayor proyección en el tratamiento del cáncer de páncreas y sobre la que se están centrando los estudios tanto en mono como en terapia combinada.

I-8.- MELATONINA EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER DE PANCREAS

Como se ha comentado previamente, existen trabajos que orientan hacia el posible uso de la melatonina en el contexto de enfermedades tumorales. Así hasta el momento se han realizado trabajos en el cáncer de pulmón ⁽¹⁸²⁻¹⁸⁵⁾ y sobre todo en el cáncer de mama en el que los resultados están siendo más prometedores ^(180,181).

Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios con la melatonina en el cáncer de páncreas humano.

Hipótesis de trabajo

El cáncer de páncreas es una entidad clínica frecuente que a menudo se presenta en estadios avanzados. La cirugía de resección es la técnica de elección en el manejo de estos enfermos. Sin embargo, este tipo de intervenciones pueden realizarse en un número limitado de enfermos debido a la extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico. Para mejorar el índice de resecciones y los resultados una vez realizada la misma, en la actualidad se está planteando la utilización de tratamientos quimioterápicos neo y adyuvantes.

Entre los quimioterápicos que se están utilizando la Capecitabina es el fármaco que está siendo más estudiado por su comodidad de administración por vía oral, su magnífica tolerancia y sus excelentes resultados.

Por otro lado, se sabe que en los mecanismos de iniciación, promoción y desarrollo del cáncer en general y el de páncreas en particular, el estrés oxidativo ocupa un papel predominante. La utilización de terapia antioxidante estaría justificada en un intento de controlar los mecanismos generadores y promotores del crecimiento tumoral relacionados con esta vía.

Entre los diferentes antioxidantes, se ha considerado la melatonina, el antioxidante endógeno más potente del organismo. Los receptores de este indol, producido en la glándula pineal, se han detectado en la gran mayoría de las células del organismo y también en células tumorales. Experiencias con la melatonina en el cáncer de mama hacen pensar que puede ser una terapia adyuvante en estos procesos. Sin embargo, hasta el momento no existen estudios que analicen el posible papel de la melatonina en el cáncer de páncreas.

Por otro lado, tampoco existen estudios en los que se asocien quimioterápicos con antioxidantes en la búsqueda de posibles sinergias.

De aquí que nos planteásemos la realización del presente estudio para analizar el papel de la melatonina, como antioxidante y antineoplásico en el tratamiento del cáncer de páncreas, analizando también los posibles efectos resultantes de la combinación de este antioxidante con la capecitabina como antineoplásico.

Objetivos

- **General:**

Evaluar el efecto de melatonina y capecitabina en el cáncer de páncreas experimental.

- **Específicos:**

- Evaluar el efecto de melatonina y capecitabina sobre los **marcadores de estrés oxidativo** en el cáncer de páncreas experimental.

- Analizar el impacto de la administración de ambos fármacos en los **hallazgos histopatológicos**.

- Comparar el resultado de la **suma de ambos fármacos** frente a los resultados obtenidos cuando se utilizan por separado (tanto a nivel de estrés oxidativo como a nivel histopatológico).

- Evaluar el efecto de la melatonina administrada como profilaxis, durante la fase de inducción tumoral.

Material y Método

4.1 ANIMALES:



Hamster sirio:

Origen: son nativos de las áridas regiones templadas de Asia menor y el sudeste europeo. En su medio natural los hamsters viven en túneles profundos que les asegura una temperatura fresca y una humedad alta en comparación con el medio desértico en general.

Genética/ anatomía:

5 Taxonomía:

ORDEN: Rodentia

FAMILIA: Cricetidae

GÉNERO: Mesocricetus

ESPECIE: auratus

6 Nombre común: hamster sirio o dorado (Syrian hamster o Golden- SYR)

7 Clases:

Adquiridas con manipulación genética: nomenclatura de los tipos más comunes (todos desarrollados por Billingham y Silvers):

1. MHA/ SsLak: ojos blanco-rosa; Mill Hill Albino-susceptible de caries dental.
2. LSH/SsLak: marrón y blanco; Escuela Londinense de Higiene.
3. CB/SsLak: marrón y blanco; Instituto Chester Beatty.
4. PD4/Lak: ojos blanco-rosa;
5. LHC/Lak: color crema; Colonia Lakeview hamster.

Clases no obtenidas genéticamente:

Lak;LVG(SYR)- Golden Syrian

8 Genotipo: Diploide (2n) con un número de cromosomas de 44.

- 9 Características fenotípicas: el adulto es más grande que un ratón, de catorce a veinte centímetros de longitud y un peso entre 110 y 150 gramos.

| PARÁMETRO | VALOR |
|--------------------------------|----------------------|
| Peso adulto | |
| Macho | 85-150 gm |
| Hembra | 95-120 gm |
| Esperanza de vida | |
| Media | 2 años |
| Máximo esperado | 3 años |
| Número de cromosomas | 44 |
| Consumo de agua | 30 ml/día |
| Consumo de alimento | 10-15 gm/día (adult) |
| Temperatura corporal | 36.2-37.5 C (rectal) |
| Frecuencia cardíaca | 280-412/min |
| Frecuencia respiratoria | 74 (33-127) |

4.2 MANTENIMIENTO DE ANIMALES:

El estudio se ha realizado en machos de Hamster Sirio (Harlan Interfauna Ibérica- España) de 8 semanas de edad y un peso inicial de 70-80gr. Los hamsters son introducidos en jaulas de cinco animales cada una, bajo condiciones estándar de temperatura y humedad (21 ± 5 ° C. 70% de humedad) así como ciclos de 12 horas de luz: 12 horas de oscuridad. Los animales tienen acceso a una dieta estándar y a reservorios de agua a los que pueden acceder libremente y que son renovados diariamente, son evaluados semanalmente controlándose tanto el peso como la situación de salud de los mismos.

4.3. INDUCCIÓN DEL TUMOR:

Gingell y cols. ⁽²¹²⁾ fueron los primeros en describir en 1976 el metabolismo de dos potentes carcinógenos -derivados oxopropilamínicos -,BOP -N-nitroso-bis(2-oxopropyl)amina- y

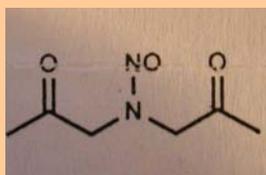
BHP -N-nitroso-bis(2-hydroxypropyl)-, en hamster sirio. Pero fue Pour y cols. un año después quien describe el modelo de cáncer de páncreas en hamster sirio inducido por el carcinógeno BOP, en sus trabajos el autor describe como dos diferentes pautas de inducción tumoral producen un efecto carcinogénico sobre páncreas y pulmón así como las pequeñas variantes lesionales e histopatológicas que las diferentes pautas provocan sobre el tejido pancreático. Estudios posteriores centrados en las diferentes vías de administración del carcinógeno BOP a hamster sirio demuestran como si éste es proporcionado por vía oral durante al menos 90 días el resultado es una mayor incidencia de tumores de vías biliares tanto intra como extrahepáticas, no produciéndose en estos casos tumores a nivel de riñón o pulmón.

La mayoría de los autores han adoptado modelos en los que se realiza inducción semanal durante al menos 10 semanas (10 mg BOP sc /kg de peso / semanalmente) si lo que se busca es un modelo con repercusión histopatológica considerable, es decir, con lesiones más numerosas a nivel de páncreas, mayor número y más diferenciadas, así como un aumento en la incidencia de metástasis hepáticas. En estudios donde se busca un efecto en períodos de inducción o posinducción precoz es posible el modelo de inducción rápida con menor número de dosis : en general de 10 a 20 mg/ kg sc / semanalmente durante las tres primeras semanas, en estos casos las lesiones inducidas son menos evidentes macroscópicamente y el grado de diferenciación lesional también menor.

PRODUCTO: N-Nitrosobis(2-oxopropyl)amine.

SINÓNIMOS: 2,2'-Dioxo-N-nitroso-dipropilamina;

ESTRUCTURA:



FÓRMULA MOLECULAR: C₆H₁₀N₂O₃

PESO MOLECULAR: 158.16

FUENTE: Sintético

La inducción del tumor se ha realizado en base a modelos bien establecidos en la literatura con el inductor BOP: N-nitrosobis(2-oxopropyl)amina. El modelo consiste en una inyección semanal durante un período prefijado de doce semanas a machos de hamster sirio con lo que se consigue inducir el tumor en el animal. En nuestro modelo, de acuerdo con lo expuesto anteriormente, se realizó como sigue a continuación:

BOP 10 mg/ kg de peso sc semanalmente, durante 12 semanas (ChemosGmbH, Alemania). Este es el tiempo que se precisa para inducir el cáncer de páncreas experimental.

El inductor se conserva congelado a -80°C con una pureza del 98% y con aspecto de cristal transparente que debe ser descongelado y solubilizado para su dosificación. El cancerígeno BOP fue disuelto en SSF, realizándose alícuotas conteniendo cada una de ellas en un volumen de 1000 microlitros 10 mg de BOP. La administración se realiza mediante inyección subcutánea con jeringas y agujas de insulina en la región subescapular del animal, de tal forma que de cada alícuota obteníamos 10 dosis de 100 microlitros y 1 mg de BOP. Se almacenaron las alícuotas congeladas a -80°C . La inyección fue semanal durante el período prefijado - desde el punto 0 de comienzo hasta la semana 12-.

Los animales un día a la semana (se prefijó de antemano el jueves) fueron transportados en sus jaulas a una mesa con todo el material necesario para la dosificación de BOP. Al lado de cada jaula se colocó otra limpia a la que se fueron pasando aquellos animales ya inducidos.

Para la inyección subcutánea de BOP no se utilizó ningún tipo de anestésico o sedante de tal forma que con una entremetida el ayudante tapó la cabeza del animal quedando así inmovilizado. Seguidamente se pellizó suavemente la piel redundante que cubre el dorso de modo que quede un espacio suficiente para la inyección subcutánea de BOP. La administración fue rápida en la mayoría de las ocasiones y no planteó más dificultad que el inmovilizar adecuadamente al animal para lo que es necesario de una segunda persona. Tras esto los animales fueron devueltos a una jaula junto con los ejemplares a los que ya se les había dado la dosis semanal del cancerígeno.

Se decidió esta pauta de inducción por varios motivos: en primer lugar para asegurar una dosificación de cancerígeno suficiente como para poder achacar un efecto protector con suficiente garantía a las sustancias utilizadas en el estudio (melatonina y celecoxib), y , en segundo lugar, porque nos permitiera una comprobación macroscópica de las lesiones producidas. En definitiva no nos parecía suficiente obtener lesiones precursoras que solo se

podieran evidenciar al microscopio ya que, como veremos más adelante, a la hora de la toma de muestras necesitabmos de visu aislar tejido sano pancreático para las determinaciones de estrés oxidativo. En definitiva, una dosis de 10 mg/kg de peso semanal durante las 10 o 12 primeras semanas asegura una buena inducción tumoral.

Se dosifica BOP según el peso de los animales de la siguiente forma:

| PESO (gr) | DOSIS BOP (mg) |
|------------------|-----------------------|
| 80-100 | 0,9 |
| 100-120 | 1,1 |
| 120-150 | 1,3 |
| >150 | 1,5 |

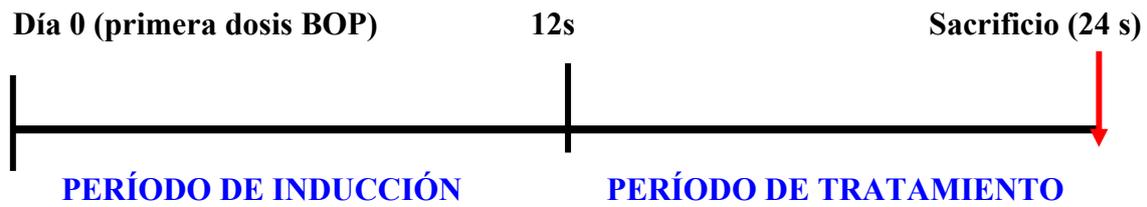
4.4 DISEÑO DEL ESTUDIO:

Estudio experimental prospectivo utilizando machos de hamster sirio con un peso inicial homogéneo (70-80 gr).

Se estudiaron 80 animales de estas características que fueron randomizados después de una semana de aclimatación en 8 grupos de 10 animales cada uno.

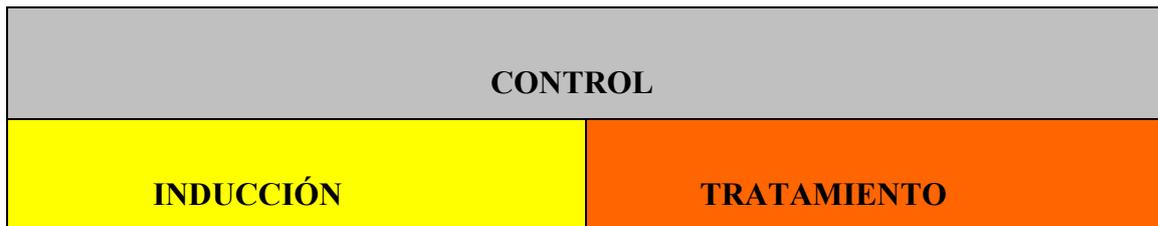
Como se puede observar en la gráfica iniciamos en el punto 0, que indica la primera inducción, y terminamos en la semana 24 con el sacrificio y toma de muestras del animal.

Denominamos *fase de inducción* a aquel período de tiempo comprendido entre el día 0 o de inicio y el último día de la semana 12. De igual modo hablaremos de fase de tratamiento al referirnos al período de tiempo comprendido entre el final de la fase de inducción y el último día de la semana 24.

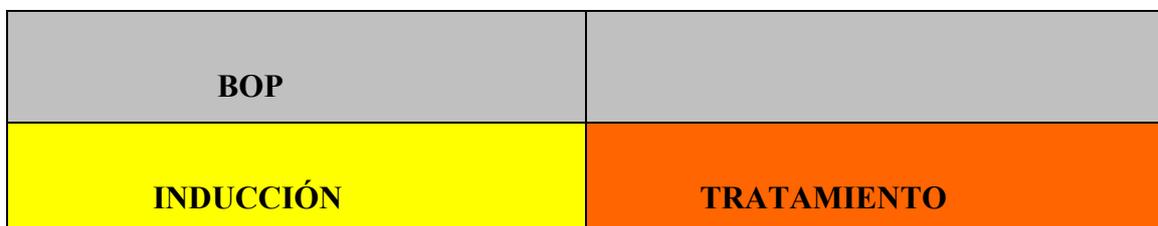


GRUPOS DE ANIMALES:

Grupo 1: Control (n=10) al que no se indujo tumor. Se les inyectó una vez a la semana 100 microlitros de SSF, el mismo día que se inujo tumor al resto de los grupos. Fueron sometidos a su vez a la misma dieta estandar que el resto de animales y, de igual modo, tuvieron acceso libre a agua de bebida.



Grupo 2: Control BOP (n=10). Grupo control al que se indujo tumor mediante 10 mg/kg peso de BOP inyectado en subcutáneo semanalmente durante 12 semanas que es el período estandarizado para la inducción del tumor.



Grupo 3: BOP + Melatonina por vía oral durante las 12 semanas de tratamiento iniciado tumor con BOP.

| | |
|----------------|----------------------------|
| 12 SEMANAS | 12 SEMANAS |
| INDUCCIÓN: BOP | TRATAMIENTO: MELATONINA |

Grupo 4: BOP+ Capecitabina por vía oral durante las 12 semanas de tratamiento .

| | |
|----------------|------------------------------|
| 12 SEMANAS | 12 SEMANAS |
| INDUCCIÓN: BOP | TRATAMIENTO: CAPECITABINA |

Grupo5: BOP+ Capecitabina y melatonina por vía oral durante las 12 semanas de tratamiento iniciado tumor con BOP.

| | |
|----------------|---|
| 12 SEMANAS | 12 SEMANAS |
| INDUCCIÓN: BOP | TRATAMIENTO: MELATONINA + CAPECITABINA |

Grupo 6: BOP + melatonina en fase de inducción seguido de melatonina en fase de tratamiento

| 12 SEMANAS: | 12 SEMANAS |
|--|--|
| INDUCCION TUMORAL: BOP PROFILAXIS: MELATONINA | TRATAMIENTO: - MELATONINA |

Grupo 7: BOP + melatonina en fase de inducción seguido de capecitabina en fase de tratamiento

| 12 SEMANAS: | 12 SEMANAS |
|--|--|
| INDUCCION TUMORAL: BOP PROFILAXIS: MELATONINA | TRATAMIENTO: - CAPECITABINA |

Grupo 8: BOP + melatonina en fase de inducción seguido de melatonina +capecitabina en fase de tratamiento

| 12 SEMANAS: | 12 SEMANAS |
|--|---|
| INDUCCION TUMORAL: BOP PROFILAXIS: MELATONINA | TRATAMIENTO: - MELATONINA + CAPECITABINA |

CARACTERÍSTICAS MORFOTÍPICAS DE LOS GRUPOS Y ANIMALES QUE COMPLETARON EL ESTUDIO

El peso final y las características morfológicas de los animales fueron similares en la mayoría de los casos.

Los animales a los que no se indujo tumor (controles sanos) presentaron un peso que oscilaba los 130 ± 3.5 g, mientras que los controles enfermos (controles BOP) mostraban al sacrificio un peso medio de 120 ± 3 g.

En cuanto a los grupos de animales tratados en diferentes períodos con melatonina o capecitabina no existieron diferencias significativas entre ellos, con un promedio de 125 ± 2 g en los grupos de melatonina y 126 ± 3 g en los de capecitabina.

El número de animales que completaron el estudio en cada grupo fueron:

| GRUPO | ANIMALES AL FINAL DEL ESTUDIO |
|-------------------|-------------------------------|
| Control sanos | 10/10 (100%) |
| Control BOP | 9/10 (90%) |
| MELtto | 9/10 (90%) |
| CAPtto | 7/10 (70%) |
| MEL-CAPtto | 7/10 (70%) |
| MELind | 10/10 (100%) |
| MELind/tto | 10/10 (100%) |
| MELind/MEL-CAPtto | 9/10 (90%) |
| 71/80 | |

Control BOP= control enfermos, MELind= melatonina en período de inducción, MELtto= melatonina en período de tratamiento, MELind/tto= melatonina en período de inducción y tratamiento, MELind/MEL-CAPtto= melatonina en período de inducción y melatonina y capecitabina en tratamiento, MEL-CAPtto= melatonina y capecitabina en tratamiento, CAP/tto= capecitabina en período de tratamiento

4.5 DIETA:

Dieta estandar con pienso para roedores de laboratorio (EBRO AGRÍCOLAS S.A., Sevilla, España) con una energía metabolizable de 2375 calorías/kg.

4.6 TERAPIA:

MELATONINA (Sigma Aldrich, España).

El uso de melatonina vía oral en animales de experimentación no supone una gran dificultad en primer lugar porque su presentación , en forma de polvo, permite disolverlo en agua de bebida y en segundo lugar porque no cambia las características de dicha solución siendo el olor y sabor idénticos al del agua de bebida normal.

La melatonina se administró a dosis de 20 microgramos por ml de agua de bebida (las dosis máximas para su disolución son de 0,1 mg /ml) desde las 3 pm hasta las 8 am del día siguiente durante los períodos prefijados.

La Melatonina fue preparada en alícuotas de 2mg para su dilución en agua de bebida corriente a la que tuvieron acceso libremente los animales y que, por otro lado, siempre se mantuvo en recipientes opacos para evitar su oxidación. Se prepararon inicialmente volúmenes de 100 ml para su administración, evaluándose diariamente la necesidad de incrementar el volumen. Éste volumen de 100 ml contiene 2 mg de Melatonina que correspondería a una proporción de 20 microgramos/ ml (20 mg/ l), dosis demostrada como efectiva en anteriores estudios con animales de experimentación ya que es la que se ha demostrado proporciona un efecto antitumoral.

CAPECITABINA (Roche Farma, España):

La vía de administración fue la misma que en el caso de Melatonina, es decir, vía oral preparado en la comida del animal. Utilizando un molinillo eléctrico trituramos el pienso del animal para mezclar las dosis de capecitabina proporcionales que van en una cantidad determinada de alimento: la dosis que se han visto efectiva en tumores digestivos (colon, gastroesofágico) es de 1500 ppm, o lo que es lo mismo, 1500 mg de capecitabina por cada kg de alimento.

Preparado del pienso con capecitabina se hizo para ser utilizado en un período máximo de siete días con el fin de que no se perdieran sus propiedades o se estropeará. Utilizamos un molinillo eléctrico para triturar el pienso de forma que por cada kg del mismo añadimos 1,5 gr de capecitabina.

Una vez preparado fue conservado en lugar fresco para evitar su deterioro y la cantidad remanente de cada semana fue desechada.



4.7 SACRIFICIO DE ANIMALES Y TOMA DE MUESTRAS.

Todos los animales fueron sacrificados a las 24 semanas de estudio bajo anestesia con Ketamina (4 mg/ Kg ip) y Midazolán (80 mg/ Kg ip). Previamente al sacrificio se procedió al pesaje de cada espécimen. Mediante agujas de insulina se procedió a inyección intraperitoneal primero de dosis equivalente de midazolán y minutos después fue inyectada la ketamina. Una vez anestesiado el animal y rasurada toda la región ventral practicamos laparotomía media supra-infraumbilical con corte frío . Para una mejor exposición del diafragma se procedió a ampliar lateralmente la laparotomía, de esta manera podemos empujar caudalmente la cúpula hepática para poder acceder a cavidad torácica. Se procedió seguidamente a abrir el diafragma para exanguinar al espécimen mediante punción cardíaca directa. La sangre fue almacenada en tubos (tubos tapón naranja) Vacutainer[®] K₃ EDTA (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Plymouth UK) para suero. Los tubos se dejaron una hora a 4°C para ser posteriormente procesados (fueron centrifugados durante 10 minutos a 3000 rpm. y se transfirió el sobrenadante a 5 tubos Eppendorf que se congelaron a –80°C para determinaciones analíticas posteriores). Por último se extrajeron en bloque las vísceras para realizar una sistemática toma de muestras:

1. Páncreas: cortes de regiones macroscópicamente libres de tumor, preferiblemente de región esplénica y duodenal, se utilizaron de muestra para estudio de estrés oxidativo. Separamos trozos de mas o menos 1 cm² (22± 19mg)de tejido en criotubos y congelamos inmediatamente en N₂ líquido.En el caso del tejido pancreático se llenan tan solo 2 criotubos. (De aquí se sacan las determinaciones de estrés oxidativo). Posteriormente se pasan a un congelador a -80° C.
2. El resto del páncreas cortado en secciones de 1-2 mm de ancho se ponen en botes de orina con mas o menos 25 ml de paraformaldehído. Estas muestras se utilizarán para estudio de Anatomía Patológica: tinción con hematoxilina-eosina para el examen histológico posterior.

Todas las lesiones identificadas fueron registradas mediante fotografía para posterior correlación con microscopía.

4.8 PARÁMETROS ANALIZADOS:

8.1. *Parámetros de estrés oxidativo:*

Determinaciones en tejido pancreático, pulmonar y hepático así como suero:

- Malondialdehído+4Hidroxinonenales (MDA + 4HNE)
- Glutación reducido (GSH)
- Glutación peroxidasa (GSH-Px)
- Superóxido dismutasa (SOD)
- Catalasa (CAT)

8.2 *Grados de afectación histológica:*

Las lesiones preneoplásicas, las border-line, así como los carcinomas in situ y los adenocarcinomas ductales son clasificados de acuerdo con los criterios de Meijers et al ⁽²¹³⁾

PÁNCREAS

- Adenocarcinoma (ADC)
- Hiperplasia
- Displasia

DETERMINACIONES DE TEJIDO PANCREÁTICO

a) **Lipoperóxidos MDA + 4 HNE (LPO)**

La determinación de lipoperóxidos MDA + 4HNE (malondialdehído + 4-hidroxinonenales) fue realizada en el laboratorio del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba mediante la utilización de kit colorimétrico Bioxitech® LPO-586™ (OXIS Internacional, Inc. Portland, OR 97217-3925 USA) y lectura en espectrofotómetro Shimadzu UV-163.

El proceso para su determinación fue el siguiente:

⇒Preparación de tejidos:

- Lavar con suero fisiológico
- Pesar órganos (cantidad a determinar 100-150 mg)
- Diluir el tejido con buffer (Tris CLH 20mM, pH 7,4) 10% (1 g/10 ml)
- Homogeneizar
- Centrifugar a 10.000 rpm a 4°C durante 15 minutos
- Recoger sobrenadante

⇒Procedimiento:

- Blanco frente: reactivo + agua + ácido metasulfónico
- Estándar (20 μ mol) = diluir Sol. madre 1/128 de agua

- 1.- 975 μ l de N metil 2 fenilindol 10.3 mM (en acetonitrilo. 2 156g/l)
a 1/3 en metanol 100%
- 2.- 300 μ l de las muestras y estándar
- 3.- Mezclar durante 3-4 s.
- 4.- Añadir 225 μ l de ácido metasulfónico 15.4 M
- 5.- Mezclar
- 6.- Incubar a 45°C durante 40 min.
- 7.- Enfriar con hielo
- 8.- Leer la absorbancia a 586 nm.

b) Catalasa (CAT):

La determinación de CAT se realizó en el laboratorio del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba mediante técnica de espectrofotometría, utilizando el método-UV y lectura en el espectrofotómetro Shimadzu UV-163.

El proceso para su determinación fue el siguiente:

⇒Preparación de tejido:

- 1.- Buffer fosfato
- 2.- Homogeneizar
- 3.- Centrifugar 15 min.
- 4.- Recoger sobrenadante

⇒Procedimiento:

- 1.- 720 µl de muestra
- 2.- 720 µl de peróxido de hidrógeno 10 mM (1.03 ml de H₂O₂ en 998.97 ml de buffer)
- 3.- Leer a 240 nm

⇒Cálculo:

$$K = (1/t) \times \ln(A_1/A_2)$$

}

A₁= Absorbancia a los 30 s.

A₂= Absorbancia a los 90 s.

t = Intervalo de tiempo entre A₁ y A₂ (1min)

ln= logaritmo neperiano

c) Superóxido Dismutasa (SOD):

La determinación de SOD fue realizada en el laboratorio del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba mediante técnica de espectrofotometría. La lectura se realizó en el espectrofotómetro Shimadzu UV-163 .

El proceso de su determinación fue el siguiente:

⇒Preparación de tejido:

- 1.- Buffer fosfato
- 2.- Homogeneizar

- 3.- Centrifugar 15 min.
- 4.- Recoger sobrenadante

⇒Procedimiento:

Blanco frente al aire

- 1.- 100 μ l de muestra
- 2.- 400 μ l de agua
- 3.- 500 μ l de pirogalol 2 mM (12.6 mg/ 50 ml buffer) en buffer cacodílico 50 mM (345 mg/ 50 ml agua) + 1 mM de dietilentriaminopentacético ácido (0.06 g/ 50 ml agua)
- 4.- Curva estándar con SOD 500 U/ ml (reconstruir el frasco de 3000 U con 6 ml de agua)
- 5.- Leer a 420 nm

d) Glutación peroxidasa (GSH-Px):

La determinación de GSH-Px fue realizada en el laboratorio del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba mediante técnica de espectrofotometría. La lectura se realizó en el espectrofotómetro Shimadzu UV-163 .

El proceso para su determinación fue el siguiente:

⇒Preparación de tejido:

- 1.- Muestra tisular 150-200mg
- 2.- Añadir 4 ml de tampón fosfato potásico 0.1 M pH 7
- 3.- Homogeneizar
- 4.- Verter en tubos plásticos
- 5.- Centrifugar 10000 rpm durante 15 min a 4°C
- 6.- Recoger sobrenadante
- 7.- Determinación de proteínas por el método Bradford

⇒Procedimiento:

- 1.- Coger volumen equivalente a 25 μ g de proteína
- 2.- Añadir tampón fosfato 0.1 M hasta completar un volumen de 880 μ l
- 3.- Añadir 53 μ l de Glutación Reductasa (17.4 mg / 0.5 ml de tampón)
Congelador
- 4.- Añadir 133 μ l de GSH (30.7 mg / 10 ml de tampón)

- 5.- Añadir 100 μ l de NADPH [12.5 mg/ 10 ml (10 mg bicarbonato sódico / 10 ml de agua)]
- 6.- Agitar
- 7.- Añadir 100 μ l de ter Butyl hidroperóxido (15.5 μ l/ 10 ml de tampón)
- 8.- Leer durante 5 min a 340 nm, midiendo cada 30 segundos.

⇒Cálculos:

$$U (\mu\text{mol} / \text{min}) = \frac{\text{AO} / \text{min}}{6.22}$$

U= Unidades de enzima que transforman 1 μ mol de sustrato correspondiente en 1 minuto

AO= Incremento o decremento de la ABS

e) Glutación reducido (GSH):

La determinación de GSH fue realizada en el laboratorio del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba mediante técnica de espectrofluorimetría. La lectura se realizó en el espectrofluorímetro Zuzi 930 .

El proceso para su determinación fue el siguiente:

⇒Preparación de tejido:

- 1.- Coger 300 mg de tejido
- 2.- Añadir 3,75 ml de tampón fosfato sódico 0.1 M, pH 8
(fosfato bisódico 14.9 g / l + fosfato monosódico 15.6 g / l + EDTA 146 mg / 100 ml)
- 3.- Homogeneizar
- 4.- Añadir 1 ml de ácido fosfórico al 25 %
- 5.- Centrifugar a 10000 rpm durante 15 min a 4°C
Durante el tiempo de centrifugación se prepara la curva estándar de GSH. Sol. madre 1 mmol / l (3.073 mg / 10 ml tampón) = 1 mmol / μ l
- 6.- Recoger sobrenadante

⇒Procedimiento:

- 1.- 1.8 ml de tampón en todos los tubos (muestras y curva estándar)
- 2.- 100 μ l de muestra y curva (el primer punto es sol. madre / 4)

3.- 100 μ l de O-phtaldialdehído (6 mg/ 6 ml metanol)

Ref. P-0657.Sigma 210

4.- Agitar e incubar 15 min a temperatura ambiente

5.- Centrifugar a 4000 rpm. hasta quedar el sobrenadante claro (15 min.)

6.- Lectura a 350 nm de excitación y 440 de emisión.

SOPORTE BIBLIOGRÁFICO

Las búsquedas bibliográficas han sido realizadas en internet a través de la Base de datos Medline (National Library of Medicine, NLM).

Los artículos originales fueron obtenidos a través del Servicio de Biblioteca del Hospital Universitario “Reina Sofía” de Córdoba y Servicio de Documentación Científica de Wyeth.

SOPORTE INFORMÁTICO:

Ordenador personal Acer Travel Mate 290, Pentium Mobile a 1,7 GH, 512 MB de RAM, utilizando el Sistema operativo Microsoft® Windows® XP Home Edition Versión 2002 y el paquete integrado Microsoft® Office 2000 Professional.

El análisis estadístico se ha realizado con el programa SPSS 11.0 para Windows (Microsoft®, USA) en el Servicio de Estadística del Hospital Universitario Reina Sofía (Dra. MC Villanueva).

4.11 ÉTICA Y LEGISLACIÓN:

Durante el presente trabajo experimental se han tenido en cuenta los principios rectores básicos, de carácter internacional, aplicables a las investigaciones biomédicas con animales basados en normativa española Real Decreto 223/1988 del 14 de marzo, normativa incluida en éste decreto según la directiva 86/609 de la Comunidad Europea para la utilización de animales de experimentación.

Resultados

1.- EFECTO DEL CARCINÓGENO BOP (N-nitroso-bis(2-oxopropyl)amina) EN INDUCCIÓN TUMORAL

En este apartado se analiza el efecto del inductor tumoral en las 12 primeras semanas, se evalúa el impacto del carcinógeno sobre parámetros de estrés oxidativo, comparándolo con animales sanos a los que no se administró BOP. Fue de éstos últimos de los que se tomaron los niveles de marcadores de estrés oxidativo como referencia para analizar diferencias, tanto en el grupo control de animales enfermos como en los diferentes grupos de tratamiento con melatonina y capecitabina.

1.1 EFECTO DE BOP SOBRE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO MEDIDOS EN TEJIDO PANCREATICO RESPECTO AL GRUPO CONTROL:

En el páncreas de los animales a los que se indujo el tumor pudimos observar un gran incremento de los lipoperóxidos. Si en el grupo de controles sanos la media de MDA (nmol/l) fue de 6.95 ± 0.74 , los animales a los que se trató con BOP presentaron unas cifras de 26.80 ± 4.33 ($p=0,000$) (Tabla 1).

En cuanto a marcadores de defensa contra el estrés oxidativo se observó un descenso de todos ellos en aquellos animales inducidos con BOP respecto a los controles sanos. GSH descendió 4.65 nmol/l, CAT en 0.10 y GSH-Px disminuyó 0.20 U/l. También SOD vió descendidos sus niveles en 2.11 U/l respecto a los controles sanos, siendo las diferencias en todos los parámetros estadísticamente significativas (Tabla 1).

Tabla 1.- . Resultados de la administración de BOP en los parámetros de estrés oxidativo.

| PÁNCREAS | CONTROL SANOS | CONTROL BOP | Dif. medias | P |
|--------------|-----------------|------------------|-------------|-------|
| LPO (nmol/l) | 6.92 ± 0.68 | 26.80 ± 4.33 | -19.88 | 0.000 |
| GSH (nmol/l) | 6.47 ± 0.68 | 1.78 ± 0.43 | 4.68 | 0.000 |
| SOD (U/l) | 6.35 ± 0.69 | 4.15 ± 1.07 | 2.20 | 0.000 |
| CAT (U/l) | 0.14 ± 0.02 | 0.04 ± 0.01 | 0.10 | 0.000 |
| GSH-Px (U/l) | 0.50 ± 0.05 | 0.30 ± 0.02 | 0.20 | 0.000 |

LPO = Lipoperóxidos; GSH = Glutacion reducido; SOD = Superóxido dismutasa; CAT = Catalasa; GSH-Px = Glutacion peroxidasa. Los resultados se expresan en media \pm desviación estándar.

1.2 EFECTO DE BOP EN EL TEJIDO PANCREATICO: ESTUDIO HISTOPATOLOGICO

Como era de esperar, en el grupo control (animales sanos) no se encontró ningún animal que presentara lesiones sospechosas de malignidad. El páncreas de estos animales se informó como normal en todos los casos.

El grupo control con BOP, con un número de animales efectivos de 9, presentó tumores en todos ellos. En 6 se presentaron como un tumor único y 3 animales presentaban dos tumores al analizar las piezas. Por tanto, el 100% de los animales a los que se indujo el tumor presentaron enfermedad.

Características macroscópicas de los tumores:

El páncreas normal de un hamster sirio se presentó como un tejido rosado a forma de tegumento que ocupaba, de forma virtual, el espacio entre la porción duodenal y gástrica hasta el bazo (Fig. 7)

Los tumores se presentaron como áreas blanquecinas induradas y nodulares dentro de un páncreas e la mayoría de los casos congestivo. Como puede apreciarse en la fig. 8 se puede apreciar un área nodular.

La localización más frecuente fue en cuerpo y cola (64%) frente porción duodenal y gástrica (36%). En las figuras 8 y 9 se puede apreciar dos ejemplos de la presentación de tumores pancreáticos en porción duodenal y esplénica.

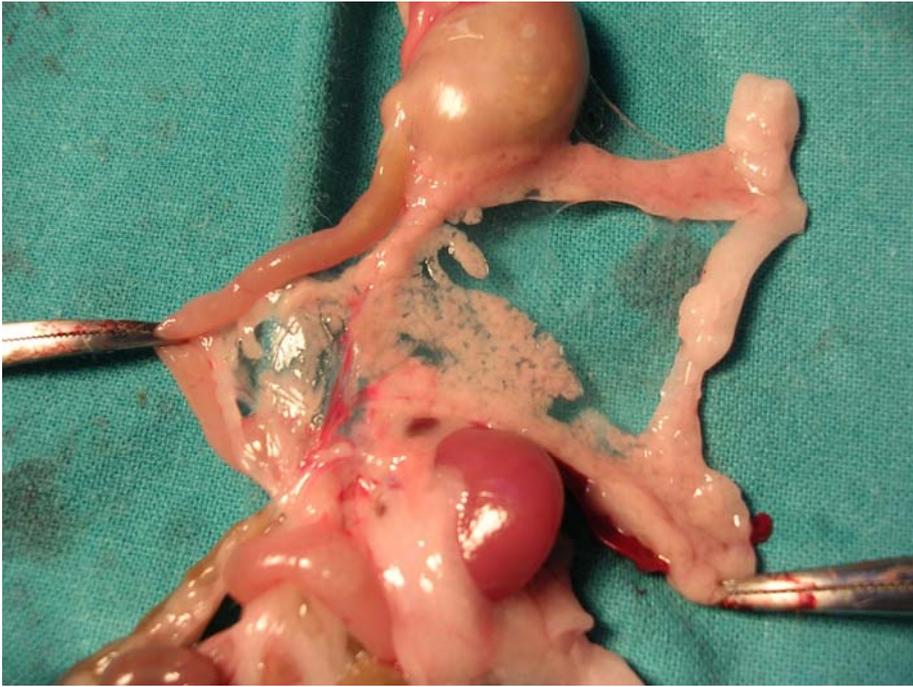


Fig 7. Páncreas normal.

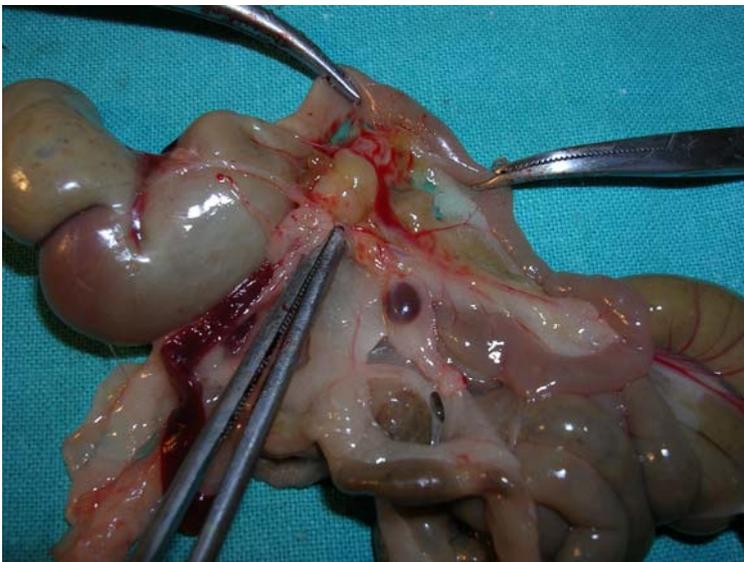


Fig 8. Tumoración en porción duodenal



Fig 9. Tumoración en porción esplénica

2. MELATONINA VS CAPECITABINA APLICADAS DE FORMA AISLADA EN LA FASE DE TRATAMIENTO EN EL CANCER DE PANCREAS EXPERIMENTAL.

En este apartado se analizarán los resultados de la melatonina y capecitabina administrados de forma aislada tras las doce semanas del período de inducción del cáncer de páncreas experimental, o lo que es lo mismo, administrada en fase de tratamiento.

| 12 SEMANAS | 12 SEMANAS |
|-----------------------|---|
| INDUCCIÓN: BOP | TRATAMIENTO: MELATONINA O CAPECITABINA |

Se analizarán tanto los marcadores de estrés oxidativo como los resultados histológicos. Para una mejor exposición se presentarán primero los resultados de la melatonina, después los de capecitabina y finalmente se llevará a cabo la comparativa entre ambos.

2.1 EFECTO DE MELATONINA

2.1.1. RESULTADOS EN LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

Como puede apreciarse en la tabla 2, la administración de MELATONINA en la fase de tratamiento, presentó niveles elevados de lipoperóxidos **respecto a controles sanos** ($p=0.000$). Además todas las enzimas de protección presentaron niveles inferiores frente a animales sanos.

Respecto a los animales enfermos sin tratamiento (los controles BOP), los niveles de LPO descendieron si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Las enzimas antioxidantes, por el contrario, mostraron una elevación estadísticamente significativa en la mayoría de ellas (sin diferencias en cuanto a los niveles de SOD respecto a controles BOP y con unas cifras significativamente mayores en lo que se refiere a GSH, CAT y GSH-Px) (Tabla 2).

Tabla2. Resultados de la administración de melatonina en el periodo de tratamiento.

| PÁNCREAS | CONTROL SANOS | CONTROL BOP | MELATONINA tratamiento | Dif. medias ^{1,2} | P ^{1,2} |
|--------------|---------------|--------------|------------------------|----------------------------|------------------|
| LPO (nmol/l) | 6.92 ± 0.68 | 26.80 ± 4.33 | 22.57 ± 4.56 | 15.65 -4.23 | 0.000 0.020 |
| GSH (nmol/l) | 6.47 ± 0.68 | 1.78 ± 0.43 | 3.55 ± 0.59 | -2.92 1.76 | 0.000 0.000 |
| SOD (U/l) | 6.35 ± 0.69 | 4.15 ± 1.07 | 3.92 ± 0.84 | -2.43 -0.23 | 0.000 1.000 |
| CAT (U/l) | 0.14 ± 0.02 | 0.04 ± 0.01 | 0.06 ± 0.02 | -0.08 0.02 | 0.000 0.017 |
| GSH-Px (U/l) | 0.50 ± 0.05 | 0.30 ± 0.02 | 0.42 ± 0.06 | -0.08 0.12 | 0.223 0.001 |

LPO = Lipoperóxidos; GSH = Glutation reducido; SOD = Superóxido dismutasa; CAT = Catalasa; GSH-Px = Glutation peroxidasa.

Los resultados se expresan en media ± desviación estándar. P = Significación estadística de la diferencia de medias.

¹Diferencia de medias y significación estadística respecto al grupo control sanos y ² respecto al grupo control BOP

2.1.2. EFECTO DE LA MELATONINA EN LOS HALLAZGOS

HISTOPATOLÓGICOS

De los 9 animales que llegaron al final del estudio (90%), 3 presentaron adenocarcinoma de páncreas (33,3%), cifra inferior a la observada en los animales no tratados en los que aparecieron tumores en todos los animales. En los 3 casos se trató de adenocarcinomas moderadamente diferenciados.

2.2. EFECTO DE CAPECITABINA

2.2.1. RESULTADOS EN LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

Respecto a los **controles sanos**, en la tabla 3 podemos comprobar como la administración de CAPECITABINA durante la fase de tratamiento, las diferencias respecto a los animales sanos son muy evidentes. El aumento de LPO en 23.48 nmol/l es uno de los mayores encontrados en el estudio. De igual forma se mantiene un descenso importante en el conjunto de defensas antioxidantes.

Respecto a los **controles BOP**, los niveles de LPO no presentaron diferencias significativas respecto a animales enfermos. En cuanto a las enzimas antioxidantes, si bien los niveles de estas fueron ligeramente superiores a los controles sin tratamiento, las diferencias no fueron significativas excepto para la Catalasa ($p=0.001$).

Tabla 3. Resultados de la administración de capecitabina en el periodo de tratamiento.

| PÁNCREAS | CONTROL SANOS | CONTROL BOP | CAPECITABINA Tratamiento | Dif. medias ^{1,2} | P ^{1,2} |
|--------------|---------------|--------------|--------------------------|----------------------------|------------------|
| LPO (nmol/l) | 6.92 ± 0.68 | 26.80 ± 4.33 | 23.48 ± 0.51 | 16.56 -3.32 | 0.000 0.515 |
| GSH (nmol/l) | 6.47 ± 0.68 | 1.78 ± 0.43 | 1.98 ± 0.17 | -4.49 0.20 | 0.000 0.513 |
| SOD (U/l) | 6.35 ± 0.69 | 4.15 ± 1.07 | 4.42 ± 0.37 | -1.93 0.27 | 0.001 1.000 |
| CAT (U/l) | 0.14 ± 0.02 | 0.04 ± 0.01 | 0.09 ± 0.01 | -0.05 0.05 | 0.000 0.001 |
| GSH-Px (U/l) | 0.50 ± 0.05 | 0.30 ± 0.02 | 0.34 ± 0.03 | -0.16 0.04 | 0.000 1.000 |

LPO = Lipoperóxidos; GSH = Glutation reducido; SOD = Superóxido dismutasa; CAT = Catalasa; GSH-Px = Glutation peroxidasa.

Los resultados se expresan en media ± desviación estándar. P = Significación estadística de la diferencia de medias.

¹Diferencia de medias y significación estadística respecto al grupo de control sanos.

²Diferencia de medias y significación estadística respecto al grupo de control BOP.

2.2.2. EFECTO DE CAPECITABINA EN LOS HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS.

Tras la administración de Capecitabina aparecieron adenocarcinoma de páncreas en el 66% de los animales, no siendo la disminución respecto a los controles estadísticamente significativa. Si bien en este grupo llegaron al final del estudio 7 animales, en uno la muestra no pudo incluirse por problemas técnicos. Se trataron de 3 adenocarcinomas moderadamente diferenciados y 1 poco diferenciado. En el resto de muestras sólo se apreció una hiperplasia.

2.3. ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE LA MELATONINA VS CAPECITABINA

2.3.1. RESULTADOS EN LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

Los animales a los que se administró melatonina en período de postinducción tumoral presentaron unos niveles medios de lipoperóxidos similares a los que se administró capecitabina, si bien los niveles de enzimas antioxidantes fueron en la mayoría de ellas significativamente superiores. La única en la que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas fue SOD, mientras que el resto-GSH, Catalasa y GSH-Px- presentaron cifras medias superiores a las de aquellos animales tratados con Capecitabina en el periodo de tratamiento (Tabla 4).

Tabla 4.- Estudio comparativo de melatonina vs capecitabina en los marcadores de estrés oxidativo

| PÁNCREAS | CONTROL BOP | MELATONINA tratamiento | CAPECITABINA Tratamiento | Dif. Medias ^{1,2,3} | P ^{1,2,3} |
|--------------|--------------|------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| LPO (nmol/l) | 26.80 ± 4.33 | 22.57 ± 4.56 | 23.48 ± 0.51 | -4.23 -3.32 0.91 | 0.020 0.515 0.916 |
| GSH (nmol/l) | 1.78 ± 0.43 | 3.55 ± 0.59 | 1.98 ± 0.17 | 1.76 0.20 -1.57 | 0.000 0.513 0.001 |
| SOD (U/l) | 4.15 ± 1.07 | 3.92 ± 0.84 | 4.42 ± 0.37 | -0.23 0.27 0.50 | 1.000 1.000 1.000 |
| CAT (U/l) | 0.04 ± 0.01 | 0.06 ± 0.02 | 0.09 ± 0.01 | 0.02 0.05 0.03 | 0.017 0.001 0.008 |
| GSH-Px (U/l) | 0.30 ± 0.02 | 0.42 ± 0.06 | 0.34 ± 0.03 | 0.12 0.04 0.08 | 0.001 1.000 0.008 |

LPO = Lipoperóxidos; GSH = Glutacion reducido; SOD = Superóxido dismutasa; CAT = Catalasa; GSH-Px = Glutacion peroxidasa.

Los resultados se expresan en media ± desviación estándar. P = Significación estadística de la diferencia de medias.

¹Diferencia de medias y significación estadística de melatonina respecto al grupo de control BOP.

²Diferencia de medias y significación estadística de capecitabina respecto al grupo de control BOP.

³Diferencia de medias y significación estadística de capecitabina respecto a melatonina.

2.3.2. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EFECTOS DE CAPECITABINA Y MELATONINA EN LOS HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS.

En relación al grupo control sin medicación, ambos fármacos administrados durante la fase de tratamiento redujeron de forma importante la incidencia de tumores. Así, tras la administración de Capecitabina aparecieron adenocarcinoma de páncreas en el 66% de los animales, mientras que la administración de melatonina se asoció con la aparición de carcinoma de páncreas en el 33% de los animales. En ambos tratamientos predominaron los tumores moderadamente diferenciados. Sólo se constató un adenocarcinoma de páncreas poco diferenciado en el grupo de la capecitabina.

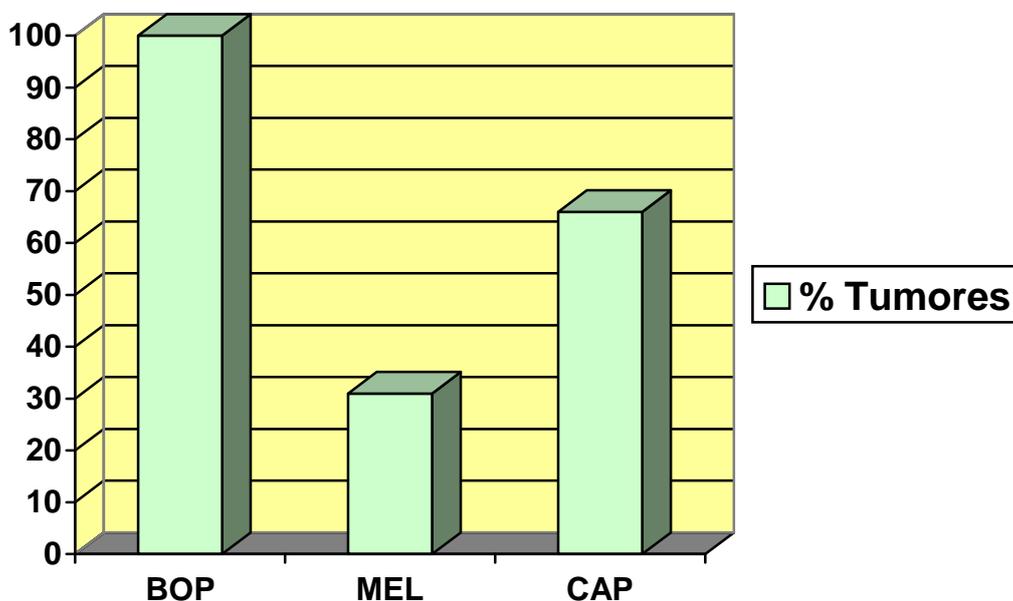


Figura 10.-. Porcentaje de tumores en los grupos de tratamiento con melatonina y capecitabina

3. RESULTADOS DE LA ASOCIACION DE MELATONINA Y CAPECITABINA APLICADAS EN LA FASE DE TRATAMIENTO EN EL CANCER DE PANCREAS EXPERIMENTAL.

En este apartado se analizarán los resultados de la melatonina y capecitabina administrados de forma simultánea tras las doce semanas del período de inducción del cáncer de páncreas experimental, que hemos definido como fase de tratamiento.

| | |
|-----------------------|---|
| 12 SEMANAS | 12 SEMANAS |
| INDUCCIÓN: BOP | TRATAMIENTO: MELATONINA + CAPECITABINA |

Al igual que en los apartados anteriores, se analizarán tanto los marcadores de estrés oxidativo como los resultados histológicos al finalizar las 24 semanas del estudio.

3.1 RESULTADOS EN LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

Como puede observarse en la Tabla 5, la asociación de melatonina y capecitabina se comportó de forma muy similar a la administración del indol y la capecitabina aislados y mejorando tan sólo a esta última en los niveles de GSH en el tejido pancreático. Por el contrario los niveles de SOD fueron inferiores a los del grupo con capecitabina. Al igual que ocurría en la administración aislada de los medicamentos en la fase de tratamiento, la asociación de ambos fármacos no se tradujo en un descenso significativo de los Lipoperóxidos.

Tabla 5.-. Resultados de la administración de capecitabina asociada a melatonina en el periodo de tratamiento respecto a controles BOP y melatonina o capecitabina administradas de forma aislada en la fase de tratamiento.

| PÁNCREAS | CONTROL BOP | MELATONINA tratamiento | CAPECITABINA tratamiento | MELtto-CAPtto | Dif. Medias ^{1,2,3} | P ^{1,2,3} |
|--------------|-------------|------------------------|--------------------------|---------------|------------------------------|--|
| LPO (nmol/l) | 26.8 ± 4.33 | 22.57 ± 4.56 | 23.48 ± 0.51 | 24.21 ± 2.51 | -2.59 -1.64 -0.73 | 1.000 1.000 1.000 |
| GSH (nmol/l) | 1.78 ± 0.43 | 3.55 ± 0.59 | 1.98 ± 0.17 | 2.32 ± 0.35 | 0.54 1.23 -0.34 | 0.008 0.001 0.028 |
| SOD (U/l) | 4.15 ± 1.07 | 3.92 ± 0.84 | 4.42 ± 0.37 | 2.71 ± 0.56 | -1.44 1.21 1.71 | 0.015 0.143 0.011 |
| CAT (U/l) | 0.04 ± 0.01 | 0.06 ± 0.02 | 0.09 ± 0.01 | 0.08 ± 0.02 | 0.04 -0.02 0.01 | 0.000 0.504 1.000 |
| GSH-Px (U/l) | 0.30 ± 0.02 | 0.42 ± 0.06 | 0.34 ± 0.03 | 0.39 ± 0.06 | 0.09 0.03 -0.05 | 0.067 1.000 1.000 |

LPO = Lipoperóxidos; GSH = Glutathion reducido; SOD = Superóxido dismutasa; CAT = Catalasa; GSH-Px = Glutathion peroxidasa.

Los resultados se expresan en media ± desviación estándar. P = Significación estadística de la diferencia de medias.

¹Diferencia de medias y significación estadística respecto al grupo de control BOP.

²Diferencia de medias y significación estadística entre los grupos de Melatonina asociada a Capecitabina frente a Melatonina sola.

³Diferencia de medias y significación estadística entre los grupos de Melatonina asociada a Capecitabina frente a Capecitabina sola.

3.2. EFECTO DE LA ASOCIACION DE CAPECITABINA Y MELATONINA EN LOS HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS.

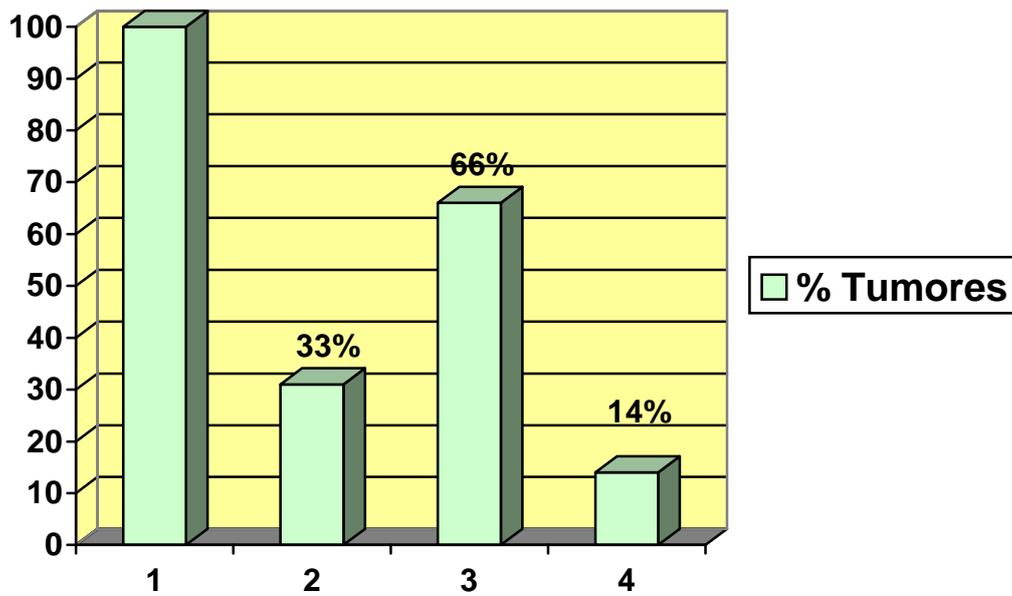


Figura 11. Incidencia de adenocarcinoma de páncreas y supervivencia en: 1: Control BOP; 2: Melatonina aislada; 3: Capecitabina aislada; 4: Capecitabina asociada a Melatonina

4. EFECTO DE LA MELATONINA ADMINISTRADA DURANTE LA INDUCCION TUMORAL EN EL CANCER DE PANCREAS EXPERIMENTAL.

En esta fase del estudio, se evalúan los resultados obtenidos con la administración de melatonina en el periodo de inducción (a modo de profilaxis), es decir, durante las 12 primeras semanas en las que se administró junto al carcinógeno BOP.

Los resultados obtenidos se compararon con los grupos tanto de animales a los que se indujo el tumor (control BOP) como aquellos controles sanos. Para tener una visión global del potencial efecto profiláctico de la melatonina, se incorporaron además estudios comparativos con animales a los que durante el periodo de tratamiento se les administró melatonina o capecitabina aislada o bien la asociación de ambos fármacos.

El estudio en este apartado, seguiría el siguiente esquema:

| 12 SEMANAS: | 12 SEMANAS |
|--|--|
| INDUCCION TUMORAL: BOP PROFILAXIS: MELATONINA | TRATAMIENTO: - MELATONINA - CAPECITABINA - MELATONINA + CAPECITABINA |

4.1 EFECTO DE LA MELATONINA ADMINISTRADA DURANTE LA INDUCCION TUMORAL SOBRE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

4.1.1 ESTUDIO COMPARATIVO RESPECTO A CONTROLES SANOS Y CONTROLES BOP:

A diferencia de lo observado hasta ahora en que todos los fármacos se aplicaron en la fase de tratamiento, la administración de melatonina de forma profiláctica durante la fase de inducción, se acompañó por primera vez de un descenso significativo de los niveles de Lipoperóxidos respecto a los animales controles sometidos al carcinógeno BOP sin medicación (Tabla 6). En cuanto a las enzimas pudimos observar como todas ellas estaban incrementadas de forma significativa frente a controles BOP, exceptuando los niveles de SOD ($p=0,623$).

Tabla 6.- Resultados de la administración de melatonina en el periodo de inducción del tumor respecto a controles sanos y controles BOP.

| PÁNCREAS | CONTROL SANOS | CONTROL BOP | MELATONINA inducción | Dif. medias ^{1,2} | P ^{1,2} |
|--------------|---------------|--------------|----------------------|----------------------------|------------------|
| LPO (nmol/l) | 6.95 ± 0.74 | 26.80 ± 4.33 | 14.49 ± 2.01 | 7.54 -12.31 | 0.000 0.000 |
| GSH (nmol/l) | 6.43 ± 0.75 | 1.78 ± 0.43 | 4.44 ± 0.72 | -1.98 2.66 | 0.000 0.000 |
| SOD (U/l) | 6.26 ± 0.72 | 4.15 ± 1.07 | 4.89 ± 0.45 | -1.37 0.74 | 0.002 0.623 |
| CAT (U/l) | 0.14 ± 0.02 | 0.04 ± 0.01 | 0.09 ± 0.02 | -0.04 0.05 | 0.001 0.000 |
| GSH-Px (U/l) | 0.49 ± 0.06 | 0.30 ± 0.02 | 0.51 ± 0.05 | -0.01 0.21 | 1.000 0.000 |

LPO = Lipoperóxidos; GSH = Glutacion reducido; SOD = Superóxido dismutasa; CAT = Catalasa; GSH-Px = Glutacion peroxidasa.

Los resultados se expresan en media ± desviación estándar. P = Significación estadística de la diferencia de medias.

¹Diferencia de medias y significación estadística respecto al grupo de control sanos.

²Diferencia de medias y significación estadística respecto al grupo de control BOP.

4.1.2 ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS MODALIDADES DE ADMINISTRACION DE MELATONINA DURANTE LA INDUCCION Y/O TRATAMIENTO:

Una vez analizado el efecto de la melatonina aplicada en la fase de inducción respecto a los grupos control, sería interesante comparar estos resultados con los obtenidos tras la aplicación del indol sólo en la fase de tratamiento y con la administración de melatonina durante todas las fases del estudio.

Como puede observarse en la Tabla 7, la administración de melatonina sólo en la fase de inducción presentó unos resultados globales superiores a los observados con la administración en la fase de tratamiento, con menor nivel de radicales libres y mayor potenciación de las defensas antioxidantes. Sin embargo, la aplicación de continuada de melatonina, redujo aún más, los niveles de radicales libres, llegando a aproximarse los niveles de LPO a los del grupo control de animales sanos. En esta modalidad de aplicación, los niveles de las enzimas antioxidantes fueron también significativamente superiores a las otras formas de administración del indol (Tabla 7)

Tabla 7.- Resultados de la administración de melatonina en el periodo de inducción del tumor respecto a melatonina aplicada sólo en la fase de tratamiento y melatonina aplicada en ambas fases, durante todo el desarrollo del estudio.

| PÁNCREAS | MELATONINA inducción | MELATONINA ind / tto | MELATONINA tratamiento | Dif. Medias^{1,2,3} | P^{1,2,3} |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------------|--|
| LPO (nmol/l) | 14.49 ± 2.01 | 7.17 ± 1.50 | 22.57 ± 4.56 | 7.32 -8.08 -15.40 | 0.000 0.000 0.000 |
| GSH (nmol/l) | 4.44 ± 0.72 | 5.98 ± 0.28 | 3.55 ± 0.59 | -1.54 0.89 2.43 | 0.000 0.018 0.000 |
| SOD (U/l) | 4.89 ± 0.45 | 5.92 ± 0.60 | 3.92 ± 0.84 | -1.04 0.97 2.00 | 0.318 0.503 0.000 |
| CAT (U/l) | 0.09 ± 0.02 | 0.14 ± 0.04 | 0.06 ± 0.02 | -0.05 0.04 0.08 | 0.000 0.011 0.000 |
| GSH-Px (U/l) | 0.51 ± 0.05 | 0.59 ± 0.11 | 0.42 ± 0.06 | -0.08 0.09 0.17 | 0.239 0.129 0.000 |

LPO = Lipoperóxidos; GSH = Glutacion reducido; SOD = Superóxido dismutasa; CAT = Catalasa; GSH-Px = Glutacion peroxidasa.

Los resultados se expresan en media ± desviación estándar. P = Significación estadística de la diferencia de medias.

¹Diferencia de medias y significación estadística entre grupos MELind y MELind/tto.

²Diferencia de medias y significación estadística entre grupos MELind y MELtto.

³Diferencia de medias y significación estadística entre grupos MELind/tto y MELtto.

4.1.3 RESULTADOS DE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO TRAS LA ADMINISTRACION DE MELATONINA DESDE LA FASES DE INDUCCION ASOCIADO A CAPECITABINA:

Para evitar la exposición de múltiples tablas y resultados que puedan confundir al lector y en el ánimo de sintetizar y exponer los resultados más relevantes y clarificadores, se llevará a cabo este análisis intentando responder a las dos cuestiones esenciales que se nos presentarían a la hora de interpretar los resultados del estudio:

1º- Dado que en los apartados anteriores hemos podido observar que la administración profiláctica de melatonina conlleva una mejora significativa en los marcadores de estrés oxidativo,.... **¿conlleva algún cambio adicional la asociación de capecitabina durante la fase de tratamiento a la administración de melatonina en ambos periodos?.**

Como se observa en la Tabla 8, cuando se añadió Capecitabina en la fase de tratamiento a la administración de melatonina desde el inicio del estudio, se mantuvo el bajo nivel de radicales libres y no existieron variaciones significativas en los niveles de SOD y GSH-peroxidasa. Por el contrario se apreció un descenso en los valores totales de glutatión reducido y catalasa.

Tabla 8. Resultados de la asociación de capecitabina en la fase de tratamiento a la melatonina administrada en ambas fases.

| PÁNCREAS | CONTROL SANOS | CONTROL BOP | MELATONINA Ind / tto | MELind/tto-CAPtto | Dif. Medias | P |
|---------------------|----------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------|--------------|
| LPO (nmol/l) | 6.92 ± 0.68 | 26.80 ± 4.33 | 7.17 ± 1.50 | 8.31 ± 1.30 | -1.14 | 1.000 |
| GSH (nmol/l) | 6.47 ± 0.68 | 1.78 ± 0.43 | 5.98 ± 0.28 | 4.92 ± 0.62 | 1.06 | 0.005 |
| SOD (U/l) | 6.35 ± 0.69 | 4.15 ± 1.07 | 5.92 ± 0.60 | 4.78 ± 1.35 | 1.14 | 0.233 |
| CAT (U/l) | 0.14 ± 0.02 | 0.04 ± 0.01 | 0.14 ± 0.04 | 0.09 ± 0.02 | 0.05 | 0.001 |
| GSH-Px (U/l) | 0.50 ± 0.05 | 0.30 ± 0.02 | 0.59 ± 0.11 | 0.51 ± 0.08 | 0.08 | 0.697 |

LPO = Lipoperoxidos; GSH = Glutacion reducido; SOD = Superóxido dismutasa; CAT = Catalasa; GSH-Px = Glutacion peroxidasa.

Los resultados se expresan en media ± desviación estándar. P = Significación estadística de la diferencia de medias. Diferencia de medias y significación estadística entre los dos grupos.

2°.- Y quizás, la que pudiera ser más interesante de un punto de vista hipotéticamente traslacional. **¿Qué aporta la administración profiláctica de melatonina durante la fase de inducción tumoral a los resultados obtenidos con la asociación de capecitabina y melatonina administrados de forma terapéutica?**

La administración de forma profiláctica de melatonina durante la fase de inducción tumoral mejoró de forma significativa la mayoría de marcadores de estrés oxidativo (Tabla 9). Así, los niveles de radicales libres (Lipoperóxidos) se redujeron hasta cifras próximas a los de los controles sanos. De igual forma, las enzimas antioxidantes mostraron un incremento de actividad significativamente mayor al observado cuando sólo se administró melatonina y capecitabina en la fase de tratamiento.

Tabla 9. Resultados de la administración de melatonina durante la fase de inducción asociado a melatonina+capecitabina en la fase de tratamiento frente a la administración conjunta de estos fármacos sólo en la fase de tratamiento.

| PÁNCREAS | MELind/tto-CAPtto | MELtto-CAPtto | Dif. Medias | P |
|---------------------|--------------------------|----------------------|--------------------|--------------|
| LPO (nmol/l) | 8.31 ± 1.30 | 24.21 ± 2.51 | -15.90 | 0.000 |
| GSH (nmol/l) | 4.92 ± 0.62 | 2.32 ± 0.35 | 2.60 | 0.000 |
| SOD (U/l) | 4.78 ± 1.35 | 2.71 ± 0.56 | 2.07 | 0.000 |
| CAT (U/l) | 0.09 ± 0.02 | 0.08 ± 0.02 | 0.01 | 1.000 |
| GSH-Px (U/l) | 0.51 ± 0.08 | 0.39 ± 0.06 | 0.12 | 0.007 |

LPO = Lipoperóxidos; GSH = Glutathion reducido; SOD = Superóxido dismutasa; CAT = Catalasa; GSH-Px = Glutathion peroxidasa.

Los resultados se expresan en media ± desviación estándar. P = Significación estadística de la diferencia de medias. Diferencia de medias y significación estadística entre los grupos MELind/tto-CAPtto y MELtto-CAPtto.

4.2. EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE MELATONINA EN LA FASE DE INDUCCION EN LOS HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS.

En lo que a incidencia de adenocarcinoma de páncreas se refiere, los grupos con melatonina administrada durante la fase de inducción presentaron una incidencia tumoral global del 24%, por 36% en los grupos con administración de fármacos sólo en fases terapéuticas (Tabla 10).

Sin embargo, un análisis detallado de los resultados en los diferentes grupos, permite observar cómo los mejores resultados, con una incidencia tumoral sensiblemente inferior a los demás, son aquellos en los que se administró conjuntamente melatonina y capecitabina en la fase de tratamiento (tanto si se asoció con melatonina en inducción: 11% de tumores, como cuando no administró el indol como profilaxis: 14% de tumores).

Tabla 10. Incidencia de tumores en los grupos estudiados.

| GRUPO | INCIDENCIA DE TUMOR |
|----------------------|----------------------------|
| Control sanos | 0/10 |
| Control BOP | 9/9 (100%) |
| MELtto | 3/9 (33%) |
| CAPtto | 4/6 (66%) |
| MEL-CAPtto | 1/7 (14%) |
| MELind | 3/10 (30%) |
| MELind/tto | 3/10 (30%) |
| MELind/MEL-CAPtto | 1/9 (11%) |

El análisis histopatológico mostró que en el grupo de melatonina en inducción con o sin melatonina en fase de tratamiento, los 3 tumores que aparecieron en cada grupo se trataron de adenocarcinomas de páncreas moderadamente diferenciados.

En el grupo en el que tras la inducción con melatonina se trató sólo con capecitabina el tumor encontrado se trató de un adenocarcinoma bien diferenciado. En cinco de las muestras restantes existió hiperplasia y displasia leve en otro.

Finalmente, en el grupo de melatonina en inducción y tratamiento asociada a capecitabina en la fase de tratamiento el tumor encontrado se trató de un adenocarcinoma moderadamente diferenciado, existiendo hiperplasia en 4 de las muestras restantes.

Discusión

DISCUSIÓN SOBRE LA METODOLOGÍA EMPLEADA

El presente trabajo experimental tiene como objetivo principal evaluar la actividad de dos fármacos, melatonina y capecitabina, en el desarrollo de carcinoma de páncreas. Los animales utilizados en el estudio fueron hamster sirios. La elección de estos animales se basó en que en estos roedores la administración de un agente prooncogénico como es el BOP, permite el desarrollo de adenocarcinoma de páncreas de características histopatológicas similares a los adenocarcinomas pancreáticos observados en el humano. El BOP fue descubierto en la década de los 70 ⁽²¹²⁾ y utilizado por primera vez como carcinógeno en el páncreas por Pour ⁽²¹⁴⁾. La producción de tumores pancreáticos se asocia a que la administración de este carcinógeno via intraperitoneal se acompaña de una excreción como metabolito (HBOP) en la secreción pancreática ⁽²¹⁴⁾. Generalmente el BOP se utiliza a dosis de 10 mg/kg/semana en una pauta de 10 semanas, tras demostrarse la capacidad de ésta de originar tumores macroscópicamente cuantificables, lo que no ocurría en pautas más cortas.

El primer paso por tanto se trataba de poner en práctica el modelo experimental y desarrollar adenocarcinoma de páncreas en los hamster sirios. Los hamster sirios se obtuvieron de Alemania y como incidencia del estudio, una camada llegó enferma falleciendo todos los animales por lo que hubo que repetir los grupos de animales incluidos en esas series, retrasando el estudio otras 24 semanas. Tal y como se ha observado en nuestros resultados, la puesta en marcha del modelo reprodujo la aparición de adenocarcinoma de páncreas en el 100% de los animales sometidos a la exposición con el carcinógeno BOP y que no fueron tratados con fármacos. Las características histopatológicas de los tumores eran idénticas a los observados en los humanos, tal y como se puede observar en las imágenes que se presentan en los resultados.

La aparición de adenocarcinoma pancreático originado por el BOP se acompañó de un potente efecto prooxidante, respecto a los controles sanos, produciéndose un aumento significativo de lipoperóxidos (LPO) y descenso igualmente significativo de enzimas antioxidantes (GSH, CAT, SOD, GSH-Px) en el páncreas.

Para evitar sesgos en los grupos de estudio, todos los animales se mantuvieron en las mismas condiciones de luz, temperatura y mantenimiento. Además, dado que el estudio se prolongaba durante 24 semanas, para evitar la influencia de los cambios de temperatura, los grupos de animales que se incluían en cada tanda, se distribuían entre los diferentes grupos a estudio.

Las medicaciones se administraron en los dos grupos por vía oral, si bien la dispensación de los fármacos no fue individual y se introducían en el pienso de los animales.

Esto se debió a la imposibilidad de mantener en jaulas individuales al gran número de animales con los que se ha trabajado, tanto por la limitación de número de jaulas, como de espacio en el laboratorio de experimental. Este aspecto inicialmente limitante del control de la ingesta de medicación se ha repartido de forma similar entre todos los grupos de estudio.

El trabajo experimental contemplaba dos fases perfectamente diferenciadas. La primera fase del trabajo de campo se dedicó a la génesis del tumor. El tiempo empleado para ello fueron de 12 semanas tras las cuales, como hemos comentado antes, la totalidad de animales presentaron cáncer de páncreas. Esta fase se denominó de inducción tumoral. La administración de fármacos durante esta fase, se consideró como si de una profilaxis se tratase, ya que se asemejaba a la situación diaria de las personas que estamos en contacto constante con potenciales agentes cancerígenos tanto externos como potencialmente mutagénicos.

En la segunda fase, con el tumor ya inducido, la administración de fármacos conlleva un sentido más terapéutico que profiláctico y es la que se asemeja más a la situación que nos encontramos en la clínica cuando se diagnostica una neoplasia.

En lo que a diseño de los grupos de estudio se refiere, inicialmente se planteó la comparativa de la administración de melatonina frente a capecitabina de forma aislada. Esto nos permitía diferenciar los efectos de cada fármaco por separado y compararlo posteriormente con un grupo al que se administró ambos fármacos en la fase de tratamiento.

Por otro lado, en la actualidad se están potenciando mucho las medidas preventivas frente a la aparición de enfermedades y de forma específica en la aparición de cáncer.

Dado que a menudo se han propugnado a las fuentes naturales de antioxidantes como preventivas del envejecimiento celular y por ende de la aparición de fenómenos degenerativos, se planteó realizar un estudio en el que junto a las combinaciones de fármacos mencionadas anteriormente, se incluyesen unos grupos en los que se administraba melatonina durante el periodo de inducción. Este modelo equivaldría a la ingesta de melatonina de forma profiláctica asociada o no a la propia melatonina o capecitabina en la fase de tratamiento.

En el análisis de variables se ha contemplado una doble vertiente. Por un lado se ha analizado el nivel de marcadores de estrés oxidativo en el contexto del desarrollo de una lesión neoplásica. Estas determinaciones se realizaron en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de Córdoba. Entre los marcadores se han tomado los niveles de radicales libres de oxígeno, expresados como lipoperóxidos y los niveles de las defensas antioxidantes expresados por los niveles de glutatión reducido y por las enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa), consideradas como los *scavengers* de los radicales libres. Estas determinaciones se realizaron inicialmente tanto en suero como en tejido pancreático. Los resultados fueron similares en ambas determinaciones, por lo que para facilitar la presentación de los mismos y evitar el aportar un número excesivo de datos, se han incluido sólo los obtenidos en tejido pancreático, permitiendo así una asociación directa con los resultados histológicos.

Finalmente, junto a las determinaciones de estrés oxidativo se realizó un estudio anatómico-patológico del tejido pancreático. Este estudio se llevó a cabo en el Servicio de anatomía Patológica del H.U. Reina Sofía. Todas las piezas fueron evaluadas por el mismo patólogo. El patólogo desconocía el grupo terapéutico al que pertenecía el páncreas analizado.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El cáncer colorrectal, el de páncreas y el gastrointestinal son de los más frecuentes en España, en Europa y en el mundo. En 2008, se estima que a unos 37.680 adultos (18.770 hombres y 18.910 mujeres) se les diagnosticará cáncer pancreático en los Estados Unidos. Se calcula que este año se producirán unas 34.290 muertes (17.500 hombres y 16.790 mujeres) a causa de esta enfermedad. En Europa se diagnostican aproximadamente 78.000 casos nuevos de cáncer de páncreas cada año. El cáncer pancreático es la cuarta causa más importante de muerte por cáncer en hombres y mujeres. La mayor parte del cáncer pancreático la constituyen los adenocarcinomas.

Dado que el adenocarcinoma pancreático no suele producir síntomas específicos en las primeras etapas de desarrollo, es frecuente que se lo detecte una vez que se haya diseminado fuera del páncreas, en otras áreas del cuerpo como el hígado, los pulmones o el peritoneo. En el momento del diagnóstico, tan sólo un 10% de los tumores se encuentran limitados al páncreas ^(20,34).

La tasa de supervivencia global relativa a un año (porcentaje de pacientes que sobrevive al menos un año después de detectado el cáncer, sin contar aquellos que fallecen debido a otras enfermedades) de las personas que padecen cáncer pancreático es del 24%; y la tasa de supervivencia relativa a cinco años (porcentaje de pacientes que sobrevive al menos cinco años después de detectado el cáncer, sin contar aquellos que fallecen debido a otras enfermedades) es de aproximadamente el 5%. Si el cáncer se detecta en los primeros estadios, cuando la extirpación quirúrgica es posible, la tasa de supervivencia relativa a cinco años es de aproximadamente el 20% ⁽²¹⁵⁾.

En la actualidad se acepta que el tratamiento de elección en el cáncer de páncreas es la resección quirúrgica, con la que se obtienen los mayores índices de supervivencia ^(194,195)

La Duodenopancreatectomía cefálica con o sin preservación de píloro, es la técnica de elección en estos pacientes ^(195,196), si bien se han descrito resecciones no estandar para casos seleccionados de pacientes ⁽¹⁹⁷⁾. Con estas técnicas la mortalidad operatoria se sitúa en torno al 5% y las tasas de supervivencia son en promedio del 10-20% a los 5 años. Estas cifras se elevan al 24% cuando la resección se realiza con márgenes libres (R0) y al 32% cuando las adenopatías son negativas ⁽¹⁹⁸⁾.

Junto a la cirugía, en la actualidad la administración de quimio-radioterapia, bien de forma previa a la cirugía (neoadyuvante), como tras la misma (adyuvante), completan el arsenal terapéutico en estos enfermos ⁽²¹⁶⁻²²⁴⁾. Como se ha comentado previamente, el desarrollo de la quimioterapia en el tratamiento del cáncer pancreático ha avanzado lentamente por diversas causas:

1. El cáncer de páncreas es resistente a las formas no quirúrgicas de tratamiento como la quimioterapia o la radioterapia.

2. Se han evaluado pocos quimioterápicos aisladamente y esta evaluación es verdaderamente difícil por la dificultad de encontrar parámetros objetivos para controlar la enfermedad de estos pacientes. La remisión completa se define como la normalización de todas las anomalías relacionadas con el tumor, sin evidencia clínica o de laboratorio de tumor residual.

3. Los pacientes con neoplasia pancreática avanzada frecuentemente están debilitados, con anorexia y pérdida de peso, pudiendo presentar también disfunción hepática originada por la existencia de metástasis, que alteran la farmacocinética de los quimioterápicos que se eliminan principalmente por excreción biliar .

Hasta el momento, la quimioterapia de primera línea más común en el tratamiento del cáncer de páncreas ha sido la gemcitabina ⁽²²⁵⁾. Se ha demostrado que la gemcitabina no sólo mejora la supervivencia de pacientes con cáncer pancreático avanzado, sino que también ayuda a mejorar los síntomas relacionados con el cáncer (por ejemplo, la pérdida de peso, el dolor y la debilidad) en algunos pacientes. Se han llevado a cabo una cantidad de estudios amplios para evaluar si la combinación de gemcitabina con otros agentes quimioterapéuticos (como el fluorouracilo [5-FU, Adrucil] o los compuestos del platino, como el cisplatino [Platinol], el carboplatino [Paraplatin] y el oxaliplatino [Eloxatin]) es más eficaz que la gemcitabina sola ⁽²¹⁶⁻²²⁵⁾ .

Sin embargo, en la actualidad está tomando un protagonismo especial en el manejo del cáncer de páncreas la utilización de capecitabina asociada o no a la gemcitabina ⁽²²⁶⁻²²⁹⁾. Es una prodroga sistémica de administración oral, la 5'deoxifluoridina (5'DFUR) que se transforma a 5 fluoruracilo.

Capecitabina (Xeloda) es un quimioterápico oral eficaz, seguro y cómodo de administrar que está autorizado en más de 90 países tanto en monoterapia como en terapia combinada de forma especial para el tratamiento adyuvante del cáncer de colon.

En estudios en Fase II ⁽²¹¹⁾ para evaluar la seguridad y eficacia de la capecitabina en el cáncer de páncreas, ya se observó una mejora clínica significativa así como una buena respuesta tumoral. Junto a esto, la tolerancia a la droga fue buena con escasos efectos secundarios, entre los que destacaron fundamentalmente los digestivos con diarrea, náuseas, No se han observado fallecimientos por toxicidad con esta droga.

Comparada con los fármacos de referencia hasta esos momentos, la Gemcitabina y el 5-fluoruracilo, la eficacia clínica es similar a la gemcitabina y bastante superior al 5-FU. De igual forma la supervivencia de los pacientes es mayor en los dos primeros que en el 5-FU. A diferencia de la Gemcitabina, la Capecitabina parece ser mejor tolerada por los pacientes ⁽²¹¹⁾

Pero aún más los trabajos actuales muestran cómo la administración de capecitabina de forma aislada mejora la supervivencia en pacientes con adenocarcinoma de páncreas avanzado ⁽²³⁰⁻²³²⁾. Esta situación es la que se ha reproducido en nuestro estudio. Tras el desarrollo de un adenocarcinoma de páncreas a un grupo de animales se les administró capecitabina oral durante 12 semanas. La administración de este fármaco redujo la aparición de tumores a un 66% de los animales.

Sin embargo, junto a la cirugía y a la administración de terapia adyuvante (o neoadyuvante), la tendencia en el manejo de la enfermedad neoplásica va orientada hacia trabajar sobre la base de los mecanismos patogénicos. En este sentido, un número importante de factores exógenos y endógenos asociados a la aparición de cáncer son generadores de radicales libres de oxígeno ⁽¹⁰²⁾. El estrés oxidativo interviene en las tres fases de desarrollo de cáncer, iniciación, promoción y progresión ⁽¹⁰³⁻¹⁰⁶⁾.

Una vez se pone en marcha el proceso oncogénico iniciado con la administración del carcinógeno, el primer paso sería la producción de radicales libres de oxígeno, que iniciaría el proceso de estrés oxidativo sobre los distintos componentes celulares, para culminar con la actuación sobre elementos que regulan los procesos de apoptosis y mutagénesis. De los 5 niveles de defensa celulares, los 4 primeros van dirigidos hacia los RLO y regulación de las enzimas antioxidantes y el quinto hacia la reparación del ADN.

La célula posee un sofisticado y complejo sistema de mecanismos antioxidantes que le permiten defenderse de los ataques provocados por el estrés oxidativo. Este sistema es en

aparición redundante, como suele ocurrir con los sistemas de control decisivos para la viabilidad biológica de la célula y se puede agrupar en dos grandes grupos: sistemas enzimáticos y sistemas no enzimáticos. De los diferentes agentes endógenos, la melatonina, hormona segregada en la glándula pineal, es el más potente.

La asociación de alteraciones en la secreción de la hormona de la glándula pineal en los enfermos con procesos neoplásicos se ha puesto de manifiesto en diversos trabajos clínicos y experimentales ^(173,174). Se considera que las alteraciones del sueño, con modificación de los ritmos de sueño-vigilia pueden constituir un factor que determine una evolución más agresiva en la proliferación tumoral, si bien hay trabajos que no llegan a demostrar la asociación entre los niveles séricos de melatonina y la aparición de cáncer de mama ⁽¹⁷⁵⁾. El descenso no fisiológico de sus niveles en plasma y en los tejidos conllevaría una disminución de la capacidad del organismo para activar la cadena de scavengers antioxidantes, esenciales para el control, por parte del organismo, del estrés oxidativo. Siguiendo los esquemas que se han descrito anteriormente el organismo estaría en una situación de debilidad para contrarrestar esta agresión y evitar el potencial desarrollo tumoral tanto en las fases de iniciación, como de promoción y progresión del tumor.

Desde el punto de vista terapéutico existen sustancias exógenas que pueden prevenir el daño oxidativo utilizando mecanismos análogos a estos sistemas antioxidantes endógenos, inhibiendo o previniendo la generación de radicales libres, potenciando la actividad enzimática antioxidante o bloqueando la amplificación del daño oxidativo ^(56, 107). En un metaanálisis reciente se ha evaluado el efecto de los antioxidantes en la terapia antitumoral. Si bien los estudios estadísticos no mostraban diferencias, atribuido a la diversidad de los estudios, si que se comprobó que los enfermos con este tipo de tratamientos presentaban mejor tolerancia a los tratamientos adyuvantes, así como mayor respuesta antitumoral y supervivencia de los enfermos ⁽²³³⁾.

En lo que se refiere a la melatonina como terapéutica en el cáncer, las experiencias son aún escasas. Hasta el momento, los resultados obtenidos en los ensayos clínicos han sido variables. De forma global, la mayoría de los estudios en Fase II analizando el uso de melatonina en enfermos con enfermedad metastásica por cáncer de mama, se ha observado una reducción de la trombocitopenia y un incremento objetivo de la respuesta del cáncer a la terapéutica instaurada ^(180,181). Más recientemente se ha observado que la administración de melatonina a dosis de 20 mg al día conllevaba una mejora de la supervivencia y del tiempo libre de enfermedad en pacientes con tumores sólidos irresecables y enfermedad

metastásica ⁽²³⁴⁾. Estos resultados mejoraban aún más cuando el efecto inmunomodulador de la melatonina se potenciaba con dosis bajas de Interleukina-2.

Por otro lado, en estudios recientes se están aportando propiedades protectoras de la melatonina contra los efectos nocivos de las radiaciones, que la proponen como una terapia adyuvante protectora durante la radioterapia que no sólo mejoraría los resultados de ésta, sino también protegería frente a sus efectos adversos ⁽²³⁵⁻²³⁶⁾.

De forma específica, en el cáncer de páncreas, la única publicación existente es la realizada por nuestro grupo de investigación, en la que utilizando el mismo modelo experimental, la administración del indol, se acompañó de una disminución en la aparición de adenocarcinoma de páncreas en los animales tratados ⁽²³⁷⁾. En el trabajo actual, la administración de melatonina en la fase de tratamiento, si bien no redujo los niveles de radicales libres de oxígeno, si incrementó de forma significativa los niveles de las defensas antioxidantes. Esto se acompañó de una reducción en el porcentaje de animales con adenocarcinoma de páncreas, que se redujo al 33%, cifra inferior a la observada con la capecitabina (66%).

Dado que los mecanismos de acción de ambas moléculas son bien diferentes, cabría plantearse realizar un grupo en el que se administrasen de forma combinada ambos fármacos durante la fase de tratamiento. Los resultados de esta fase del estudio mostraron que la asociación de la melatonina a capecitabina conlleva una potenciación importante del efecto antineoplásico de la capecitabina de forma que la incidencia de adenocarcinoma de páncreas se redujo al 14%, cifra sensiblemente inferior a la obtenida con ambos fármacos por separado. En este grupo de animales, al igual que cuando se administró melatonina sólo, los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes se mostraron significativamente elevados respecto a los controles. Este efecto de potenciación se ha observado en otras modalidades terapéuticas antineoplásicas. En un estudio prospectivo y randomizado ⁽¹⁸⁶⁾, la administración de melatonina intraarterial en enfermos con hepatocarcinoma asociada al quimioterápico se tradujo en una reducción significativa del tamaño tumoral y un incremento significativo de las resecciones hepáticas que pasaron de 14% a 40% cuando se administró el indol intraarterial junto a la quimioterapia.

Finalmente, se llevó a cabo un último planteamiento en base al posible papel de la melatonina como antioxidante profiláctico en el cáncer de páncreas experimental. En general, los antioxidantes son fármacos bien conocidos, generalmente con escasa toxicidad, que durante muchos años han venido utilizándose con unas indicaciones poco concretas. Se ha postulado que algunos de estos fármacos son eficaces en la prevención tumoral y de la enfermedad cardiovascular, en el tratamiento y profilaxis del síndrome de isquemia-reperusión y en la prevención del fotoenvejecimiento. También la acción antiinflamatoria de algunos antioxidantes, junto al papel que ejercen regulando la inmunidad celular y humoral, incrementa sus aplicaciones clínicas al menos desde un punto teórico. No obstante, aunque existen trabajos experimentales en los que la utilización de combinaciones de antioxidantes han dado buenos resultados ⁽¹²⁹⁾, estos no se han reproducido en trabajos clínicos al menos en lo que a prevención se refiere. Así en un metaanálisis realizado sobre la eficacia de las vitaminas antioxidantes en la prevención de tumores gastrointestinales, no observa beneficio con la administración de estos suplementos ⁽¹³⁰⁾. Estas conclusiones no pueden ser definitivas pues a juicio de los evaluadores los estudios eran muy asimétricos y difícilmente extrapolables.

En nuestra experiencia, la administración de melatonina durante la fase de inducción, a modo de profilaxis, se acompañó de un descenso significativo en los niveles de radicales libres de oxígeno. A diferencia de lo observado cuando se aplicó la melatonina y/o capecitabina en la fase de tratamiento, todos los grupos en los que el indol se administró a lo largo de las 24 semanas presentaron cifras de lipoperóxidos muy similares a la de los animales sanos. De igual forma los niveles de las enzimas antioxidantes en los grupos con melatonina administrada de forma profiláctica fueron los más elevados de los observados a lo largo del estudio.

Cuando se analiza el efecto antineoplásico de la melatonina administrada en la fase de inducción solamente, la incidencia tumoral fue del 30%, similar a la observada cuando se administró sólo durante la fase de tratamiento. Igual porcentaje se obtuvo cuando se administró el indol de forma continuada a lo largo de las 24 semanas del estudio. Esto puede justificarse, al menos en parte, porque las dosis administradas de melatonina fueron similares en ambos periodos, dosis que pueden circunscribirse más en el ámbito de la terapéutica que de la profilaxis. Para explicar esto, en la literatura ya se describe el efecto a la vez beneficioso y perjudicial del descenso del estrés oxidativo, según nos refiramos a tejido propiamente tumoral o a tejido sano. Así ocurre con otros fármacos empleados frente al cáncer de páncreas, como son Celebrex y Zyflo (ambos AINES) ⁽²³⁸⁾, que actúan

de forma diferenciada sobre tejido sano (donde el descenso de LPO producido por ellos produce un efecto protector) y sobre tejido tumoral (donde el efecto beneficioso se produce al aumentar LPO, lo que propicia la muerte celular entre células tumorales, como se ve por la relación dosis-efecto que presentan los radicales libres de oxígeno sobre el DNA en período de inducción). De esta forma, si por efecto sumatorio, las dosis terapéuticas de melatonina administradas desde el inicio del estudio, ejercen un efecto antioxidante excesivo, se agotan los receptores de tejido sano y se ocuparían los de tejido tumoral, impidiendo que dicho ascenso de LPO permita la muerte de células tumorales, empeorando con ello el efecto antioncogénico en su conjunto.

Sin embargo, cuando a la administración de la melatonina de forma continuada se añadió capecitabina, la incidencia de adenocarcinoma de páncreas volvió a descender a 11%, siendo esta la cifra más baja observada a lo largo de todo el estudio.

Estos resultados traducen de nuevo que, si bien la administración de capecitabina o melatonina aisladas, incluso de forma profiláctica, pueden mejorar la historia natural del cáncer de páncreas, es la asociación de ambos fármacos la que a través de un efecto potenciador y sinérgico, logra reducir de una forma significativa la aparición de adenocarcinoma de páncreas en nuestro modelo experimental.

Conclusiones

De los resultados del presente estudio pueden obtenerse las siguientes conclusiones:

1.- La administración de capecitabina durante la fase de tratamiento se ha asociado con una reducción en la aparición de adenocarcinoma de páncreas experimental.

2.- La administración de melatonina durante la misma fase, no modificó de forma significativa los niveles de radicales libres de oxígeno, si bien se acompañó de una mayor actividad de enzimas antioxidantes. Esto se asoció a una reducción en la aparición de tumores pancreáticos cuya incidencia fue menor que la observada con capecitabina.

3.- Cuando se administró la melatonina durante la fase de inducción tumoral, los niveles de radicales libres se normalizaron y la actividad de las enzimas antioxidantes se elevó de forma significativa. No obstante, la incidencia de adenocarcinoma de páncreas fue similar a cuando se administró el indol sólo en la fase de tratamiento, incluso cuando se aplicó de forma continuada a lo largo de todo el estudio.

4.- La asociación de capecitabina y melatonina administradas durante la fase de tratamiento, se comportó de forma similar a la melatonina sólo, en cuanto a los marcadores de stres oxidativo. Sin embargo, la incidencia de adenocarcinoma de páncreas fue la menor de todas las observadas en el estudio, con independencia de que se administrase melatonina de forma profiláctica.

Referencias bibliográficas

- 1.- MORGAN, RGH; WORMSLEY, KG. Progress report. Cancer of the pancreas. Gut. 1.977;18:580-585.
- 2.- SILVERBERG, E. Cancer statistites. CA. 1.980;30:23-28
- 3.- DE DIEGO CARMONA, JA. Avances en cirugía hepática, biliar y pancreática. Ed. Aran.1.989;445-448.
- 4.- CULEBRAS FERNANDEZ, JM. Pancreatectomía total. Terapéutica de elección en el carcinoma ductal del páncreas. Rev. Esp.Enf.Ap.Digest. 1.977;50:613-619.
- 5.- MIRAS ESTADO, M; SERRANO SANCHEZ, PA; FERNANDEZ SELLER, C; AUZAS VILLEGAS, J; MARTINEZ PIÑERO, M. Carcinoma de páncreas y región periampular: Estudio de 76 casos. Rev.Esp.Enf.Ap.Digest. 1.982;61:225-222.
- 6.- GORDIS, L; GOLD, EB. Epidemiology of pancreatic cancer. World J Surg.1.984;808:821-830.
- 7.- HOLLENDER, LK; MEYER, Ch; MARRIE, A; PIERARD, TH; CALDEROLI, H. Le cancer du pancreas; reflexions a propos de 147 cas. Ann. Chir. 1.980;34:775-778.
- 8.- SOLASSOL, C; JOYEUX, H; YAKOUN, M; BLANC, F; BORIES, P. La pancreatectomie regionales dans le traitement de l'adenocarcinome du pancreas. Gastr. Clin. Biol.1.984;8:17-20.
- 9.- SABISTON, DC. Tratado de patología quirúrgica. Ed. Interamericana. Mexico. 2003
- 10.- LEVIN, DL; CONNELLY, RR; DEVESA, S. Demographic characteristics of cancer of the pancreas: mortality incidence and survival. Cancer. 1.981;47:1.456-1460.
- 11.- MARUCHI, N; BRIAN, D; LUDWIG, J; ELVEBOCK, LA, KURLAND, LT. Cancer of the pancreas in Olmsted County, Minnesota, 1.935-1.974. Mayo Clinic Proc. 1.979.54:245-248.
- 12.- KUMMERLE, F; RUCKERT, K. Surgical treatment of pancreatic cancer. World J Surg. 1.984;8:889-893.
- 13.- MACK, TM; PAGANINI-HILL A. Epidemilogy of pancreas cancer in Los Angeles. Cancer. 1.981;47:1474-1476.
- 14.- MOLDOV, RE; CONELLI, RR. Epidemiology of pancreatic cancer in Conecticut. Gastroenterology. 1.968;55:677-680.
- 15.- JOUNG, JL; PERCY, CL; ASIRE, AJ. Surveillance, epidemiology and results program: Cancer incidence and mortality in the United States, 1.973-1.977. Natl. Cancer Inst. Monogr. 1.981;56-60.
- 16.- MacMAHON, B; YEN, S; TRICHOPOULOS, D; WARREN, K; NARDI, G. Coffe and cancer of the pancreas. N.Engl.J.Med. 1.981;304:630-634.

- 17.- WILLIAMS, RR; HORM, JW. Association of cancer sites with tobacco and alcohol consumption and socioeconomic status of patients: Interview study from the third National Cancer Survey. *J.Natl.Cancer Inst.* 1.977;58:525-530.
- 18.- WEISS, W; BERNARDE, MA. The temporal relation between cigarette smoking and pancreatic cancer. *Am.J.Publ.H.* 1.984;73:1403-1405.
- 19.- HOEY, J. Cancer of the pancreas: epidemiology and risk factors. *Gastroenterology. Clin Biol.* 1.985;9:765-770.
- 20.- DE DIOS, LF; DE LA MATA, M; BONILLA, F. Cancer de páncreas. *Medicine.* 1.988;11:539-542.
- 21.- JAIN, M; MOWE, GR; ST. LOUIS, P; MILLER, AB. Coffe and alcohol as determinants of risk of pancreas cancer: a case-control study fropm Toronto. *Int:I.Cancer.*1991;47:384-388.
- 22.- MALAGELADA, JR. Pancreatic cancer: An overview of epidemiology, clinical, presentation and diagnosis. *Mayo Clin. Proc.* 1.979;54:459-464.
- 23.- BERNARDE, MA; WEISS, W. Coffe anssumption and pancreatic cancer: tempopral and spatial correlation. *Br. Med. J.* 1.982;284:400-412.
- 24.- BINSTOCK, M; KRAKOW, D; STAMIER, J; REIFF, L; PERSKY, V; LIU, K; MOSS, D. Coffe and pancreatic cancer: an analysis of international mortality data. *Am. J. Epidemiolo.* 1.984;118:630-632.
- 25.- BURCH, GE; ANSARI, A. Chronic alcoholism and carcinoma of the pancreas: a correlative hypothesis. *Arch. Intern. Med.* 1.968;122:273-276.
- 26.- MONSON, RR; LYON, JL. Proportional mortality among alcoholics. *Cancer,* 1.975;36:1077-1080..
- 27.- MILLS, PK; BEESON, WL; ABBEY, DE; FRASER, GE; PHILLIPS, RL. Dietary habits and past medical history as related to fatal pancreas cancer risk among adventist. *Cancer.* 1.988;61:2578-2584.
- 28.- ROBISON, A; SCOTT, J; ROSENFELD, D. The ocurrence of carcinoma of the pancreas in chronic pancreatitis. *Radiology.* 1.970;94:289-292.
- 29.- BALIBREA JL. *Patología Quirúrgica.* Ed. Marban. Barcelona. 2002.
- 30.- KESSKER, II. Cancer mortality among diabetics. *J. Nats. Cancer Inst.* 1.970;44:673-681.
- 31.- ROSENBERG, L; DUGUID, WP; BROWN, RA. Development of experimental cancer in the head of the pancreas by surgical induction of tissue injury. *Am. J. Surg.* 1.984;147:146-152.
- 32.- LEGG, M. Pathology of the pancreas. In *Surgery of the pancreas.* J.R.Brooks. Ed.W.B.Saunders Comp. 1.983; p. 4.177.

- 33.- CUBILLA, AL, FITZGERALD, PJ. Cancer of the pancreas (non-endocrine) a suggested morphologic clasification. Semin. Oncol. 1.979;6:285.
- 34.- CELLO, JP. Carcinoma of the pancreas. En: Sleisenger MH. Gastrointestinal disease. Filadelfia, WB Saunders. 1.983;1.514.
- 35.- PEDROSA, CS. El páncreas en : Pedrosa CS. Diagnóstico por la imagen. Interamericana. Madrid. 1.986;I:883.
- 36.- DICKEY, JE; HAAGA, JR; STELLATO, TA; SCHULTZ, CL. Evaluation of computed tomography guided percutaneous biopsy of the pancreas. Surg. Gynec. Obstet. 1.986;6:497.
- 37.- CUBILLA, AL; FITZGERALD, PJ. Duct cell adenocarcinoma. In Sommers SC, Rosen PP (ed): Pancreas Cancer: Pathology Annual, Part I, New York, Appelton Century-Crofts.1978;241.
- 38.- CUBILLA, AL; FITZGERALD, PJ. Morphologic lesions associated with human primary invasive non-endocrine pancreas cancer. Cancer Res. 1.976;36:2690
- 39.- DIE GOYANES, A; PACK, GT; BOWDEN, L. Cancer of the body and tail of the pancreas. Rev. Surg.1.971;28:153.
- 40.- CUBILLA, AL; FITZGERALG, PJ. Metastasis in pancreatic duct adenocarcinoma. En Day SB (Eds). Caancer invasion and metastasis: Biologic mechanisms and therapy. New York. 1977;81.
- 41.- CUBILLA, AL; FORTNER, J; FITZGERALD, PJ. Lymph node involvement in carcinoma of the head of the pancreas area. Cancer.1978;41:880.
- 42.- HOWARD, JM; JORDAN, GL. Cancer of the pancreas. Current Prom. Cancer. 1.977;2:1.
- 43.- GRAY,LW; CROOK, JN; COHN, I. Carcinoma of the pancreas. En Seventh National Cancer conference proceedings. New York, American Cancer Society.1.973;503-507.
- 44.- SHEELE CW. Chemische Abhandlung von der Luft und dem Feuer. Uppsala and Liepzing. Section 2. En: Sheele CW. "The collted papers of Carl Wilhelm Sheele". Bell and Sons, London 1931 y Kraus Reprint Co. New York, 1971; 85-178
- 45.- BARJ G. Radicales libres y antioxidantes. En: Bioquímica y fisiopatología del estrés oxidativo; ed. Fundación Casares Gil. Real Academia de Farmacia. Madrid 1997; 23-44
- 46.- GERSMAN R, GILBERT DL, NYE SW, DWYER P, FENN WO. Oxygen poisoing and X-irradiation: A mechanism in common. Science 1954; 119: 623-626
- 47.- MCCORD JM, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem 1969; 244: 6049-6055

- 48.- SAHNOUN Z, JAMOSSI K, ZEGHAL KM. Radicaux libres et antioxydants: Physiologie, pathologie humaine et aspects thérapeutiques. *Thérapie* 1997; 52: 251-270
- 49.- FRIDOVICH I. Les superoxydes ou les dangers de la vie aérobie. *La Recherche* 1978; 9:743-749
- 50.- HALLIWELL B. Free radicals in biology and medicine, 2nded. Oxford: Clarendon Press,1989
- 51.- HALLIWELL B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *The Lancet* 1994; 344(10): 720-724
- 52.- FERRALI M, CICCOLI L, SIGNORINI C, COMPORTI M. Iron release and erythrocyte damage in allyl alcohol intoxication in mice. *Biochem Pharmacol* 1990; 40: 1485-1490
- 53.- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC, CARROLL EC. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now?. *J Lab Clin Med* 1992;119 (6): 598-620
- 54.- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine. Some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246: 501-514
- 55.- DE LA PEÑA FERNÁNDEZ A, REDONDO BELLÓN P. Radicales libres y mecanismos antioxidantes. Generalidades y aplicaciones en la práctica clínica. *Rev Clin Esp* 1997; 197 (6): 58-70
- 56.- HALLIWELL B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Rev* 1997; 55 (1): S44-S45
- 57.- KAS GEN, BELLOMO G, JUEDES MJ, ORRENIUS S. Toxic effects of calcium on mitochondria. *Methods Toxicol* 1993; 2: 278-288
- 58.- GABIG TG, BABIOR BM. The O₂⁻ forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. Properties of the solubilized enzyme. *J Biol Chem* 1979; 254: 9070-9074
- 59.- WINYARD PG, MORRIS CJ, WINROW VR, ZAIDI M, BLAKE D. Free radical pathways in the inflammatory response. En: Rice-Evans CA, Burdon Rh, eds. Free radical damage and its control. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1994; 361-383
- 60.- CHAMBERS DE, PARKS DA, PATTERSON G, ROY R, MCCORD JM, YOSHIDA S, PARMLEY LF, DOWNEY JM. Xantine-oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17(2): 145-152
- 61.- BECKMAN JS, BECKMAN TW, CHEN J, MARSCHALL PA, FREEMAN BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-1624

- 62.- HYSLOP PA, HINSHAW DB, HALSEY WA JR, SCHAUFSTATTER IU, SAVERCHEVER RD, SPRAGG RG, JACKSON JH, COCHRANE CG. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury: the glycolytic and mitochondrial pathways of AND phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1988; 263(4): 1665-1675
- 63.- FRIDOVICH I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1983; 23: 239-257
- 64.- TRUSH MA, MIMNAUGH EG, GRAM TE. Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem Pharmac* 1982; 31: 3335
- 65.- ROY RS, MCCORD JM. Superoxide and ischemia: conversion of XD to XO. En: Greenwald R, Cohen G, eds. *Oxy radical and their scavenger systems (vol 2). Cellular and molecular aspects.* New York: Elsevier Science, 1983; 145-153
- 66.- KELLER GA, WARNER TG, STEIMER KS, HALLIWELL RA. Cu, Zn, Superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:7381-7385
- 67.- CHANCE B, SIES H, BOVERIS A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59:527-605
- 68.- MAHIORINO M, CHU FF, URSINI F, DAVIES K, DOROSHOW JH, ESWORTHY RS. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase un the 18 kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines. *J Biol Chem* 1991; 266: 9928-9932
- 69.- SINGH S, SHACKLETON S, AH-SING E, CHAKRABORTY J, BAILEY ME. Antioxidant defenses in the bile duct-ligated rat. *Gastroenterology* 1992; 103: 1625-1629
- 70.- BARBEZAT GO, CASEY CE, REASBECK PG, ROBINSON MF, THOMSON CD. Absorption and malabsorption of mineral nutrients. In: Solomons NW, Rosemberg IH, eds. *Current topics in nutrition and disease(vol 12).* New York: Liss, 1984;231-258
- 71.- MEISTER A, ANDERSON ME. Glutathione. *Ann Rev Biochem* 1983; 52:711-760
- 72.- TSAI LY, LEE KT, LU FJ. Biochemical events associated with ligation of the common bile duct in wistar rats. *J Formos Med Assoc* 1997; 96 (1): 17-22
- 73.- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. The antioxidant of human extracellular fluid. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 1-8
- 74.- SIES H. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants.* Hardcover edition. New York: Academic Press, 1997
- 75.- ROSSER BG, GORES GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 1995; 108: 252-275

- 76.- LENNON SV, MARTIN SJ, COTTER TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cells lines by widely diverging stimules. *Cell Prolif* 1991; 24: 203-214
- 77.- DOBRETSOV GE, BORSCHEVSKAYA TA, PETROV VA,VLADIMIROV YA. The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation. *FEBS Lett* 1977; 84: 125-128
- 78.- COOLBEAR KP, KEOUGH KM. Lipid oxidation and gel to liquid-crystalline transition temperatures of synthetic polyunsaturated mixed-acid phosphatidylcholines. *Biochem Biophys Acta* 1983; 732: 531-540
- 79.- TRIBBLE DL, AW TY, JONES DP. The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology* 1987; 7: 377-387
- 80.- JONES DP, THOR H, SMITH MT, JEWELL SA, ORRENIUS S. Inhibition of ATP-dependent microsomal Ca^{2+} sequestration during oxidative stress and its prevention by glutathione. *J Biol Chem* 1983; 258(10): 6390-6393
- 81.- BELLOMO G, ORENIUS S. Altered thiol and calcium homeostasis in oxidative hepatocellular injury. *Hepatology* 1985; 5: 876-882
- 82.- AW TY, ANDERSSON BS, JONES DP. Supression of mitochondrial respiratory function after short term anoxia. *Am J Physiol* 1987; 252: C362-C368
- 83.- BERNARDI P, VASANELLI S, VERONESE P, COLONNA R, SZABO I, ZORATTI M. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 1992; 267: 2934-2939
- 84.- HOUGLUM K, BREENER DA, CHOJKIER M. D-alpha tocopherol inhibits collagen alpha 1 gene expression in cultured human fibroblasts. Modulation of constitutive collagen gene expression by lipid peroxidation. *J Clin Invest* 1991; 87: 2230-2235
- 85.- HERMAN B, GORES GJ, NIEMINEN AL, KAWANISHI T, HARMAN A, LEMASTERS JJ. Calcium and pH in anoxic and toxic injury. *Crit Rev Toxicol* 1990; 21: 217-248
- 86.- BRONK SF, GORES GJ. Acidosis protects against lethal oxidative injury of liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 1991; 14: 150-157
- 87.- CHAKRABORTI S, GURTNER GH, MICHAEL JR. Oxidant mediated activation of phospholipase A₂ in pulmonary epithelium. *Am J Physiol* 1989; 257: L430-L437
- 88.- LIAO D, GURTNER GH. Calcium dependence of the serine proteases involved in oxidant activation of phospholipases A₂. *FASEB J* 1993; 7: A346
- 89.- RADI R, BECKMAN JS, BUSH KM, FREEMAN BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288: 481-487

- 90.- BIEMOND P, SWAAK AJG, VAN EIJK HG, KOSTER JF. Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases. *Free Radic Biol Med* 1988; 4: 185-198
- 91.- TOPHEM T, GOGER M, PEARCE K, SCHULTZ P. The mobilization of ferritin iron by liver cytosol. *Biochem J* 1989; 261: 137-143
- 92.- SHALL S. The function of poly (ADP-ribosylation) in DNA breakage and rejoining. *Mol Cell Biochem* 1994; 138:71-75
- 93.- LINDHAL T, SATOH MS, POIRIER GG, KLUNGLAND A. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *TIBS* 1995; 20:401-405
- 94.- SCHRAUFSTATTER IU, HINSHAW DB, HYSLOP PA, SPRAGG RG, COCHRANE CG. Oxidant injury of cells: DNA strand-breaks activate polyadenosine diphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest* 1986; 77: 1312-1316
- 95.- DE FORGE LE, PRESTON AM, TAKEUCHI E, KENNEY J, BOXER LA, REMICK DG. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J Biol Chem* 1993; 268: 25568-25576
- 96.- LANE D. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16
- 97.-BAEUERLE PA, BALTIMORE. En: Cohen P, Foulkes JG, eds. *Molecular aspects of cellular regulation* (vol 6). Amsterdam: Elsevier, 1991; 423-446
- 98.- BRACH MA, HASS R, SHERMAN ML, GUNJI H, WEICHSELBAUM R, KUFE D. Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor Kappa B. *J Clin Invest* 1991; 88: 691-695
- 99.- KUCHINO Y, MORI F, KASAI H, INOUE H, IWAI S, MIVNA K, OHTSCKA E, NISCHIMURA S. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 1987; 327(6117): 77-79
- 100.- HALLIWELL B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 1987; 1: 358-364
- 101.- NAVARRO ZORRAQUINO M. Apoptosis: un fenómeno de moda en la investigación clínica. *Cir Esp* 1998; 64:183-185
- 102.- AMES NB, SHIGENAGA MK, HAGEN TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7915-7922
- 103.- MORAES EC, KEYSE SM, TYRREL RM. Mutagenesis by hydrogen peroxide treatment of mammalian cells: a molecular basis. *Carcinogenesis* 1990;11:283-293.
- 104.- DREHER D, JUNOD AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J of Cancer* 1996;32:30-38.

- 105.- CERUTTI PA. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 1985;227:375-381.
- 106.- TOYOKUNI S, OKAMOTO K, YODOI J, HIAI H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett* 1995;358:1-3.
- 107.- BANNISTER JV, BANNISTER WH, ROTILIO G. Aspects of the structure, function and application of superoxide dismutase. *CRC Critical Reviews of Biochemistry* 1987;22:111-180
- 108.- TURRENS JF, CRAPO JD, FREEMAN BA. Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J Clin Invest* 1984; 73: 87-95
- 109.- DARR DJ, YANNI S, PINNELL SR, Protection of chinese hamster ovary cells from paraquat-mediated cytotoxicity by a low molecular weight mimic of superoxide dismutase (DF-Mn). *Free Radic Biol Med* 1988; 4:357-363
- 110.- MUIZELAAR JP. Clinical trials with dismutec (pegorgotein, polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase, PEG-SOD) in the treatment of severe closed head injury. *Adv Exp Med Biol* 1994;366: 389-400
- 111.- BENSON AB. Oltipraz: a laboratory and clinical review. *J Cell Biochem* 1993 (suppl);17F: 278-291
- 112.- SCHEWE T. Molecular actions of ebselen, an antiinflammatory antioxidant. *Gen Pharmacol* 1995; 26: 1153-1169
- 113.- GRANGER DN, MCCORD JM, PARKS DA, HOLLWARTH ME. Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology* 1986; 90: 80-84
- 114.- BERTON G, DUSI S, SERRA MC, BELLAVITE P, ROSSI F. Studies on the NADPH oxidase of phagocyte. Production of a monoclonal antibody which blocks the enzymatic activity of pig neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1989; 264: 5564-5568
- 115.- YIN M, WHEELER MD, CONNOR HD, ZHONG Z, BUNZENDAHL H, DIKALOVA A, SAMULSKI RJ, SCHOONHOVEN R, MASON RP, SWENBERG JA, THURMAN RG. Cu/Zn-superoxide dismutase gene attenuates ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(12): 2691-2700
- 116.- MEISTER A. Glutathione, ascorbate and cellular protection. *Cancer Research* 1994; 54(suppl): 1969s-1975s
- 117.- FERRARI G, YAN CY, GREENE LA. N-acetylcysteine (D- and L- stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells. *J Neurosci* 1995; 15: 2857-2866
- 118.- DE FLORA S, CESARONE CF, BALANSKY RM, ALBINI A, D'AGOSTINI F, BENNICELLI C, BAGNASCO M, CAMOIRANO A, SCATOLINI L, ROVIDA A. Chemopreventive properties and mechanisms of N-acetylcysteine. The experimental background. *J Cell Biochem* 1995; 22(suppl): 33-41

- 119.- OSMAN E, OWEN JS, BURROUGHS AK. S-adenosyl-L-methionine: a new therapeutic agent in liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1993; 7:21-28
- 120.- BURTON GW, JOYCE A, INGOLD KU. Is vitamin E the only lipid-soluble chain breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys* 1983; 221:281-290
- 121.- COGHLAN JG, FLITTER WD, CLUTTON SM, ILSLEY CD, REES A, SLATER TF. Lipid peroxidation and changes in vitamin E levels, during coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 106:268-274
- 122.- BOZKURT AK. Alpha-tocopherol (vitamin E) and iloprost attenuate reperfusion injury in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Surg* 2002; 43(5): 693-696
- 123.- MEISTER A. On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 1905-1915
- 124.- PALOZZA P, KRINSKY NI. Beta-carotene and alpha-tocopherol are synergist antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 1992; 297: 184-187
- 125.- HERTOGL MGL, FESKENS EJM, HOLLMAN PCH, KATA MB, KROMHOUT D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342: 1007-1011
- 126.- DOBSAK P, SIEGELOVA J, WOLF JE, ROCHETTE L, EICHER JC, VASKU J, KUCHTICKOVA S, HORKY M. Prevention of apoptosis by deferoxamine during 4 hours of cold cardioplegia and reperfusion: in vitro study of isolated working rat heart model. *Pathophysiology* 2002; 9(1):27
- 127.- PATERSON JR, RUMLEY AG, OLDROYD KG, TAIT GW, SMELLIE WS, PACKARD CJ, SHEPHERD J, LORIMER AR. Probucol reduces plasma lipid peroxides in man. *Atherosclerosis* 1992; 97(1): 63-66
- 128.- NAUTA RJ, TSIMOYIANNIS E, URIBE M, WALSH DB, MILLER D, BUTTERFIELD A. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg* 1991; 213: 137-142
- 129.- WENGER FA, FILIAN M, RIDDERS J, STAHLKNECHT P, SCHIMKE I, GUSKI H, JACOBI CA, MÜLLER JM. Influence of antioxidative vitamins A,C and E on lipid peroxidation in BOP-induced pancreatic cancer in Syrian hamster. *Prostaglandin, leukotrienes and Essential fatty acids* 2001;65:165-171.
- 130.- BJELAKOVIC G, NIKOLOVA D, SIMONETTI RG, GLUUD C. Antioxidant supplements for preventing gastrointestinal cancers. *Cochrane Hepato-Biliary Group, Copenhagen Trial Unit, Centre for Clinical Intervention Research, Dept. 7102,*
- 131.- LERNER AB, CASE JD, TAKAHASHI Y, LEE TH, MORI W. Isolation of

melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 2587

132.- AXELROD J, WEISSBACH H. Enzymatic o-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science* 1960; 131: 1312-1313

133.- CONN SL, ROSEBOOM PH, BALER R, WELLER JL, NAMBOODIRI MA, KOONIN EV, KLEIN DC. Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science* 1995; 270(5242): 1681-1683

134.- FUNG BK. Transducin: structure, function, and role in phototransduction. In: Osborne N, Chader GJ, eds. *Progress in retinal research*. Vol 6. Oxford, England: Pergamon Press, 1987; 151-177

135.- PANGERL B, PANGERL A, REITER RJ. Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: a review. *J Neural Transm Gen Sect* 1990; 81: 17-29

136.- WALDHAUSER F, WEISZENBACHER G, FRISCH H, ZEITLHUBER U, WALDHAUSER M, WURTMANN RJ. Fall in nocturnal serum melatonin during prepuberty and pubescence. *Lancet* 1984, 1: 362-365

137.- WALDHAUSER F, DIETZEL M. Daily and annual rhythms in human melatonin secretion: role in puberty control. *Ann N Y Acad Sci* 1985; 453: 205-214

138.- REPERT SM, WEAVER DR, RIVKEES SA, STOPA EG. Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science* 1988; 242: 78-81

139.- McINTRYE IM, NORMAN TR, BURRWS GD, ARMSTRONG SM. Quantal melatonin suppression by exposure to low intensity light in man. *Life Science* 1989;45: 327-332

140.- LYNCH HJ, WURTMANN RJ, MOSKOWITZ MA, ARCHER MC, HO MH. Daily rhythm in human urinary melatonin. *Science* 1975; 187:169-171

141.- IGUCHI H, KATO KI, IBAYASHI Y. Melatonin serum levels and metabolic clearance rate in patients with liver cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54: 1025-1027

142.- WALDHAUSER F, WALDHAUSER M, LIEBERMAN HR, DENG MH, LYNCH HJ, WURTMANN RJ. Bioavailability of oral melatonin in humans. *Neuroendocrinology* 1984; 39:307-313

143.- WRIGHT JM, ALDHOUS M, FRANEY C, ENGLISH J, ARENDT J. The effects of exogenous melatonin on endocrine function in man. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1986; 24: 375-382

144.- REITER RJ, CARNEIRO RC, OH CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 1997; 29(8): 363-372

- 145.- REITER RJ, TAN DX, QI W, MANCHESTER LC, KARBOWNIK M, CALVO JR. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol Signals Recept* 2000; 9(3-4): 160-171
- 146.- MORGAN PJ, BARRET P, HOWELL HE, HELLIWELL R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 1994; 24: 101-46
- 147.- DUBOCOVICH ML. Melatonin receptors: are these multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16: 50-56
- 148.- EBISAWA T, KARNE S, LERNER MR, REPERT SM. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6133-6137
- 149.- REPERT SM, WEAVER DR, EBISAWA T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 1994; 13: 1177-1185
- 150.- REPERT SM, GODSON C, MAHLE CD, WEAVER DR, SLAUGENHAUPT SA, GUSELLA JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel_{1a} melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8734-8738
- 151.- BENITEZ-KING G, ANTON-TAY F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 1993; 49(8): 635-641
- 152.- BECKER-ANDRE M, WIESMBERG I, SCHAEREN-WIEMERS N, ANDRE E, MISSBACH M, SAURAT JH, CARLBERG C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 1994; 269(46): 28531-28534
- 153.- HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F, BENITEZ-KING G. Effects of melatonin on microtubule assembly depends on hormone concentration: Role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res* 1994; 17: 55-62
- 154.- REITER RJ. Functional Pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Frontiers in neuroendocrinology* 1995; 16: 383-415
- 155.- REITER RJ, POEGGELER B, TAN DX, CHEN LD, MANCHESTER LC, GUERRERO JM. Antioxidant capacity of melatonin: a novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol Lett* 1993; 15: 103-116
- 156.- TAN DX, CHEN LD, POEGGELER B, MANCHESTER LC, REITER RJ. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; 1: 57-60
- 157.- REITER RJ. The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage. *Neurochem Int* 1995; 27: 453-60

- 158.- POEGGELER B, SAARELA S, REITER RJ, TAN DX, CHEN LK, MANCHESTER LC. Melatonin-A highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: New aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738: 419-420
- 159.- POEGGELER B, REITER RJ, TAN DX, CHEN LD, Manchester LC. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *J Pineal Res* 1993; 14(4): 151-168
- 160.- HARDELAND R, REITER RJ, POEGGELER B, TAN DX. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17:347-357
- 161.- PIERI C, MARRA M, MORONI F, DECCHIONI R, MARCHESELLI F. Melatonin: A peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994;55: 271-276
- 162.- MONTILLA P, CRUZ A, PADILLO FJ, TUNEZ I, GASCON F, MUÑOZ MC, GOMEZ M, PERA C. Melatonin versus vitamin E as protective treatment against oxidative stress after extra-hepatic bile duct ligation in rats. *J Pineal Res* 2001; 31(2): 138-144
- 163.- TAN DX, REITER RJ, CHEN LD, POEGGELER B, MANCHESTER LC, BARLOW-WALDEN LR. Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen safrole in vivo. *Carcinogenesis* 1994; 15: 215-218
- 164.- SPECTOR A, GARNER WH. Hydrogen peroxide and human cataract. *Exp Eye Res* 1981; 33: 673-681
- 165.- ABE M, REITER RJ, ORHII PH, HARA M, POEGGELER B, BARLOW-WALDEN LR. Inhibitory effect of melatonin on cataract formation in newborn rats: Evidence of an antioxidative role for melatonin. *J Pineal Res* 1994; 17: 94-100
- 166.- REITER R, TANG L, GARCIA JJ, MUÑOZ-HOYOS A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 1997; 60(25): 2255-2271
- 167.- REITER RJ, GUERRERO JM, GARCÍA JJ, ACUÑA-CASTROVIEJO D. Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 854:410-424
- 168.- BERTUGLIA S, MARCHIAFAVA PL, COLANTUONI A. Melatonin prevents ischemia reperfusion injury in hamster cheek pouch microcirculation. *Cardiovasc Res* 1996; 31(6): 947-952
- 169.- QI W, TAN DX, REITER RJ, KIM SJ, MANCHESTER LC, CABRERA J, SAINZ RM, MAYO JC. Melatonin reduces lipid peroxidation and tissue edema in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 1999; 44(11): 2257-2262

- 170.- EBELT H, PESCHKE D, BROMME HJ, MORKE W, BLUME R, PESCHKE E. Influence of melatonin on free radical-induced changes in rat pancreatic beta-cells in vitro. *J Pineal Res* 2000; 28(2): 65-72
- 171.- ANDERSSON AK, SANDLER S. Melatonin protects against streptozotocin, but not interleukin-1 beta induced damage of rodent pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 2001; 30(3): 157-165
- 172.- VURAL H, SABUNCU T, ARSLAN SO, AKSOY N. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. *J Pineal Res* 2001; 31(3):193-198
- 173.- STEVENS RG. Circadian disruption and breast cancer: from melatonin to clock genes. *Epidemiology*. 2005 Mar;16(2):254-8.
- 174.- SCHERNHAMMER E, SCHULMEISTER K. Light at night and cancer risk. *Photochem Photobiol*. 2004 Apr;79(4):316-8.
- 175.- TRAVIS RC, ALLEN DS, FENTIMAN IS, KEY TJ. Melatonin and breast cancer: a prospective study. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Mar 17;96(6):475-82
- 176.- REITER RJ. Mechanisms of cancer inhibition by melatonin. *J Pineal Res*. 2004 Oct;37(3):213-4.
- 177.- GIRGERT R, BARTSCH C, HILL SM, KREIENBERG R, HANF V. Tracking the elusive antiestrogenic effect of melatonin: a new methodological approach. *Neuro Endocrinol Lett*. 2003 Dec;24(6):440-4.
- 178.- COS S, MARTINEZ-CAMPA C, MEDIAVILLA MD, SANCHEZ-BARCELO EJ. Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res*. 2005;38:136-42.
- 179.- BAYES M, RABASEDA X, PROUS JR. Gateways to clinical trials. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2004 Sep;26(7):587-612.
- 180.- LISSONI P, BARNI S, MANDALA M, ARDIZZOIA A, PAOLOROSSO F, VAGHI M, LONGARINI R, MALUGANI F, TANCINI G. Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. *Eur J Cancer*. 1999 ;35:1688-92.
- 181.- LISSONI P, TANCINI G, PAOLOROSSO F, MANDALA M, ARDIZZOIA A, MALUGANI F, GIANI L, BARNI S. Chemoneuroendocrine therapy of metastatic breast cancer with persistent thrombocytopenia with weekly low-dose epirubicin plus melatonin: a phase II study. *J Pineal Res*. 1999 Apr;26(3):169-73.
- 182.- MAZZOCOLI G, CARUGHI S, DE CATA A, LA VIOLA M, GIULIANI A, TARQUINI R, PERFETTO F.

Neuroendocrine alterations in lung cancer patients. *Neuro Endocrinol Lett.* 2003 Feb-Apr;24(1-2):77-82.

183.- LISSONI P, PAOLOROSSO F, ARDIZZOIA A, BARNI S, CHILELLI M, MANCUSO M, TANCINI G, CONTI A, MAESTRONI GJ. A randomized study of chemotherapy with cisplatin plus etoposide versus chemoendocrine therapy with cisplatin, etoposide and the pineal hormone melatonin as a first-line treatment of advanced non-small cell lung cancer patients in a poor clinical state. *J Pineal Res* 1997;23:15-9.

184.- ABRIAL C, KWIATKOWSKI F, CHEVRIER R, GACHON F, CURE H, CHOLLET P. Therapeutic potential of melatonin in cancer treatment. *Pathol Biol* 2005;53:265-8

185.- Ghielmini M, Pagani O, de Jong J, Pampallona S, Conti A, Maestroni G, Sessa C, Cavalli F. Double-blind randomized study on the myeloprotective effect of melatonin in combination with carboplatin and etoposide in advanced lung cancer. *Br J Cancer.* 1999;80:1058-61.

186.- YAN JJ, SHEN F, WANG K, WU MC. Patients with advanced primary hepatocellular carcinoma treated by melatonin and transcatheter arterial chemoembolization: a prospective study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2002;1:183-6.

187.- BUSNARDO, AC; DIDIO, L.J.A.; TRIDICK, RT; THOMPORD, NR. History of the pancreas; *Am.J.Surg.* 1.983;146:539.

188.- ESTRADA, L. El páncreas en la historia de la cirugía. *Rev.Esp.Enf.Ap.Dig.* 1.974;42:451.

189.- SARR, MG; CAMERON, JL. Surgical management of unresectable carcinoma of the pancreas. *Surgery.* 1.982;91:123.

190.- FITZGERALD, PJ. Medical anecdotes concerning some diseases of the pancreas. In: Fitzgerald, PJ; Morrison, AB, ed; *The pancreas.* Baltimore: Williams and Wilkins.1.980;1.

191.- RODNEY SMITH, MS. The surgery of pancreatic neoplasms. Edit.S.Livingstone. Edimburg and London. 1.953.

192.- WHIPLE, A; PARSON, W; MULLINS, C. Treatment of carcinoma of the ampulla of Vater. *Ann.Surg.* 1.935;102:763.

193.- BRUNSCHWIG, A. The surgery of pancreatic tumor. St. Louis;CV Mosby.1.942;17.

194.- ALEXAQUIS N, HALLORAN C, RARATY M, GLANEH P, SUTTON R, NEOPTOLEMOS JP. Current Standards of surgery for pancreatic cancer. *Br J Surg* 2004;91:1410-27.

195.- Delpero JR. Surgical resection of pancreatic adenocarcinoma: indications and contraindications, pronostic factors and survival, recent advances *Cancer Radiother.* 2004;8:73-9

- 196.- TRAN KT, SMEENK HG, VAN EIJCK CH, KAZEMIER G, HOP WC, GREVE JW, TERPSTRA OT, ZIJLSTRA JA, KLINKERT P, JEEKEL H. Pylorus preserving pancreaticoduodenectomy versus standard Whipple procedure: a prospective, randomized, multicenter analysis of 170 patients with pancreatic and periampullary tumors. *Ann Surg.* 2004 Nov;240(5):738-45.
- 197.- ARANHA GV, SHOUP M. Nonstandard pancreatic resections for unusual lesions. *Am J Surg.* 2005 Feb;189(2):223-8.
- 198.- WAGNER M, REDAELLI C, LIETZ M, SEILER CA, FRIESS H, BUCHLER MW. Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg.* 2004 May;91(5):586-94.
- 199.- ALBERTS SR, SCHROEDER M, ERLICHMAN C, STEEN PD, FOSTER NR, MOORE DF JR, ROWLAND KM JR, NAIR S, TSCHETTER LK, FITCH TR. Gemcitabine and ISIS-2503 for patients with locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma: a North Central Cancer Treatment Group phase II trial. *J Clin Oncol.* 2004 Dec 15;22(24):4944-50.
- 200.- OKUSAKA T, KOSUGE T. Systemic chemotherapy for pancreatic cancer. *Pancreas.* 2004 Apr;28(3):301-4.
- 201.- GOLDSTEIN D, CARROLL S, APTE M, KEOGH G. Modern management of pancreatic carcinoma. *Intern Med J.* 2004 Aug;34(8):475-81.
- 202.- XIONG HQ, ABBRUZZESE JL. Adjuvant therapy for pancreatic cancer: current status and future directions. *Surg Oncol Clin N Am.* 2004 Oct;13(4):737-49
- 203.- RAUT CP, EVANS DB, CRANE CH, PISTERS PW, WOLFF RA. Neoadjuvant therapy for resectable pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2004 Oct;13(4):639-61
- 204.- CANTORE M, RABBI C, FIORENTINI G, OLIANI C, ZAMAGNI D, IACONO C, MAMBRINI A, DEL FREO A, MANNI A. Combined irinotecan and oxaliplatin in patients with advanced pre-treated pancreatic cancer. *Oncology.* 2004;67(2):93-7.
- 205.- JAFARI M, ABBRUZZESE JL. Pancreatic cancer: future outlook, promising trials, newer systemic agents, and strategies from the Gastrointestinal Intergroup Pancreatic Cancer Task Force. *Surg Oncol Clin N Am.* 2004 Oct;13(4):751-60
- 206.- MACKENZIE MJ. Molecular therapy in pancreatic adenocarcinoma. *Lancet Oncol.* 2004 Sep;5(9):541-9.
- 207.- HOCHT S, WIEGEL T, SIEGMANN A, HINKELBEIN W. Radiochemotherapy in unresectable pancreatic cancer. *Front Radiat Ther Oncol.* 2004;38:82-6.
- 208.- FLECKENSTEIN J, RUBE C. Adjuvant radiochemotherapy for pancreatic cancer--why we might need it even more. *Front Radiat Ther Oncol.* 2004;38:87-93.

- 209.- SCHILSKY RL, BERTUCCI D, VOGELZANG NJ, KINDLER HL, RATAIN MJ. Dose-Escalating study of capecitabine plus gemcitabine combination therapy in patients with advanced cancer. *J Clin Oncology* 2002;20:582-587
- 210.- HESS V, SALZBERG M, BORNER M, MORANT R, ROTH AD, LUDWIG C, HERRMAN R. Combining capecitabine and gemcitabine in patients with advanced pancreatic carcinoma: a phase I/II trial. *J Clin Oncology* 2003;21:66-68
- 211.- CARTWRIGHT TH, COHN A, VARKEY JA, CHEN Y, SZATROWSKI TP, COX JV, SCHULZ JJ. Phase II study of oral capecitabine in patients with advanced or metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncology* 2002;20:160-164
- 212.- R. GINGELL, L. WALLCAVE, D. NAGEL, R. KUPPER, P. POUR. Metabolism of the pancreatic carcinogens N-nitroso-bis(2-oxopropyl)amine and N-nitroso-bis(2-hydroxypropyl)amine in the Syrian hamster. *J Natl Cancer Inst.* 1976 Nov;57(5):1175-8.
- 213.- M. MEIJERS, A. VAN GARDEREN-HOETMER, C.B. LAMERS, L.C. ROVATI, J.B. JANSEN, R.A. Woutersen. Role of cholecystokinin in the development of BOP-induced pancreatic lesions in hamsters. *Carcinogenesis* 11 (1990). 2223-2226.
- 214.- P. POUR, J. ALTHOFF, F.W. KRÜGER, U. MOHR. A potent pancreatic carcinogen in Syrian golden hamsters: N-nitrosobis (2-oxopropyl)amine. *J Natl Cancer Inst* (58)1977. 1449-53.
- 215.- AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. *AJCC Cancer Staging Manual, Sixth Edition (2002)*. Springer-Verlag New York
- 216.- ROCHA-LIMA CM. New directions in the management of advanced pancreatic cancer: a review. *Anticancer Drugs.* 2008;19:435-46.
- 217.- SAIF MW. Is there a standard of care for the management of advanced pancreatic cancer?. Highlights from the Gastrointestinal Cancers Symposium. Orlando, FL, USA 2008. *JOP.* 2008 Mar 8;9:91-8.
- 218.- ALLENDORF JD, LAUERMAN M, BILL A, DIGIORGI M, GOETZ N, VAKIANI E, REMOTTI H, SCHROPE B, SHERMAN W, HALL M, FINE RL, CHABOT JA. Neoadjuvant chemotherapy and radiation for patients with locally unresectable pancreatic adenocarcinoma: feasibility, efficacy, and survival. *J Gastrointest Surg.* 2008 ;12:91-100.
- 219.- MOORE R, SAIF MW. Is there an optimal neoadjuvant therapy for locally advanced pancreatic cancer?. *JOP.* 2007 May 9;8:279-88.
- 220.- OLLENDOR SA, MOORE MJ. Combination chemotherapy in advanced pancreatic cancer: time to raise the white flag?. *J Clin Oncol.* 2007;25:2159-61.
- 221.- DAN S, RANA V, JANJAN NA, VARADHACHARY GR, ABBRUZZESE JL, DAS P, DELCLOS ME, GOULD MS, EVANS DB, WOLFF RA, CRANE CH. Induction chemotherapy selects patients with locally advanced, unresectable pancreatic cancer for optimal benefit from consolidative chemoradiation therapy. *Cancer.* 2007;110:47-55.

- 222.- DUCREUX M, BOIGE V, MALKA D.
Treatment of advanced pancreatic cancer.
Semin Oncol. 2007 ;34:S25-30.
- 223.- HOCHSTER HS, HALLER DG, DE GRAMONT A, BERLIN JD, PHILIP PA, MOORE MJ, AJANI JA.
Consensus report of the international society of gastrointestinal oncology on therapeutic progress in advanced pancreatic cancer.
Cancer. 2006;107:676-85.
- 224.- CHUA YJ, CUNNINGHAM D.
Chemotherapy for advanced pancreatic cancer.
Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2006;20:327-48.
- 225.- SAIF MW, SELLERS S, RUSSO S.
Gemcitabine-related radiation recall in a patient with pancreatic cancer.
Anticancer Drugs. 2006 Jan;17(1):107-11.
- 226.- HERRMANN R, BODOKY G, RUHSTALLER T, GLIMELIUS B, BAJETTA E, SCHÜLLER J, SALETTI P, BAUER J, FIGER A, PESTALOZZI B, KÖHNE CH, MINGRONE W, STEMMER SM, TÀMAS K, KORNEK GV, KOEBERLE D, CINA S, BERNHARD J, DIETRICH D, SCHEITHAUER W. Gemcitabine plus capecitabine compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: a randomized, multicenter, phase III trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research and the Central European Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2007;25:2212-7.
- 227.- BOECK S, HOEHLER T, SEIPELT G, MAHLBERG R, WEIN A, HOCHHAUS A, BOECK HP, SCHMID B, KETTNER E, STAUCH M, LORDICK F, KO Y, GEISSLER M, SCHOPPEMEYER K, KOJOUHAROFF G, GOLF A, NEUGEBAUER S, HEINEMANN V. Capecitabine plus oxaliplatin (CapOx) versus capecitabine plus gemcitabine (CapGem) versus gemcitabine plus oxaliplatin (mGemOx): final results of a multicenter randomized phase II trial in advanced pancreatic cancer. *Ann Oncol.* 2008;19(2):340-7.
- 229.- FINE RL, FOGELMAN DR, SCHREIBMAN SM, DESAI M, SHERMAN W, STRAUSS J, GUBA S, ANDRADE R, CHABOT J.
The gemcitabine, docetaxel, and capecitabine (GTX) regimen for metastatic pancreatic cancer: a retrospective analysis.
Cancer Chemother Pharmacol. 2008;61(1):167-75
- 230.- SAADATI H, SAIF MW. Capecitabine as salvage therapy for a pancreatic cancer patient with extensive liver metastases and associated impairment of liver function. *JOP.* 2008 May 8;9(3):354-6.
- 231.- BOECK S, WILKOWSKI R, BRUNS CJ, ISSELS RD, SCHULZ C, MOOSMANN N, LAESSIG D, HAAS M, GOLF A, HEINEMANN V. Oral capecitabine in gemcitabine-pretreated patients with advanced pancreatic cancer. *Oncology.* 2007;73(3-4):221-7.

- 232.- SAIF MW, TEJANI MA. Safety of capecitabine use in patients with liver dysfunction. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2007 Sep;5(9):730-2.
- 233.- BLOCK KI, KOCH AC, MEAD MN, TOTHY PK, NEWMAN RA, GYLLENHAAL C. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials.- *Cancer Treat Rev.* 2007 Aug;33(5):407-18.
- 234.- LISSONI P, BRIVIO F, FUMAGALLI L, MESSINA G, VIGORÉ L, PAROLINI D, COLCIAGO M, ROVELLI F. Neuroimmunomodulation in medical oncology: application of psychoneuroimmunology with subcutaneous low-dose IL-2 and the pineal hormone melatonin in patients with untreatable metastatic solid tumors. *Anticancer Res.* 2008;28:1377-81
- 235.- Moss RW. Do antioxidants interfere with radiation therapy for cancer? *Integr Cancer Ther.* 2007 Sep;6(3):281-92.
- 236.- SHIRAZI A, GHOBADI G, GHAZI-KHANSARI M. A radiobiological review on melatonin: a novel radioprotector. *J Radiat Res (Tokyo).* 2007 ;48:263-72.
- 237.- Ruiz-Rabelo JF, Vázquez R, Perea MD, Cruz A, González R, Romero A, Muñoz-Villanueva MC, Túnez I, Montilla P, Muntané J, Padillo FJ. Beneficial properties of melatonin in an experimental model of pancreatic cancer. *J Pineal Res.* 2007;43(3):270-5.
- 238.- WENGER FA, KILIAN M, ACHUCARRO P, HEINICKEN D, SCHIMKE I, GUSKI H, JACOBI CA, MULLER JM. Effects of Celebrex and Zylflo on BOP-induced pancreatic cancer in Syrian hamsters. *Pancreatology* 2002;2:54-60.