



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Centro de Estudios de Postgrado*

# PROPIEDADES BIOACTIVAS DEL HIDROXITIROSO, POLIFENOL NATURAL, EN MELANOMA

**Alumno: Esther Juste Cuadros**

Director/a: Eva Encarnación Rufino Palomares

Tutor/a: Alberto J. Moya López

Dpto.: Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales

**Fecha: Marzo, 2022**



Alberto J. Moya López, Profesor Titular de Universidad en el Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén, Como **Tutor** de D<sup>a</sup>. Esther Juste Cuadros en el Máster Universitario en Olivar y Aceite de Oliva, durante el curso 2021-2022.

**INFORMA:** Que el presente trabajo fin de máster *“PROPIEDADES BIOACTIVAS DEL HIDROXITIRO SOL, POLIFENOL NATURAL, EN MELANOMA”* ha sido realizado por D<sup>a</sup>. Esther Juste Cuadros, para la obtención del Título de Máster Universitario en Olivar y Aceite de Oliva por la Universidad de Jaén, bajo la dirección de la Dra. Eva Encarnación Rufino Palomares.

Jaén, a 22 de febrero de 2022

Fdo.: Esther Juste Cuadros

Fdo.: Alberto J. Moya López

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad de Jaén la formación que me ha procurado en estos dos últimos años, así como a la Universidad de Granada y, en especial, a la profesora Eva E. Rufino Palomares, por su ayuda en la elaboración de este TFM. También tengo que agradecer a mi marido su infinita paciencia durante los años que ha durado este Máster, haciéndose cargo de nuestras responsabilidades familiares durante el tiempo que yo me he ausentado para poder formarme en este campo de la mejor manera posible.

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN .....</b>	<b>8</b>
1. INTRODUCCIÓN.....	10
<b>1.1. El cáncer melanoma.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2. Polifenoles naturales del aceite de oliva.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3. Hidroxitirosol .....</b>	<b>16</b>
<b>1.4. Propiedades bioactivas del hidroxitirosol .....</b>	<b>17</b>
1.4.1. Propiedades antioxidantes .....	17
1.4.2. Bioactividad anticancerígena.....	18
1.4.3. Propiedades anti-inflamatorias .....	18
1.4.4. Protección cardiovascular.....	19
1.4.5. Actividad antidiabetogénica .....	19
1.4.6. Actividad antimicrobiana.....	20
1.4.7. Otras Bioactividades.....	21
2. JUSTIFICACIÓN y OBJETIVOS .....	22
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
5. CONCLUSIONES.....	41
6. BIBLIOGRAFÍA.....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Concentraciones de hidroxitirosol (en  $\mu\text{g/mL}$ ) a las cuales disminuye la viabilidad celular en un 20, 50 y 80% tras 24, 48 ó 72 horas de incubación en cada caso en células de melanoma de ratón (B16F10).

## ÍNDICE DE TABLAS

**Figura 1.** Esquema de las capas de la piel y tipos de células de la epidermis.

**Figura 2.** Estructura de un fenol.

**Figura 3.** Tipo de polifenoles y estructuras de algunos subtipos.

**Figura 4.** Estructura del hidroxitirosol.

**Figura 5.** Estructura de los 4 compuestos de los que forma parte el hidroxitirosol.

**Figura 6.** Efecto del HT en la producción intracelular de ROS y niveles de TBARS, inducida por UVA en células de melanoma M14.

**Figura 7.** Ensayo MTS de células de melanoma tratadas con HT.

**Figura 8.** Análisis TUNEL de células de melanoma tratadas con hidroxitirosol.

**Figura 9.** Análisis de citometría de flujo de las células de melanoma A375 tratadas con hidroxitirosol.

**Figura 10.** Análisis de citometría de flujo de las células de melanoma HT-144 tratadas con hidroxitirosol.

**Figura 11.** Expresión de procaspasa-9, porcaspasa-3 y caspasa-3 en células A375 y HT-144 de melanoma tratadas con HT.

**Figura 12.** Cantidad de ROS en células A375 (izquierda) y HT-144 (derecha) tratadas con HT durante 24 y 48h.

**Figura 13.** Ensayo de colonias celulares de células de melanoma tratadas con hidroxitirosol.

**Figura 14.** Efectos de **(A)** Ácido oleico, **(B)** alcohol homovanilílico, y **(C)** tratamiento con hidroxitirosol a concentraciones de 100µM y 200µM sobre la viabilidad metabólica de las células A375 y MNT1, 48 h después de la incubación.

**Figura 15.** Esquema de los efectos específicos del ácido oleico (OA), el alcohol homovanilílico (HA) y el hidroxitirosol (HYD) en vías metabólicas clave activadas en las líneas celulares de melanoma A375 y MNT1.

**Figura 16.** Imágenes de migración celular de la línea B16F10 tanto controles como tratadas con hidroxitirosol a 0, 12 y 24h respectivamente.

## **RESUMEN**

El hidroxitirosol es uno de los principales polifenoles naturales presentes en el aceite de oliva, y en los últimos años ha sido relacionado con un gran número de propiedades beneficiosas entre las que destacan su efecto antioxidante, capacidad antiinflamatoria y potencial como agente antitumoral. Este trabajo se ha centrado en recopilar la literatura que existe hasta el momento del efecto del hidroxitirosol como anticancerígeno en el cáncer de tipo melanoma. En el contexto de este cáncer, se ha demostrado que el hidroxitirosol exhibe un papel protector ya que produce una parada en el ciclo celular y es capaz de inducir apoptosis en células tumorales, todo ello gracias a su capacidad secuestradora de radicales libres. Asimismo, se ha visto que modula los principales marcadores de las rutas moleculares implicadas en las rutas de proliferación y supervivencia y cáncer. Todos estos resultados hacen posible que este compuesto pueda ser utilizado en el tratamiento de estas patologías.

**Palabras clave:** aceite de oliva, cáncer, efecto anticancerígeno, hidroxitirosol, melanoma, polifenoles.

## **ABSTRACT**

Hydroxytyrosol is one of the main natural polyphenols present in olive oil, and in recent years it has been associated with a large number of beneficial properties, among which its antioxidant effect, anti-inflammatory capacity and potential as an antitumor agent stand out. This work has focused on collecting the literature that exists to date on the effect of hydroxytyrosol as an anticancer agent in melanoma-type cancer. In the context of this cancer, it has been shown that hydroxytyrosol plays a protective role as it produces a stop in the cell cycle and is capable of inducing apoptosis in tumor cells, all thanks to its free radical scavenging capacity. Likewise, it has been seen that it modulates the main markers of the molecular pathways involved in the proliferation and survival and cancer pathways. All these results make it possible for this compound to be used in the treatment of these pathologies.

**Key words:** anticancer effect, cancer, hydroxytyrosol, melanoma, olive oil, polyphenols.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. EL CÁNCER MELANOMA

El cáncer, definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), es un proceso de crecimiento y diseminación descontrolado de células. En concreto, engloba un conjunto de enfermedades caracterizadas por la presencia de células que se convierten en malignas progresivamente a través de una serie de alteraciones que afectan a diferentes mecanismos de proliferación celular. Las características principales de las células tumorales son su alto potencial de proliferación, su resistencia a los mecanismos de envejecimiento celular y apoptosis, y su elevada capacidad de invasión y metástasis <sup>1</sup>.

Dentro del contexto del cáncer, el melanoma tiene lugar en la piel y, aunque es una de las formas más raras de cáncer de piel, es uno de los pocos tipos de cánceres cuya incidencia ha ido en aumento <sup>2</sup> duplicándose en los últimos 10 años. Asimismo, este tipo de cáncer es menos frecuente que otros tipos de cáncer de piel, pero se conoce que es más peligroso porque progresa más rápido y llega a otras partes del cuerpo, sobre todo si no se descubre y se trata a tiempo.

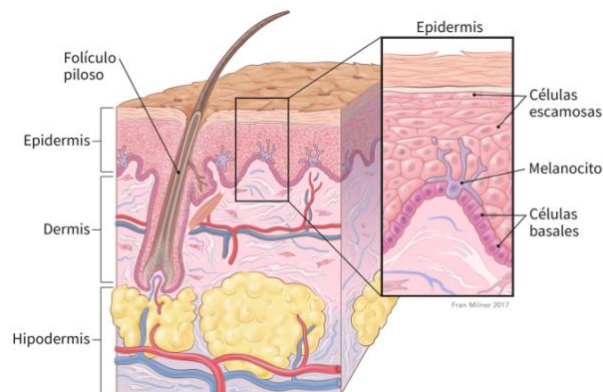
El cáncer de tipo melanoma representa el 2,5% del total de cánceres y sólo es responsable del 1-2% de las muertes por cáncer. Dentro de los tipos de cánceres cutáneos, el melanoma supone un pequeño porcentaje, el 4%, aunque es la causa de un 80% de las muertes por cáncer cutáneo <sup>3</sup>.

En la capa epidermis de la piel es en donde comienzan la mayoría de los cánceres de piel. En esta capa se diferencian tres tipos de células (Figura 1):

- Células escamosas. Se trata de una capa superficial de células planas localizada en la parte más externa de la epidermis. Esta capa de células se va desprendiendo, a medida que nuevas células se forman en las capas más profundas de la piel.
- Células basales. Es una capa de células localizada en la parte inferior de la epidermis. Éstas, se dividen constantemente para sustituir las células

escamosas que se desprenden de la superficie. A medida que estas células se desplazan hacia la capa más superficial se vuelven más planas, y con el tiempo se transforman en escamosas.

- Melanocitos. Se trata de una capa de células pigmentarias que producen melanina (pigmento que da color moreno o bronceado a la piel). Esta capa de melanocitos es de protección contra los efectos nocivos del sol.



**Figura 1.** Esquema de las capas de la piel y tipos de células de la epidermis. Extraída de <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8992.00.pdf>

El cáncer tipo melanoma se origina en los melanocitos. Si estos producen melanina, los tumores son de color café o negro; si no producen melanina son rosado, pálido o incluso blanco. Se conoce que los melanomas se pueden formar en cualquier parte de la piel, aunque son más frecuentes en el tronco de los hombres y en las piernas de las mujeres, así como en el cuello y rostro. Las personas que tienen una piel oscura, tienen menor riesgo de padecer melanoma.

Factores genéticos, familiares y ambientales son los principales elementos para padecer cáncer del tipo melanoma. Los componentes familiares y genéticos contienen el fototipo de piel, el número de nevus melanocíticos (pecas pigmentadas que se encuentran casi en la totalidad de la población), la presencia de pecas y la historia familiar de cáncer cutáneo. Entre los elementos ambientales se incluyen la exposición a la radiación ultravioleta, la disminución de la capa de ozono, enfermedades o tratamientos que inducen inmunosupresión y el estatus económico

4.

Actualmente, el protocolo de tratamiento del melanoma depende del estado de progreso del tumor en el momento en el que se detecta la enfermedad. Si se diagnostica pronto, el melanoma se puede extirpar mediante cirugía, pero si se extiende a los ganglios linfáticos, la cirugía será más invasiva y la quimio e inmunoterapia se asociarán al tratamiento. Desgraciadamente, estas terapias pueden sufrir la resistencia del paciente y generar daños en el tejido del huésped. En particular, la resistencia intrínseca a la apoptosis de las células del melanoma es una de las principales causas de fracaso de la terapia contra el cáncer. Hasta hace poco, el pronóstico del melanoma maligno avanzado era malo, pero el descubrimiento de las principales vías implicadas en la progresión y la resistencia del melanoma impulsó el uso de nuevos agentes terapéuticos. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas estrategias dirigidas a las células del melanoma, que también reduzcan la resistencia y los efectos secundarios de los pacientes y una combinación de tratamiento convencional con agentes biológicos (la llamada terapia complementaria) <sup>5</sup>.

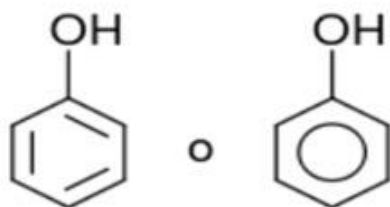
## 1.2. POLIFENOLES NATURALES DEL ACEITE DE OLIVA

En los últimos años, en los países desarrollados se ha visto un aumento de la esperanza de vida; sin embargo, este dato está conectado con una mayor incidencia de patologías asociadas, sobre todo, al estilo de vida y a la edad. Entre las patologías encontradas se encuentran las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y/o Parkinson, las cardiovasculares, el cáncer, diabetes tipo 2, entre otras. Se conoce que estas patologías son difícilmente tratables ya que son de lenta progresión, y porque la aparición de sus signos clínicos ocurre a mediana o avanzada edad, cuando la pérdida celular ya es muy notoria e irreversible. Por ello, parece indudable que la prevención sigue siendo una de las estrategias para combatir estas situaciones patológicas.

En este sentido, para prevenir ciertas patologías, se puede hacer uso de la alimentación y la dieta. Hoy día, multitud de estudios defienden que la dieta mediterránea (DM) se relaciona con un mejor envejecimiento y a una menor incidencia de las patologías asociadas con la edad <sup>6</sup>.

El Grupo de Expertos de la Fundación de la Dieta Mediterránea, ha propuesto un nuevo diseño de la pirámide de la DM, en el que se destaca la importancia, además de la restricción calórica (RC), de la moderación, la convivencia, la actividad física y el descanso adecuado. En ese acuerdo, también se incluye la importancia de verduras, frutas, legumbres, cereales, frutos secos y semillas y del aceite de oliva virgen extra (AOVE) como principal fuente de lípidos, además de que es más rico en compuestos fenólicos que otros aceites vegetales y que le aporta una mayor resistencia a la oxidación. Una particularidad de la DM es la elevada ingesta de fitonutrientes tales como, vitaminas y fenoles naturales que, por sí mismos, son capaces de activar las rutas moleculares de señalización implicadas en la homeostasis proteica, la reparación del ADN, la regulación del metabolismo y las defensas antioxidantes <sup>7</sup>.

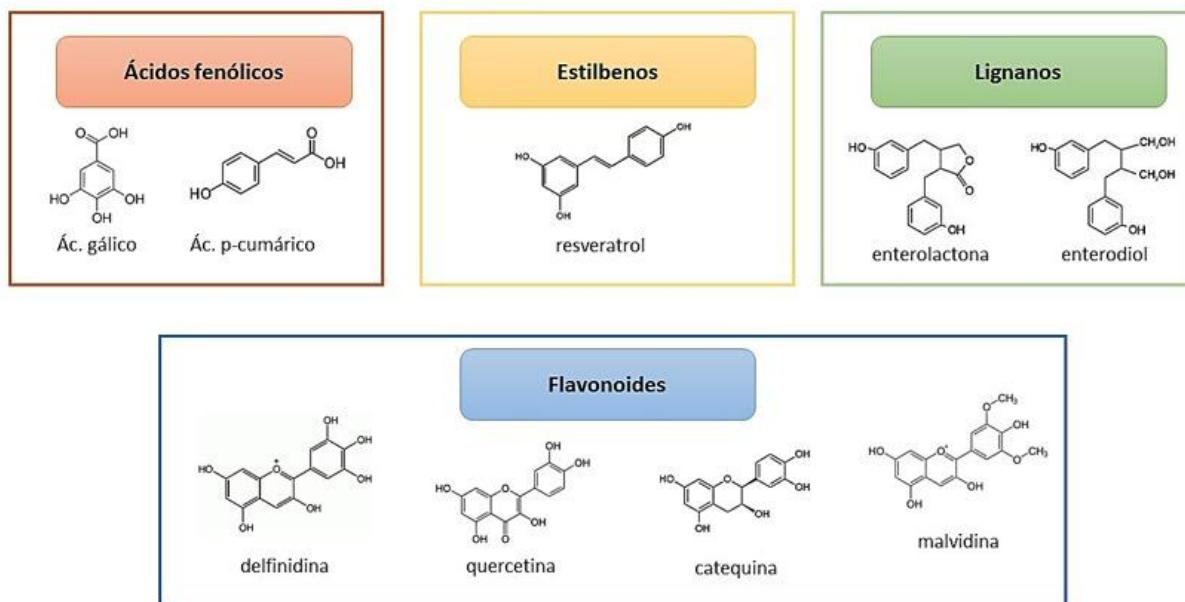
Las sustancias fenólicas naturales son metabolitos vegetales secundarios, un grupo importante de compuestos vegetales (más de 8000) caracterizados químicamente por la presencia de uno o más anillos aromáticos con uno o más sustituyentes hidroxilos <sup>8</sup> (Figura 2).



**Figura 2.** Estructura de un fenol. Extraída de (Quiñones y col., 2012) <sup>8</sup>.

Los polifenoles naturales son compuestos moderadamente solubles con un peso molecular entre los 500-4000 Da, con más de 12 grupos hidroxilo fenólicos y que presentan entre 5 y 7 anillos aromáticos por cada 1000 Da de peso. En este grupo también se han incluido moléculas de menor peso molecular, pero con un gran interés biológico por sus beneficios en la salud y que presentan uno o más anillos aromáticos y al menos dos grupos hidroxilos <sup>9</sup>.

El olivo (*Olea europaea*) presenta su propia batería de polifenoles los cuales pueden definirse acorde a los anillos polifenólicos que poseen y a los componentes estructurales que presentan estos anillos. Los principales son ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos y flavonoides (Figura 3) <sup>8</sup>.



**Figura 3.** Tipo de polifenoles y estructuras de algunos subtipos. Extraída de (Quiñones y col., 2012) <sup>8</sup>.

La concentración de polifenoles en el AOVE depende de diversas variables, como el tipo de aceituna y el estado de maduración del fruto <sup>10</sup>; los factores ambientales (altitud, prácticas de cultivo y cantidad de riego); las condiciones de extracción (calentamiento, adición de agua y malaxado); los sistemas de extracción utilizados para separar el aceite de las pastas de aceituna (presión, sistemas de centrifugación); y las condiciones y el tiempo de almacenamiento, debido a la oxidación espontánea y a la deposición de partículas en suspensión <sup>11</sup>.

Desde el punto de vista bromatológico la composición del aceite de oliva, se puede clasificar en compuestos mayoritarios (aproximadamente el 98%) y minoritarios (2% restante). Tradicionalmente, la fracción mayoritaria es conocida como fracción saponificable, donde se incluyen los triglicéridos, componentes principales del aceite

de oliva, y en menor medida diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres. La fracción minoritaria presenta una gran variedad de compuestos químicos, entre los que se encuentran los compuestos volátiles y polares. Se han determinado en esta fracción fosfolípidos, ceras, ésteres de esteroides, hidrocarburos, alcoholes alifáticos, esteroides libres, tocoferoles, clorofilas, carotenoides y compuestos fenólicos.

Los polifenoles se encuentran en las fracciones lipídica y acuosa (en forma de pequeñas gotas) en el aceite de oliva, principalmente en el aceite de oliva extra virgen (40,2 y 3,8 mg/Kg respectivamente), e incluyen los alcoholes fenólicos hidroxitirosol (HT, 3,4-dihidroxifeniletanol) y tirosol (Tyr, p-hidroxifeniletanol) y sus precursores. Entre estos precursores se encuentra el éster HT del ácido elenólico (conocido como oleuropeína, OLE), principal responsable del sabor amargo de las hojas y drupas del olivo; el derivado dialdehídico del ácido decarboximetil elenólico unido al HT (dialdehído del ácido elenólico 3,4-dihidroxifenilanol, 3,4-DHPEA-EDA, también conocido como oleaceína) o al tirosol (dialdehído del ácido elenólico p-hidroxifenilanol, p-HPEA-EDA, también conocido como oleocantal). Este último es el principal responsable de la sensación de ardor que se produce al consumir AOVE <sup>12</sup>.

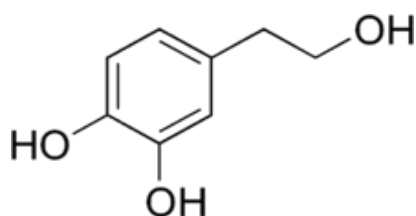
La OLE, el Tyr y el HT son los tres compuestos fenólicos más abundantes y destacan fundamentalmente por sus propiedades bioactivas, con una clara relación estructural <sup>13</sup>. La OLE es un éster formado por hidroxitirosol (el principal compuesto fenólico en el aceite de oliva) y ácido elenólico (principal compuesto fenólico en la aceituna y la hoja del olivo).

Por otro lado, el HT y el Tyr son estructuralmente idénticos, excepto por el hecho de que el HT presenta un grupo hidroxilo adicional en posición meta. El HT se origina por la hidrólisis de la OLE durante la maduración del fruto, el almacenamiento del aceite y la preparación de las aceitunas de mesa <sup>14</sup>. Así, la principal fuente de este polifenol natural es el aceite de oliva, donde se encuentra en forma libre o como derivado con una gran estabilidad.

### 1.3. HIDROXITIRO SOL

El Hidroxitirosol (HT) (2-(3,4-dihidroxifenil)-etanol, (Figura 4) es un compuesto fenólico presente en el fruto y las hojas del olivo (*Olea europaea L.*). Es uno de los componentes más significativos del aceite de oliva virgen, del agua de lavado de la molienda de la oliva y de los extractos de las hojas (cuyo extracto se comercializa actualmente como suplemento nutricional <sup>15</sup>.

El HT se origina a partir de la hidrólisis de la oleuropeina, un glicósido amargo que puede llegar a constituir más del 14% del peso seco del fruto del olivo <sup>9</sup>.

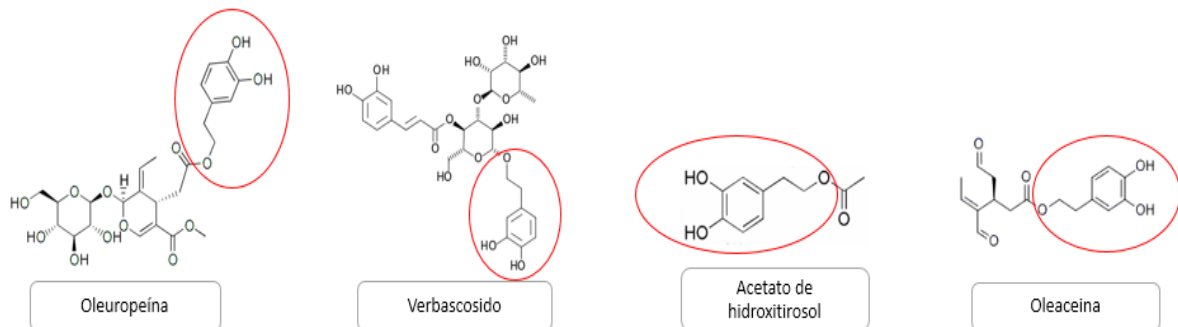


**Figura 4.** Estructura del hidroxitirosol. Extraída de (Tsao, R., 2010) <sup>9</sup>.

En el proceso de elaboración del aceite, el porcentaje mayor de compuestos fenólicos, debido a su carácter polar, quedan formando parte de los residuos acuosos, orujo, alpechín o aguas de lavado. Es por este motivo por lo que dichos residuos, ricos en compuestos fenólicos, podrían constituir una fuente natural de HT muy importante <sup>16</sup>. Por otro lado, debido a su carácter anfipático, otra parte del HT perdura en el aceite de oliva. Su peso molecular es de 154.16 g/mol y su punto de fusión es de 55°C. Es bastante soluble en agua y en disolventes orgánicos polares tales como los alcoholes de bajo peso molecular <sup>9</sup>.

La variedad de aceituna, su procedencia, el grado de maduración de la misma, el proceso de extracción utilizado, etc., son factores que influyen en la concentración de HT. De ese modo, en los aceites de oliva vírgenes españoles, podemos encontrar un contenido de HT que oscila entre 113.7 y 381.2 mg/Kg <sup>17</sup>. Otra fuente natural con gran concentración de HT y oleuropeina, es la hoja del olivo <sup>18</sup>, cuyo extracto es comercializado actualmente como suplemento nutricional.

El HT del aceite de oliva se encuentra en forma libre, en forma de acetato o formando parte de compuestos complejos como la oleaceina, oleuropeína y verbascosido (Figura 5).



**Figura 5.** Estructura de los 4 compuestos de los que forma parte el hidroxitirosol (rodeados con círculo rojo).

#### 1.4. PROPIEDADES BIOACTIVAS DEL HIDROXITIROSOL

##### 1.4.1. Propiedades antioxidantes

Como propiedades antioxidantes del HT podemos encontrar; la eliminación de radicales libres, la ruptura de las reacciones en cadena peroxidativas, la inhibición de los radicales libres derivados del ácido hipocloroso, la prevención de la peroxidación lipídica, etc., <sup>19</sup>. La capacidad donadora de electrones de los grupos hidroxilo en posición orto así como la posterior formación de enlaces de hidrógenos intramoleculares estables con el radical fenoxilico <sup>20,21</sup>, se puede atribuir al efecto antioxidante del HT. También se han descrito disminuciones en la producción de ROS, y una importante atenuación del daño del ADN de OPP <sup>22</sup>.

Estos hallazgos demuestran que el HT regula positivamente el sistema de defensa antioxidante en los VEC, proporcionando una base molecular para la prevención de enfermedades cardiovasculares.

#### 1.4.2. Bioactividad anticancerígena

El cáncer, a día de hoy, es una de las enfermedades más letales que existe. Según investigaciones se ha demostrado que, consumir aceite de oliva virgen extra, podría estar relacionado con la reducción del riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer, hecho que ha sido avalado por varios estudios epidemiológicos en seres humanos <sup>23</sup>.

Las actividades antioxidantes, antiproliferativas, proapoptóticas y antiinflamatorias del HT dietético han generado un gran interés ya que, estas actividades, pueden contrarrestar todas las características del cáncer. Es por este motivo por lo que el HT, además de las capacidades antioxidantes y antiinflamatorias que presenta, desempeña también efectos anticancerígenos mediante la activación de vías de señalización molecular, hecho que da lugar a la apoptosis celular y a la detención del crecimiento en varias líneas de células tumorales <sup>24</sup>.

Se han reportado también efectos antitumorales de los derivados del olivo para órganos del cuerpo como páncreas, cavidad oral, esófago, colon-recto, próstata y pulmón <sup>25</sup>. En estos estudios se ha demostrado que el HT, bien sea por la protección del ADN ante el daño provocado por los radicales libres, o por su efecto antiproliferativo demostrado in vitro a través de la inducción de apoptosis, puede ser un compuesto de gran ayuda en la lucha contra el cáncer.

#### 1.4.3. Propiedades anti-inflamatorias

El HT ha sido descrito como el compuesto antiinflamatorio más potente entre los polifenoles del aceite de oliva. Produce aductos arilantes/alquilantes en residuos de cisteína NF-kB, bloqueando la transcripción de las enzimas COX-2 y 5-lipooxigenasa, y reduciendo la síntesis de prostaglandina E2 y la influencia crónica asociada a enfermedades como el cáncer <sup>26</sup>.

También se ha observado en ratas, con un modelo de osteoporosis posmenopáusica y senilidad por deficiencia de estrógenos <sup>27</sup>, que el hidroxitirosol puede reducir el

grado de inflamación de estas patologías dando lugar a la prevención de osteopenia por el aumento de la formación ósea. Así como efectos beneficiosos encontrados en pacientes con enfermedad coronaria estabilizada <sup>28</sup>.

#### 1.4.4. Protección cardiovascular

Muchos estudios han demostrado la importancia de los polifenoles dietéticos naturales en la promoción de la salud cardiovascular <sup>17</sup>. Existen dos compuestos aislados, la oleuropeína y el hidroxitirosol, que han recibido especial atención debido a su efectividad sobre el riesgo cardiovascular y a su gran capacidad para reducir la presión arterial y optimizar el perfil lipídico <sup>29,30</sup>.

Se ha confirmado, mediante diferentes estudios, el efecto protector del HT sobre la oxidación de las lipoproteínas LDL, que sugiere una modulación de la aterosclerosis implicada en las enfermedades cardiovasculares <sup>31-33</sup>.

Además, el HT, puede considerarse antitrombótico ya que reduce significativamente la agregación plaquetaria, proceso implicado en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas, paso previo a la formación de trombos <sup>34</sup>.

En cuanto a los efectos cardioprotectores directos del HT <sup>35</sup>, informaron que el HT atenúa la toxicidad cardíaca crónica asociada con DXR en ratas con cáncer de mama mejorando la disfunción mitocondrial.

#### 1.4.5. Actividad antidiabetogénica

Las propiedades sobre la prevención de la diabetes con productos y derivados del olivo, se han utilizado en la medicina popular durante muchos años.

Los efectos del HT sobre la acción de la insulina han sido recientemente demostrados en hombres de mediana edad con sobrepeso <sup>36</sup>. Los suplementos de compuestos fenólicos de hoja de olivo con 51,1 mg de oleuropeína y 9,7 mg de HT por día, administrados durante 12 semanas, mejoraron la regulación de la acción y la

secreción de la insulina por parte de la glucosa. En personas con riesgo de desarrollo del síndrome metabólico <sup>36</sup>, se consiguió una mejora significativa tanto en la sensibilidad a la insulina, como en la capacidad secretora de las células  $\beta$  pancreáticas.

Es cuando el HT se utiliza como agente terapéutico, principalmente como fármaco antidiabético e hipocolesterolémico en aplicaciones biotecnológicas <sup>37</sup>, cuando estas propiedades se consideran más valiosas.

#### 1.4.6. Actividad antimicrobiana

Distintas investigaciones han reportado que el AO y los extractos de hoja de olivo actúan como agentes antimicrobianos con actividad frente a *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Kluyveromyces marxianus*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus mutans*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica* y otras <sup>38</sup>. Además, se ha verificado *in vitro* que el HT también presenta propiedades antimicrobianas contra agentes infecciosos de las vías respiratorias y gastrointestinales como *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* o *Moraxella catarrhalis*, a bajas concentraciones inhibitorias.

También, se han realizado algunos estudios sobre el efecto del HT en el SIDA. Se ha observado que el extracto de hoja de olivo que contiene HT inhibe la infección aguda y la transmisión de célula a célula del VIH-1 entre células MT2 no infectadas cocultivadas con linfocitos T H9 infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) en un estudio dependiente de la dosis <sup>39</sup>. Además, este extracto también inhibe la replicación del VIH-1 según lo analizado por la expresión de p24 en células H9 infectadas.

#### 1.4.7. Otras Bioactividades

Efecto sobre las vías celulares implicadas en la longevidad. Se demostró, en experimentos con corazones de rata, que el HT aumenta la expresión de varias proteínas de longevidad, previene la muerte celular y reduce el tamaño del tejido infartado después de la isquemia <sup>40</sup>. Después de la administración de hidroxitirosol durante 14 días y la evaluación de los niveles de expresión de varias proteínas SirT (SirT-1, SirT-3 y SirT-4) se demostró que el hidroxitirosol puede aumentar la expresión de longevidad SirT y reducir potencialmente los efectos fisiopatológicos nocivos del infarto de miocardio mediante la reducción del tamaño del infarto y la prevención de la muerte celular.

Actividad neuroprotectora. El aceite de oliva ha sido indicado como un ingrediente importante para contrarrestar enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson. La ingesta dietética de HT puede tener efectos beneficiosos sobre la neuroprotección.

## **2. JUSTIFICACIÓN y OBJETIVOS**

Actualmente, el hidroxitirosol (HT) es un compuesto natural con importantes propiedades biológicas que podrían sugerir su uso como ingrediente funcional. Se ha visto que el HT es un polifenol con una elevada capacidad antioxidante, que posee propiedades beneficiosas y protectoras frente a distintas enfermedades entre las que se destacan enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, neurodegenerativas, bacterianas y cancerígenas. En este sentido, distintos estudios han demostrado que el HT, bien sea por la protección del ADN ante el daño provocado por los radicales libres, o por su efecto antiproliferativo demostrado in vitro a través de la inducción de apoptosis, puede ser un compuesto de gran ayuda en la lucha contra el cáncer. El efecto de este polifenol ha sido ampliamente estudiado en hepatoma, cáncer de colon, pulmón, neoplasias hematológicas, etc., sin embargo, en la literatura existen menos trabajos que lo relacionan con el melanoma. El objetivo principal del presente trabajo es el recopilar mediante una búsqueda bibliográfica los estudios científicos relacionados con las propiedades bioactivas del efecto anticancerígeno del hidroxitirosol, polifenol natural en el cáncer de tipo melanoma.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

En primer lugar, para desarrollar este trabajo de revisión, se fijaron cuáles eran los conceptos clave relacionados con la materia de estudio, quedando la lista reducida a: cancer, melanoma, natural polyphenols, hydroxytyrosol, olive oil.

Con estos términos, se acotó el escenario de búsqueda en las plataformas electrónicas más comúnmente conocidas, Web Of Science (WOS), Scopus y Google scholar academic, las cuales sirvieron para encontrar los resultados bibliográficos pertinentes. La búsqueda y el tratamiento de la información bibliográfica se ha llevado a cabo con la ayuda del software Mendeley.

A continuación, se concluyó la búsqueda de información aplicando nuevos filtros en los motores de búsqueda que consistía en introducir un intervalo de tiempo que abarcaba desde el año 1995 hasta la actualidad, asegurando así que el material bibliográfico empleado fuese lo más actual posible, pero a la vez abarcando estudios anteriores de utilidad y definiendo el orden de la lista resultante de la búsqueda por su importancia. Asimismo, se han incluido los artículos que estudiaban el hidroxitirosol y su capacidad anticancerígena en melanoma.

Esta gran cantidad de literatura fue seleccionada manualmente e individualmente de acuerdo con la relevancia del tema. La atención se centró en los nuevos conocimientos sobre las actividades biológicas del hidroxitirosol, principalmente en melanoma. La bibliografía anterior al año 2010 se seleccionó cuidadosamente y se introdujo cuando fue necesario para el tema.

Los trabajos seleccionados se utilizaron para elaborar la presente memoria.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los últimos años han aumentado en gran medida las evidencias en torno a las propiedades beneficiosas del hidroxitirosol (HT) como uno de los componentes fundamentales del aceite de oliva <sup>41</sup>. Entre ellas, su capacidad anticancerígena ha sido destacada en un número importante de artículos diferentes, vinculándolo no sólo a su potencial para combatir el estrés oxidativo, sino también a su capacidad de inhibición de la proliferación de células tumorales o de su capacidad antimetastásica o antiangiogénica <sup>42</sup>.

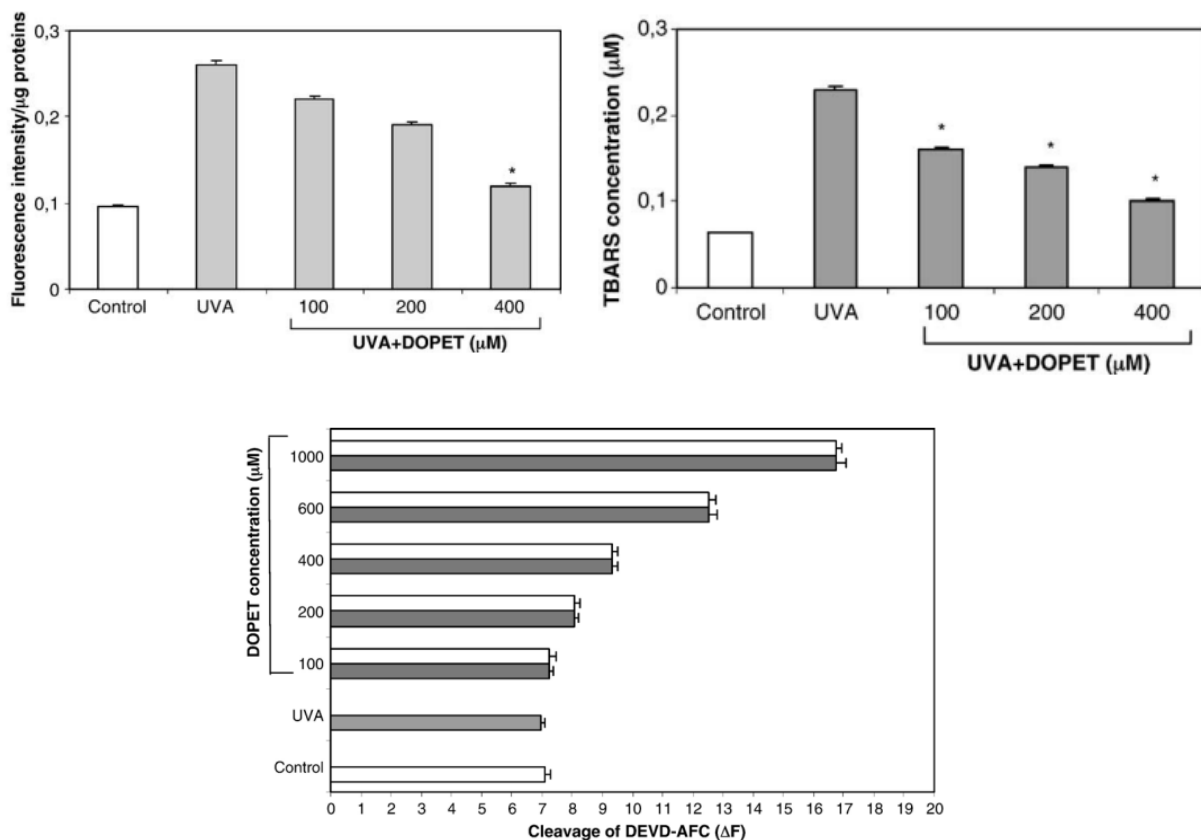
En este contexto, el objetivo principal de este trabajo de revisión se ha basado en determinar la capacidad antitumoral de este compuesto en melanoma, evaluando tanto su efecto antiproliferativo, como su posible relación con la inhibición de la migración celular y la regulación de la expresión de factores angiogénicos y pro-apoptóticos. De hecho, la actividad prooxidante del HT mediada por el peróxido de hidrógeno, posiblemente sea debida al proceso de autooxidación, que es el mecanismo anticancerígeno más común del HT <sup>43</sup>.

Son numerosos los estudios que se han centrado en estudiar el efecto antioxidante del HT, de hecho, es la propiedad más estudiada de este polifenol. No obstante, son menos los dedicados al estudio de sus propiedades anticancerígenas, y los que los hacen los relacionan con su capacidad secuestradora de radicales libres. Los estudios descritos sugieren que el efecto antitumoral del HT y estudios epidemiológicos han demostrado que el HT, presente en el aceite de oliva, puede tener efectos protectores contra múltiples tipos de cáncer como el de páncreas, cavidad oral, esófago, colon, próstata o pulmón <sup>17</sup>.

A continuación, se presentan los resultados y discusión de los trabajos centrados en el estudio del efecto anticancerígeno de este polifenol en melanoma.

Es bien conocido por diversos estudios que la radiación ultravioleta de onda larga (UVA) induce graves daños en la piel y por tanto diversos tipos de cáncer en la misma, mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el agotamiento de los sistemas antioxidantes endógenos. Es por ello por lo que resulta

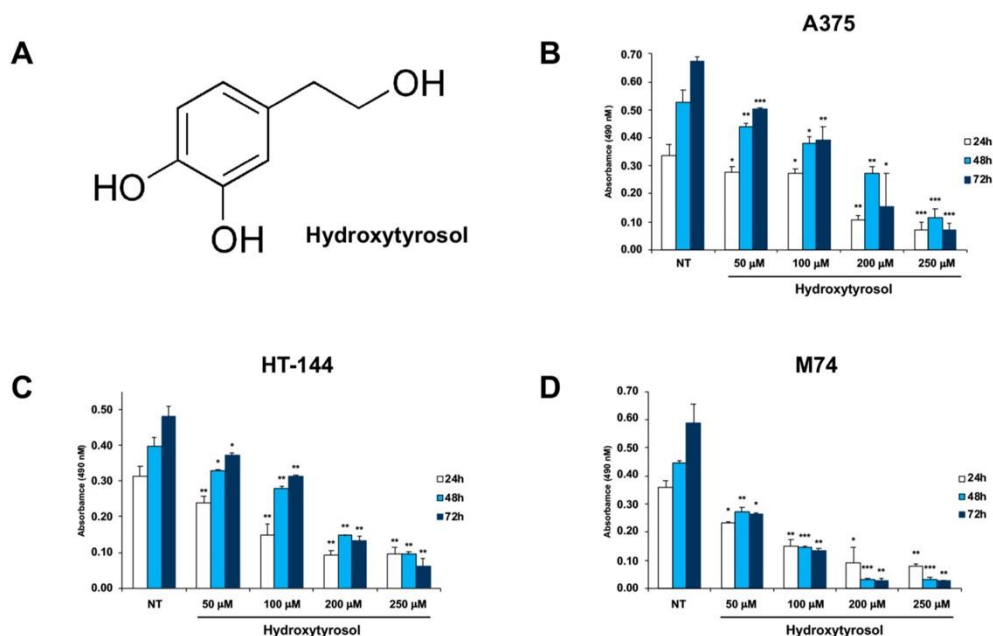
interesante estudiar compuestos naturales con potencial bioactivo que puedan paliar los efectos nocivos de los rayos UVA. Estudios realizados por D'Angelo y col. (2005) investigaron los efectos del HT sobre el daño celular inducidos por rayos UVA, utilizando células de melanoma humano (M14) <sup>41</sup>. En este estudio, se vio que en las células M14 irradiadas con rayos UVA, existía un efecto protector del HT en los principales marcadores de estrés oxidativo, como el TBARS y la intensidad de fluorescencia de la 2V7V-diclorofluoresceína (DCF) (Figura 6). Se demostró que estos efectos protectores dependían de la dosis de HT empleada, alcanzando el máximo a 400 AM de DOPET. A concentraciones más altas, el HT produjo una detención de la proliferación de las células M14 y actuando como estímulo proapoptótico al activar la actividad de la caspasa-3.



**Figura 6.** Efecto del HT en la producción intracelular de ROS (izquierda) y niveles de TBARS (derecha) y inducida por UVA en células de melanoma M14. Medida de la proteólisis de z-DEVD-AFC catalizada por el extracto de células M14 (abajo). Extraída de (D'Angelo y col., 2005) <sup>41</sup>.

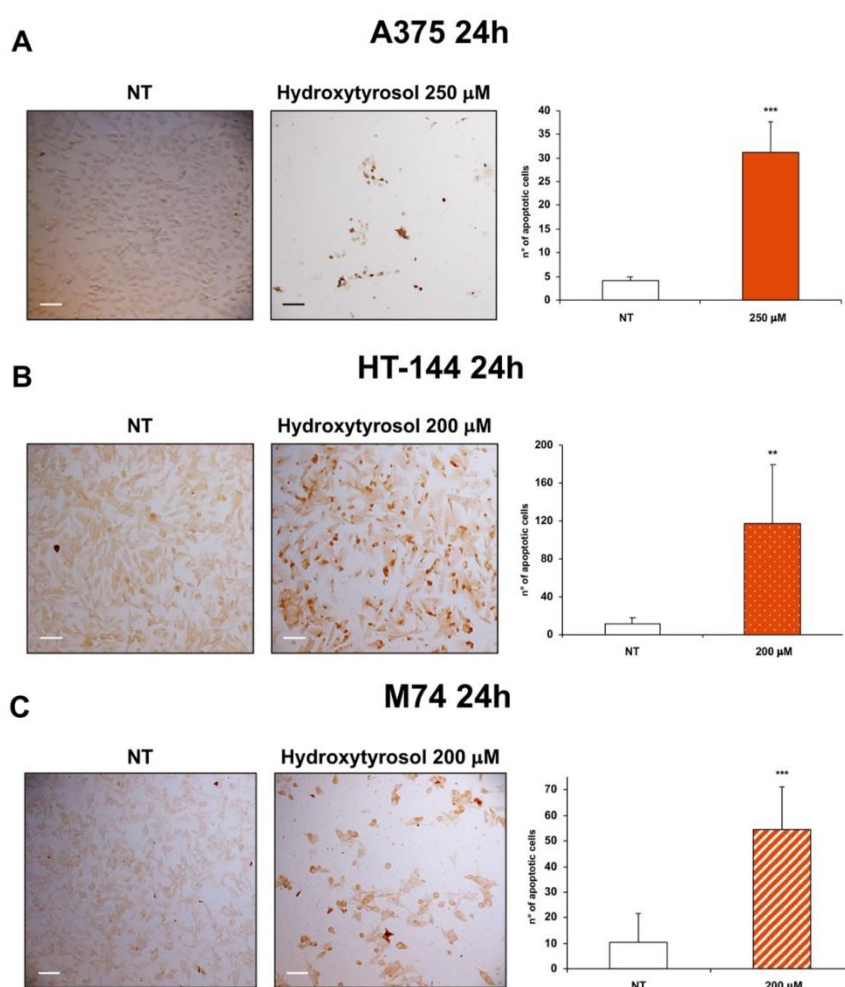
Uno de los estudios más completos y actuales en el que se estudia el efecto anticancerígeno del HT en melanoma es el realizado por Costantini y col. (2020)<sup>42</sup>. En este estudio se ha analizado el potencial antiproliferativo y proapoptótico del HT mediante el ensayo MTS, DeadEnd™, el ensayo colorimétrico TUNEL, la unión de anexina V y la captación de ioduro de propidio (IP), Western blot, análisis de ROS y ensayo de colonias en tres líneas celulares de cáncer de melanoma metastásico (A375, HT-144 y M74). Todos ellos demostraron que el tratamiento con HT reduce notablemente la viabilidad celular que induce la muerte por apoptosis de estas células del melanoma.

El estudio de citotoxicidad del HT se estudió en las células de melanoma humano A375, HT-144 y M74 las cuales fueron tratadas durante 24 h, 48 h y 72 h con HT y con concentraciones crecientes que van desde 50µM a 250 µM. Los resultados obtenidos por estos autores demostraron que el tratamiento con HT induce una disminución de la viabilidad celular dependiente de la dosis y del tiempo en las células A375, HT-144 y M74 (Figura 7), en comparación con células no tratadas (NT)<sup>42</sup>.



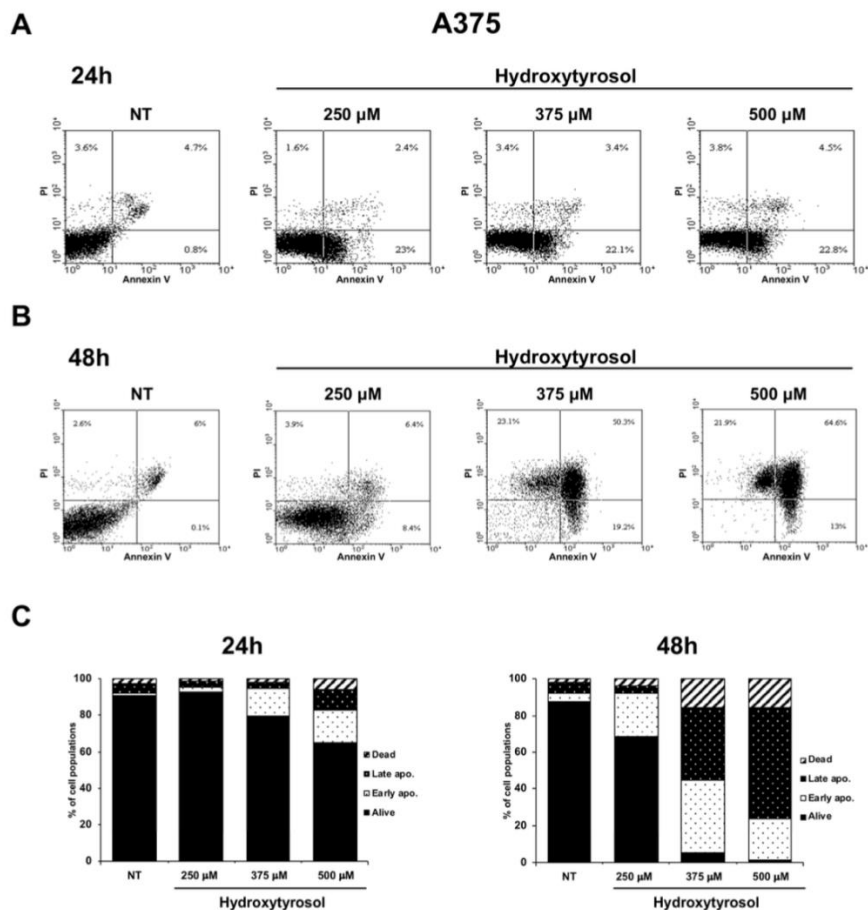
**Figura 7.** Ensayo MTS de células de melanoma tratadas con HT. (A) Las células de melanoma A375 (B), HT-144 (C) y M74 (D) fueron tratadas con 50µM, 100µM, 200µM y 250µM de hidroxitirosol durante 24, 48 y 72 horas. Extraída de (Costantini y col., 2020)<sup>42</sup>.

En estas mismas células, los autores estudiaron más a fondo los efectos del HT<sup>42</sup>. Así, se realizó un estudio de la fragmentación del ADN, sello distintivo de la apoptosis, en células de melanoma tratadas y no tratadas mediante el ensayo de etiquetado de Nick-end dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL). La tinción TUNEL de células A375 tratadas con 250  $\mu\text{M}$  de HT y de células de melanoma HT-144 y M74 tratadas con 200  $\mu\text{M}$  de HT durante 24 h, mostraron una cantidad notablemente mayor de fragmentación del ADN en comparación con las células no tratadas (Figura 8).

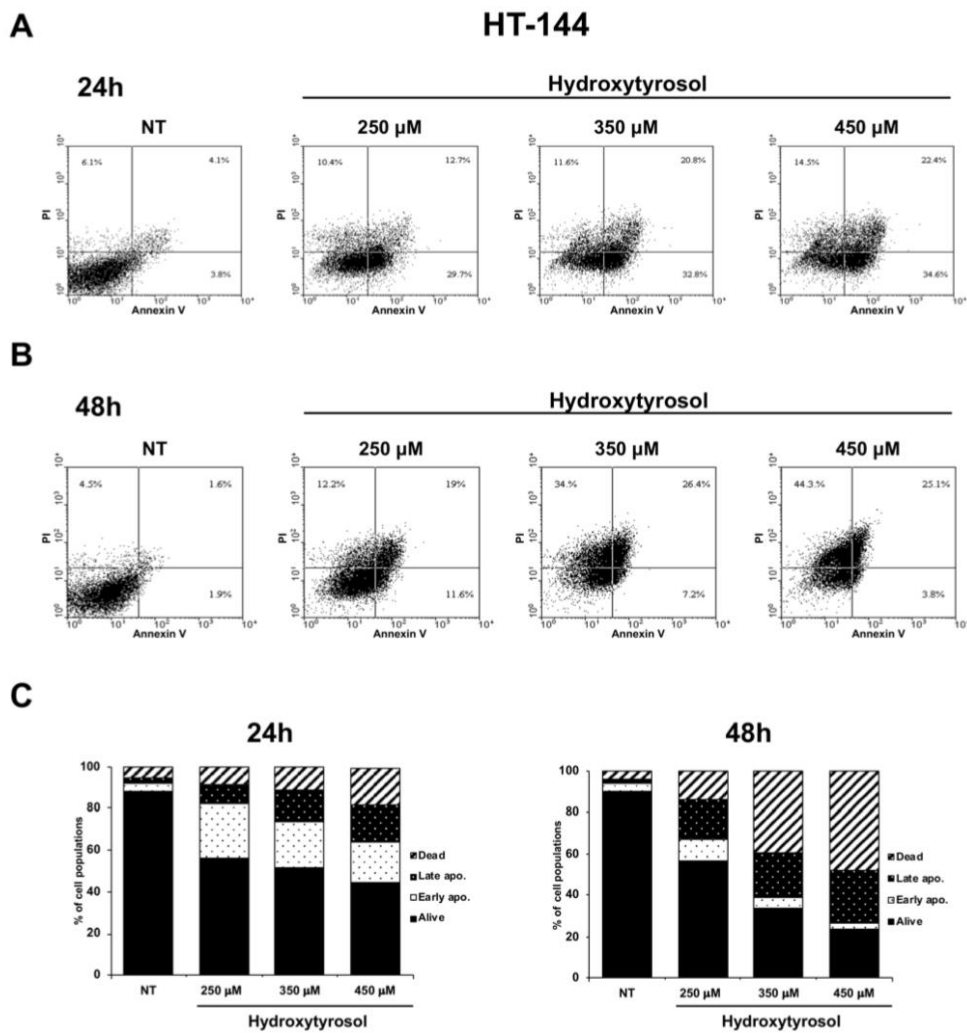


**Figura 8.** Análisis TUNEL de células de melanoma tratadas con hidroxitirosol. Análisis TUNEL de células de melanoma tratadas con hidroxitirosol. Las células A375 (A) se trataron con 250 $\mu\text{M}$  de hidroxitirosol, las células HT-144 (B) y M74 (C) se trataron con 200 $\mu\text{M}$  de hidroxitirosol durante 24 h. Extraída de (Costantini y col., 2020) <sup>42</sup>.

La apoptosis es una forma de muerte celular programada cuya desregulación subyace en procesos fisiológicos, pero también patológicos, incluida la tumorigénesis <sup>44</sup>. Por lo tanto, para demostrar la muerte apoptótica inducida por HT en células de melanoma, se trataron a las células A375 con 250  $\mu$ M, 375  $\mu$ M, y 500  $\mu$ M, y a las células M y HT-144, con 250  $\mu$ M, 350  $\mu$ M, y 450  $\mu$ M de HT durante 24 h y 48 h. La evaluación diferencial de apoptosis de células de melanoma tratadas y no tratadas se analizó mediante tinción con anexina V-FITC/PI junto con citometría de flujo, siendo el resultado de este experimento un aumento significativo de células apoptóticas A375 y HT-144, después del tratamiento con hidroxitirosol durante este periodo de tiempo (Figura 9).



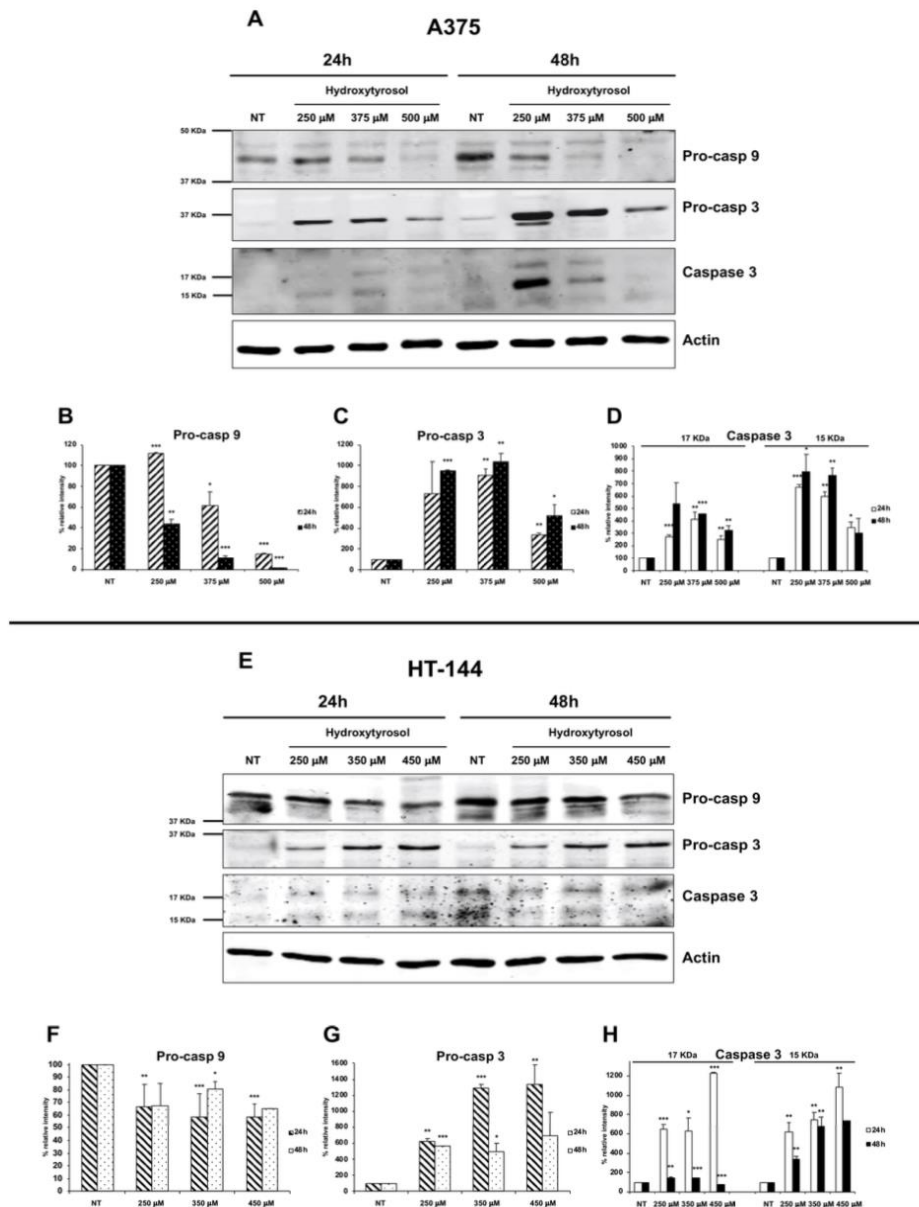
**Figura 9.** Análisis de citometría de flujo de las células de melanoma A375 tratadas con hidroxitirosol. Las células A375 no tratadas (NT) o tratadas durante 24 h (A) y 48 h (B) con 250 $\mu$ M, 375 $\mu$ M y 500 $\mu$ M de hidroxitirosol se analizaron mediante tinción de anexina V-FITC/PI por citometría de flujo. Extraída de (Costantini y col., 2020) <sup>42</sup>.



**Figura 10.** Análisis de citometría de flujo de las células de melanoma HT-144 tratadas con hidroxitirosol. Las células HT-144 no tratadas (NT) o tratadas durante 24 h (A) y 48 h (B) con 250 $\mu$ M, 350 $\mu$ M y 450 $\mu$ M de hidroxitirosol se analizaron mediante tinción con anexina V-FITC/PI, a través de citometría de flujo. Extraída de (Costantini y col., 2020) <sup>42</sup>.

En este mismo estudio, se demostró también Western Blot, una disminución de la pro-caspasa 9, pro-caspasa 3 y caspasa 3 tanto en células A375 como en HT-144 tratadas con HT (Figura 11) en comparación con las células no tratadas (NT) <sup>42</sup>.

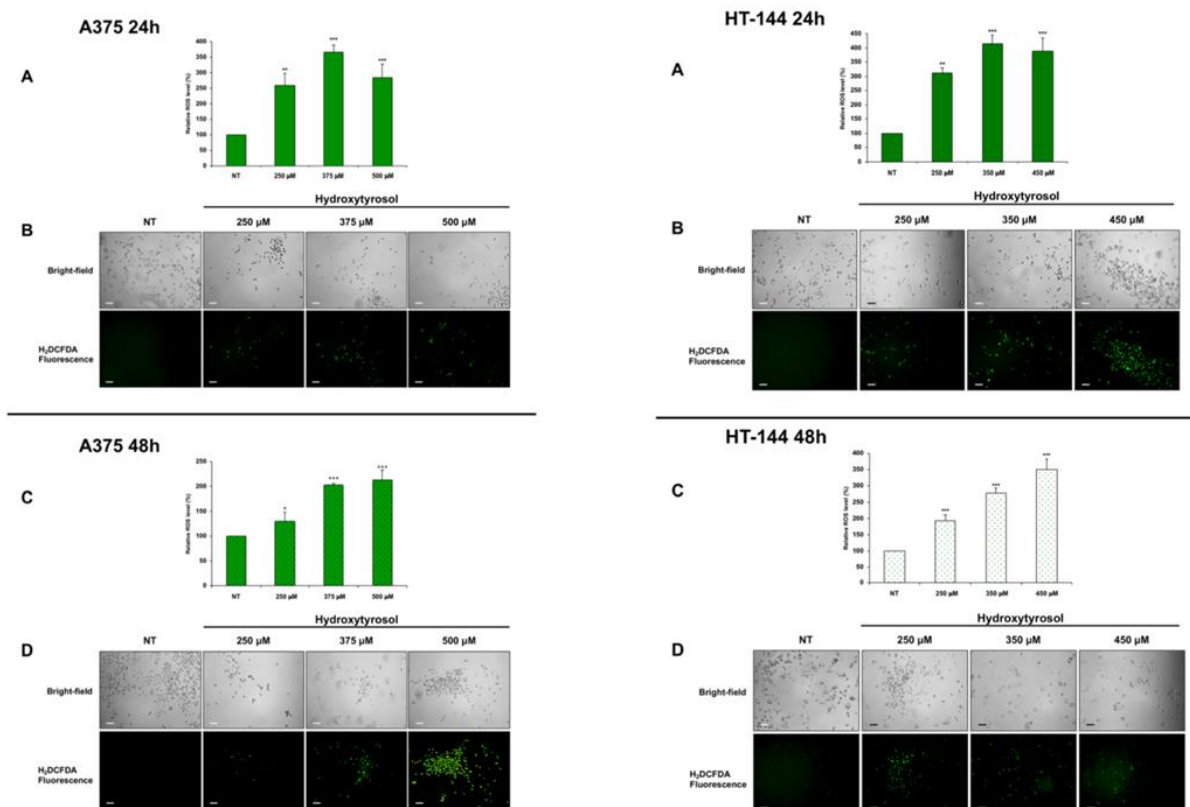
La activación de proteínas pro-apoptóticas como p53, caspasa-9 y caspasa-3, y la regulación a la baja de proteínas de supervivencia como PARP-1 y AKT, así como el aumento de la expresión de la proteína y H2AX, sugiere que el tratamiento con HT induce la muerte por apoptosis a través de la activación de la vía apoptótica intrínseca en células de melanoma.



**Figura 11.** Expresión de procaspasa-9, procaspasa-3 y caspasa-3 en células A375 y HT-144 de melanoma tratadas con HT. Extraída de (Costantini y col., 2020) <sup>42</sup>.

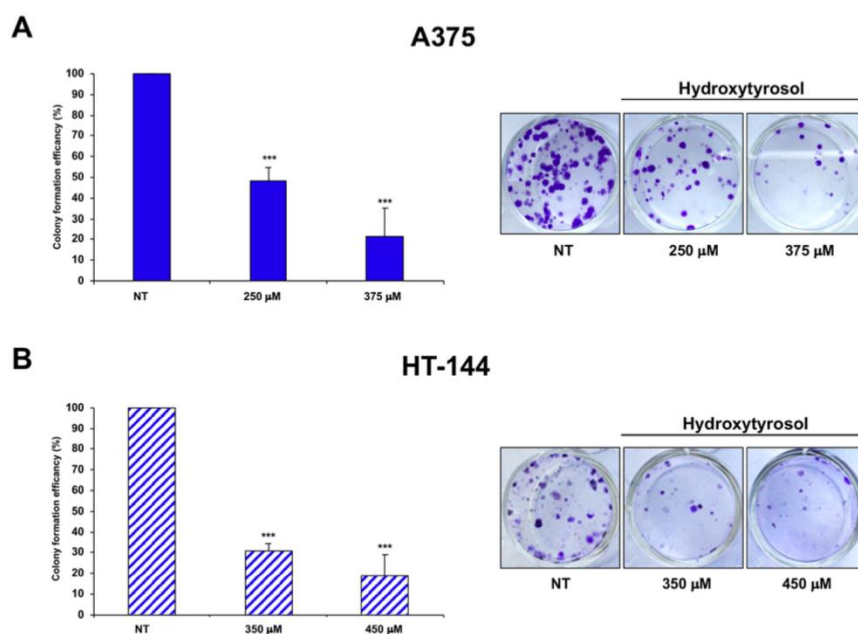
Para verificar si el HT ejerce sus efectos citotóxicos en las células de melanoma través de la producción de especies reactivas de oxígeno, se analizó la cantidad de ROS intracelular en células no tratadas y en células A375 tratadas con 250  $\mu\text{M}$ , 375  $\mu\text{M}$ , y 500  $\mu\text{M}$  de HT (Figura 12, izquierda), así como en células HT-144 tratadas con 250  $\mu\text{M}$ , 350  $\mu\text{M}$ , y 450  $\mu\text{M}$  de HT durante 24 h y 48 h (Figura 12, derecha).

Los resultados demostraron que la cantidad de ROS intracelular después de 24 h alcanza el máximo en las células A375 tratadas con 375  $\mu\text{M}$  de HT (Figura 12AB, izquierda) y en células HT-144 tratadas con 350  $\mu\text{M}$  de HT (Figura 12AB, derecha), en comparación con las células no tratadas. Por lo tanto, el aumento de ROS intracelular en células de melanoma A375 y HT-144, tratadas con HT sugiere que las funciones citotóxicas del HT están moduladas por la producción de ROS que podría estar involucrado en el daño del ADN y la apoptosis inducidos por hidroxitirosol.



**Figura 12.** Cantidad de ROS en células A375 (izquierda) y HT-144 (derecha) tratadas con HT durante 24 y 48h. Extraída de (Costantini y col., 2020) <sup>42</sup>.

Por último, se analizó la capacidad de formar colonias de células A375 tratadas durante 24 h con 250  $\mu\text{M}$  y 375  $\mu\text{M}$  de HT, y de células HT-144 tratadas durante 24 h con 350  $\mu\text{M}$  y 450  $\mu\text{M}$  de HT (Figura 13). Se demostró que el tratamiento con HT inhibe la capacidad de las células de melanoma para formar colonias celulares en comparación con las células no tratadas (Figura 13A). Por lo tanto, el resultado muestra que el tratamiento de células de melanoma con HT reduce la viabilidad celular y la tasa de supervivencia de las células de melanoma.



**Figura 13.** Ensayo de colonias celulares de células de melanoma tratadas con hidroxitirosol. Las células A375 (A) se trataron con 250  $\mu\text{M}$  y 375  $\mu\text{M}$  de hidroxitirosol y las células HT-144 (B) se trataron con 350  $\mu\text{M}$  y 450  $\mu\text{M}$  de hidroxitirosol durante 24 h. En (A, B), paneles de la derecha, se informa fotografía de campo claro de colonias de células A375 (A) y HT-144 (B) tratadas y no tratadas. Extraída de (Costantini y col., 2020) <sup>42</sup>.

Estudios realizados por Ruzzolini y col. (2018) <sup>5</sup> han revelado que un análogo estructural al HT, la oleuropeína (OLE)) de las hojas de *Olea europaea* podría potenciar la citotoxicidad de los fármacos convencionales utilizados para tratar el melanoma, revelando una estrategia terapéutica potencialmente nueva. En este trabajo se estudió la capacidad citotóxica de la OLE sola o en combinación con quimioterapéuticos en células de melanoma humano A375. Los resultados que

encontraron fueron que la OLE era capaz, a una dosis de 500  $\mu\text{M}$ , de estimular la apoptosis, mientras que a una dosis no tóxica de 250  $\mu\text{M}$ , afectaba a la proliferación celular e indujo la desregulación de la vía pAKT/pS6. Una dosis de 250  $\mu\text{M}$  de OLE no potenció el efecto del quimioterapéutico del Vemurafenib (PLX4032), pero consiguió aumentar el efecto citotóxico de la Dacarbazina (DTIC). El mayor efecto se encontró cuando se combinaba OLE y Everolimus (RAD001), también en células de melanoma BRAF resistentes a PLX4032, que posiblemente cooperan en la inhibición de la vía pAKT/pS6 de la vía pAKT/pS6. Las conclusiones de este estudio fueron que la OLE representa un producto natural capaz de potenciar una amplia gama de quimioterapéuticos contra las células de melanoma BRAF que afectan a la vía pAKT/pS6 <sup>5</sup>.

El tratamiento del cáncer se ha desplazado hacia tratamientos de terapias complementarias para mejorar la supervivencia, superar o retrasar el desarrollo de resistencia de medicamentos y reducir la incidencia de efectos secundarios. Esto es de especial importancia en el tratamiento del melanoma, especialmente en su forma metastásica avanzada, a menudo resistente a la mayoría de los fármacos actuales.

Durante este trabajo de revisión se ha resaltado como el HT es capaz de inducir la apoptosis en células de melanoma humano, si bien, en el artículo publicado por la revista *“Nutrientes”* el 08 de diciembre de 2018 bajo el título *“Oleuropein, the Main Polyphenol of Olea europaea Leaf Extract, Has an Anti-Cancer Effect on Human BRAF Melanoma Cells and Potentiates the Cytotoxicity of Current Chemotherapies”* se demuestra por primera vez como el tratamiento con OLE representa un nuevo agente anticancerígeno no tóxico contra las células de melanoma BRAF como protector adecuado de dos agentes principales utilizados en células de melanoma resistentes a BRAF, como RAD001 y DTIC <sup>5</sup>. Hasta ahora, sólo un estudio informó del efecto de reversión de OLE sobre la resistencia inducida por quimioterapia <sup>45</sup>. Estos hallazgos abren la posibilidad de usar OLE como molécula terapéutica para mejorar los efectos anticancerígenos de los quimioterapéuticos actuales, debido a su baja toxicidad en las células normales <sup>46–48</sup>. En este estudio se demuestra que OLE está presente en el citoplasma de las células A375 después de solo 15 minutos de incubación, lo que sugiere una absorción rápida de OLE dentro de las células,

posiblemente debido a su mayor nivel de glucotransportadores (GLUT). Este aspecto es muy importante puesto que abre una posibilidad al pensar en el uso de una aplicación tópica de OLE directamente en células tumorales. Tampoco se excluye la posibilidad de que OLE pudiese ingresar en las celdas utilizando otras rutas.

Curiosamente, en muy poco tiempo (48h), OLE indujo la muerte de células de melanoma confirmada por una mejora de los marcadores de apoptosis. OLE afectó la viabilidad de las células de melanoma, posiblemente a través de la inhibición de la fosforilación de AKT y la vía S6. De ese modo, y ya que OLE bloquea la vía de AKT, se estudió también su actuación como cooperación de tratamientos de quimioterapia actuales permitiendo una disminución de la dosis que a menudo conduce a toxicidad y a efectos secundarios graves. Y se encontró que OLE potencia el efecto citotóxico de Dacarbacina (DTIC), reduciendo la dosis efectiva en un 50%; esto podría estar relacionado con una mayor reducción en la fosforilación de AKT. En experimentos paralelos, OLE también potenció un inhibidor de mTOR, como RAD001, que se encuentra en células de melanoma resistentes a PLX4032, reduciendo la dosis efectiva de RAD001 en un 50%.

Por lo tanto, OLE, al afectar la vía PI3K/AKT/mTOR, podría representar un nuevo agente no tóxico de interés en el tratamiento del melanoma avanzado <sup>49,50</sup>. Además de inhibir la angiogénesis tumoral y el crecimiento tumoral *in vivo*, como se demostró en los estudios de Song y col.<sup>51</sup> y Samara y col.<sup>52</sup>

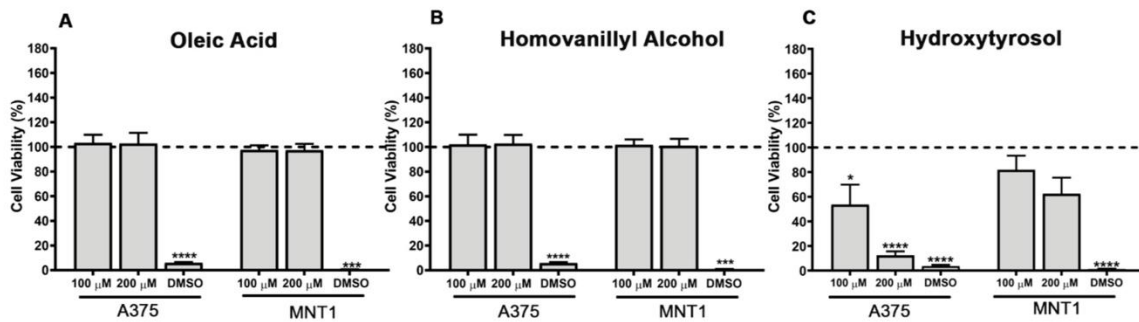
Aunque los estudios *in vitro* son muy prometedores, no tiene en cuenta el metabolismo y la biodisponibilidad del OLE, ya que las concentraciones *in vitro*<sup>53-57</sup>, podrían parecer mucho mayores que las que podrían lograrse de manera realista en modelos *in vivo* dado que, en la clínica, la mayoría de los agentes se administran repetidamente, lo que puede conducir a la acumulación <sup>58</sup>. La conclusión de este estudio fue que pese a que los limitados estudios en animales *in vivo*, resumidos en dos revisiones recientes <sup>59,60</sup>, y la escasez de estudios en humanos, particularmente en ensayos clínicos controlados aleatorios, sigue siendo el principal inconveniente, OLE, y más aún los extractos de hoja de olivo enriquecidos con la presencia de otros

polifenoles como es el HT, presentan un potencial prometedor como adyuvante en las terapias anticancerígenas convencionales. Además, pueden revertir la resistencia a los medicamentos de las células cancerosas a la quimioterapia y reducir los efectos adversos de las terapias convencionales en las células no diana.

La toxicidad del HT también se ha puesto en entredicho, en este sentido, diferentes estudios han demostrado que el HT no es tóxico. En 2001, D'Angelo S., y col. <sup>61</sup>, llevó a cabo por primera vez un ensayo de toxicidad aguda con HT en animales de experimentación. Sus resultados revelaron que una dosis única de 2 g/kg de peso corporal no producía ningún efecto. En 2013, Auñón-Calles D., y col. (2001) <sup>62</sup>, evaluó la toxicidad del HT puro administrado en ratas de manera oral durante 13 semanas. Tras este periodo no se observaron efectos adversos relevantes y propuso un NOAEL (No Observed Adverse Effects Level) de 500 mg/kg/día. Otro estudio realizado por Auñón-Calles D., y col. (2013) <sup>63</sup>, demostró que el HT no presenta efectos genotóxicos ni mutagénicos a elevadas concentraciones.

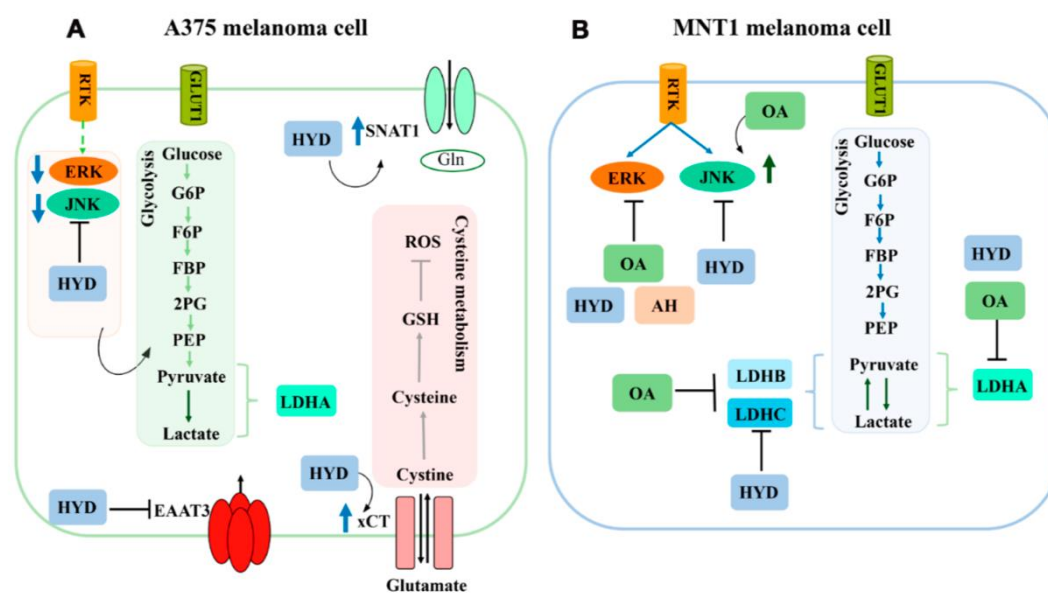
Otro estudio realizado por Brito, C. y col. (2021) <sup>64</sup> demostró las propiedades anticancerígenas de los compuestos del aceite de oliva, ácido oleico, alcohol homovanilílico y HT en las células de melanoma. En este trabajo, se estudió la viabilidad metabólica a las 48 h después del tratamiento en dos líneas celulares de melanoma con mutaciones BRAF (A375 y MNT1), la expresión de genes metabólicos fue evaluada por qPCR y por western blotting la activación de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). El tratamiento con HT (100 y 200µM), redujo de manera muy significativa la viabilidad de las células A375, más compatible con un perfil glucolítico predominante, y produjo la activación de la quinasa N-terminal c-Jun (JNK). Por el contrario, el HT no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad de las células MNT1, pero hubo una tendencia a la reducción de la viabilidad cuando estas células fueron tratadas con una mayor concentración de hidroxitirosol (200µM) (Figura 14), demostrando un metabolismo oxidativo mejorado y una activación de la quinasa ERK. Este compuesto dio lugar a la desintoxicación celular y al uso de fuentes de energía alternativas en las células A375, inhibiendo las vías JNK y ERK. Por el contrario, pese a que el ácido oleico y el alcohol homovanilílico no

demonstraron ningún efecto sobre la viabilidad de las células de melanoma, influyeron en la tasa glucolítica de MNT1 y en los mecanismos de desintoxicación de A375.



**Figura 14.** Efectos de **(A)** Ácido oleico, **(B)** alcohol homovanilílico, y **(C)** tratamiento con hidroxitirosol a concentraciones de 100μM y 200μM sobre la viabilidad metabólica de las células A375 y MNT1, 48 h después de la incubación. La viabilidad celular de las células de control no tratadas está representada por la línea discontinua al 100%. Las células tratadas con sulfóxido de dimetilo al 5% (DMSO) se usaron como control positivo de la viabilidad celular. Extraída de (Brito y col., 2021) <sup>64</sup>.

Teniendo en cuenta las diferencias inducidas por el tratamiento con HT en la viabilidad de los dos modelos celulares de melanoma que se analizaron en el estudio de Brito, C. y col. (2021) <sup>64</sup> se plantea la hipótesis de que este efecto podría estar mediado por distintos mecanismos moleculares y metabólicos activados en cada línea celular. Las células A375 parecen ser más dependientes de la vía JNK y las células MNT1 más dependientes de la activación de ERK para asegurar la supervivencia y la proliferación celular. Además, las células MNT1 presentan un metabolismo oxidativo en comparación con las células A375, como lo indica *LDHB* y *LDHC* regulación al alza, y *MCT4* regulación a la baja. El tratamiento con HT condujo a *SNAT1* y *CT* regulación al alza, y a *EAAT3* regulación a la baja en células A375, mientras que indujo solo *LDHA* y *LDHC* regulación a la baja en células MNT1 (Figura 15). También se vio como resultado una disminución en la fosforilación de JNK total y ERK en ambas líneas celulares de melanoma.



**Figura 15.** Esquema de los efectos específicos del ácido oleico (OA), el alcohol homovanilílico (HA) y el hidroxitirosol (HYD) en vías metabólicas clave activadas en las líneas celulares de melanoma A375 y MNT1. **(A)** El tratamiento con hidroxitirosol parece tener un efecto significativo en las células A375, reduciendo los niveles de JNK total y ERK fosforilada y, en consecuencia, disminuyendo la tasa glucolítica a través de la inhibición de PKM2. Este compuesto también aumentó la expresión de SNAT1 y xCT, probablemente para activar mecanismos alternativos de producción de energía y desintoxicación en un intento de resistir el estímulo citotóxico inducido por el hidroxitirosol. La regulación a la baja de EAAT3 podría sugerir que estas células son menos dependientes del transporte de L-glutamato, L-aspartato, y D-aspartato. **(B)** En las células MNT1, el hidroxitirosol también redujo los niveles de JNK total y ERK fosforilada. Además, el alcohol homovanilílico y el ácido oleico disminuyeron la fosforilación de ERK. La tasa glucolítica de esta línea celular de melanoma también se vio afectada por los tratamientos con hidroxitirosol y ácido oleico. Extraída de (Brito y col., 2021) <sup>64</sup>.

En líneas celulares de melanoma cutáneo, se demostró un papel dual del HT cuando se usa éste en diferentes concentraciones (0-100µM) <sup>41</sup>. A concentraciones más bajas (100-400µM), este compuesto resultó fotoprotector frente a la radiación ultravioleta A, aunque a concentraciones superiores (600-1000µM), es capaz de inhibir la proliferación celular y activar la caspasa 3, promoviendo la apoptosis celular<sup>41</sup>. Según este estudio, el HT tiene un doble papel en el melanoma en función

de la concentración administrada, lo que es de gran importancia ya que estos compuestos están presentes en cosméticos y alimentos funcionales.

El comportamiento distinto de las células A375 y MNT1 después del tratamiento con HT, se sostiene en la hipótesis de que ambas líneas celulares de melanoma dependen de diferentes mecanismos moleculares y metabólicos predominantes para sobrevivir, lo cual se espera puesto que las líneas celulares A375 y MNT1 corresponden a un primario <sup>65</sup> y metastásico tipo de melanoma <sup>66</sup>, respectivamente.

En otros tipos de cáncer de piel, no melanoma, y según estudio realizado por Polini B. y col. (2018) <sup>67</sup>, se ha visto que los extractos de AOVE utilizados, tirosol (Tyr) e hidroxitirosol (HT), así como oleocantal (OC) y oleaceína (OA), son capaces de bloquear los nodos de señalización que desempeñan un papel en la progresión de QA a cSCC <sup>68</sup>. Este efecto se observó no solo en las células de carcinoma escamosas cutáneas, sino también en los queratinocitos humanos inmortalizados (no tumorales) estimulados con EGF, modelo *in vitro* usado para identificar objetivos de nuevas estrategias farmacológicas en AK y CsCC <sup>69,70</sup>. Dichas propiedades de los extractos de AOVE pueden ser clínicamente importantes ya que las células de cáncer de piel no melanoma se desarrollan en un contexto caracterizado por diversos grados de atipia epitelial y trastorno arquitectónico <sup>71</sup>.

Las propiedades de los extractos de AOVE, que se han identificado en este estudio, podrían sacar algunas ventajas tales como la sugerencia de que la orientación múltiple concurrente de nodos de señalización clave, incluidos mTOR y BRAF, mejorarían la eficacia sobre la monoterapia tradicional con inhibidores de la tirosina quinasa en pacientes con melanoma <sup>72</sup>. También se demostró en este estudio que OC y OA son más activos que Tyr Y HT, lo que demuestra que los derivados secoiridoides contribuyen más que los simples fenoles al mecanismo de acción de los extractos de AOVE.

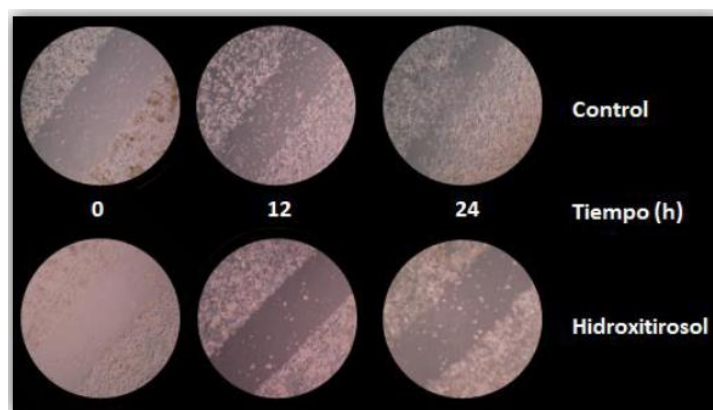
Resultados no publicados del grupo de investigación al que pertenece la cotutora de este TFM, han puesto de manifiesto la capacidad citotóxica del HT en la línea celular de melanoma B16F10 mediante el ensayo del MTT. Los resultados mostraron que el HT mostró una inhibición del crecimiento celular de manera dosis y tiempo

dependiente en la línea celular de melanoma, B16F10. Los resultados obtenidos y valores de concentraciones de HT (en  $\mu\text{g/mL}$ ) a las que este compuesto es capaz de disminuir la viabilidad celular en un 20, 50 y 80 % a 24, 48 y 72 horas de tratamiento se muestran recogidos en la tabla 1 y figura 2.

**Tabla 1.** Concentraciones de hidroxitirosol (en  $\mu\text{g/mL}$ ) a las cuales disminuye la viabilidad celular en un 20, 50 y 80% tras 24, 48 ó 72 horas de incubación en cada caso en células de melanoma de ratón (B16F10).

	24 h	48 h	72 h
IC <sub>20</sub>	13,86 $\mu\text{g/mL}$	17,18 $\mu\text{g/mL}$	24,02 $\mu\text{g/mL}$
IC <sub>50</sub>	30,37 $\mu\text{g/mL}$	28,27 $\mu\text{g/mL}$	32,73 $\mu\text{g/mL}$
IC <sub>80</sub>	66,94 $\mu\text{g/mL}$	41,48 $\mu\text{g/mL}$	39,22 $\mu\text{g/mL}$

En ese mismo estudio y mediante un ensayo de migración celular mostraron que, a las 12 horas la migración de las células control ya se había iniciado, llegando a cerrar casi en su totalidad la herida tras 24 horas desde el momento en que se realizó. Por el contrario, en el caso de células tratadas con HT, la herida permaneció casi intacta, incluso tras 24 horas desde que se realizó (Figura 15).



**Figura 16.** Imágenes de migración celular de la línea B16F10 tanto controles como tratadas con hidroxitirosol a 0, 12 y 24h respectivamente.

Por otra parte, los ensayos llevados a cabo mediante Western Blot en este estudio mostraron que este compuesto es capaz de inducir la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis en células cancerígenas de melanoma y disminuir la de ciertos factores relacionados con la angiogénesis. El HT fue capaz en células B16F10 de modular la expresión de p53, NFκB, citocromo c, VEGF, LDH y G6PDH. No se observaron cambios significativos en la expresión de COX-2 y VEGF aunque la tendencia fue a disminuir la expresión de las mismas.

## 5. CONCLUSIONES

La mayoría de las plantas son capaces de sintetizar una gran cantidad de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran los polifenoles. El hidroxitirosol (HT) es uno de estos compuestos y los utiliza la planta para su propia supervivencia, especialmente contra la oxidación metabólica, a través de su capacidad antioxidante.

Recientemente, se han descubierto las propiedades bioactivas de estos compuestos (ya sea directamente o derivados de la síntesis química) en la defensa contra enfermedades humanas. Durante los últimos años, se ha confirmado que poseen importantes propiedades biológicas. Sin duda, el aspecto más estudiado es su función protectora frente al estrés oxidativo mediante la cual son capaces de prevenir diversas patologías como el cáncer, problemas cardiovasculares, envejecimiento prematuro, etc.

A lo largo de este trabajo se ha podido ver que, en muchos estudios llevados a cabo, la gran mayoría *in vitro*, se ha confirmado que el HT sí tiene un papel muy importante como anticancerígeno en melanoma:

- Presenta efecto citotóxico en líneas celulares de melanoma a 24, 48 y 72h.
- Induce apoptosis celular y disminuye la expresión de pro-caspasa 9, caspase 3 y caspase 9.
- Modula la ruta de las MAPKs.
- Aumenta la cantidad de ROS intracelular.
- Protege de la autooxidación de los rayos UVA.

En conjunto todos estos resultados corroboran que el HT puede actuar como un compuesto anticancerígeno en células de melanoma. No obstante, hemos visto que diferentes tipos de células de melanoma responden de manera distinta al HT, dependiendo de si presentan un metabolismo glucolítico predominante y preferencia por la activación de la vía JNK o no, lo que se explica por una considerable heterogeneidad metabólica y molecular. Las terapias de HT se podrían centrar en características metabólicas y moleculares específicas de cada subconjunto de

melanoma y resultar ser más eficientes, ya que se basarían en objetivos distintos según la caracterización del tumor. Asimismo, el que el HT aumente la cantidad de ROS intracelular en células de melanoma, sugiere que las funciones citotóxicas del HT están moduladas por la producción de ROS que podría estar involucrado en el daño al ADN y en la apoptosis inducida por el HT.

A la vista de todos estos estudios, podemos concluir de manera general, que el HT presenta resultados positivos como anticancerígeno en melanoma, aunque más estudios deben hacerse, sobre todo en animales e in vivo para demostrar tal efecto y poder utilizarlo en la terapia de esta enfermedad.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Cooper, G. M. & Hausman, R. E. La Célula. 725–772 (2011).
2. Mayer, J. E., Swetter, S. M., Fu, T. & Geller, A. C. Screening, early detection, education, and trends for melanoma: Current status (2007-2013) and future directions Part I. Epidemiology, high-risk groups, clinical strategies, and diagnostic technology. *Journal of the American Academy of Dermatology* vol. 71 599.e1-599.e12 (2014).
3. Bach-Faig, A. *et al.* Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutrition* 14, 2274–2284 (2011).
4. Raederstorff, D. Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: A review. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* vol. 79 152–165 (2009).
5. Ruzzolini, J. *et al.* Oleuropein, the main polyphenol of *Olea europaea* leaf extract, has an anti-cancer effect on human BRAF melanoma cells and potentiates the cytotoxicity of current chemotherapies. *Nutrients* 10, (2018).
6. Stefani, M. & Rigacci, S. Beneficial properties of natural phenols: Highlight on protection against pathological conditions associated with amyloid aggregation. *BioFactors* vol. 40 482–493 (2014).
7. Williams, R. J., Spencer, J. P. E. & Rice-Evans, C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine* vol. 36 838–849 (2004).
8. Quiñones, M. Miguel. & A. Aleixandre. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. [*The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease*]. 27, 76–89 (2012).
9. Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* vol. 2 1231–1246 (2010).

10. Gutiérrez-Rosales, F., Ríos, J. J. & Gómez-Rey, M. L. Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6021–6025 (2003).
11. Vissers, M. N. *et al.* Effect of Consumption of Phenols from Olives and Extra Virgin Olive Oil on LDL Oxidizability in Healthy Humans. *Free Radical Research* vol. 35 3133 (2001).
12. Dinda, B., Debnath, S. & Banik, R. Naturally Occurring Iridoids and Secoiridoids. An Updated Review, Part 4. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 59, 803–833 (2011).
13. Casaburi, I. *et al.* Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: a review of in vitro studies. *Mol Nutr Food Res* 57, 71–83 (2013).
14. Granados-Principal, S., Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, C. L., Sanchez-Rovira, P. & Ramirez-Tortosa, M. C. Hydroxytyrosol: From laboratory investigations to future clinical trials. *Nutrition Reviews* vol. 68 191–206 (2010).
15. Dai, J. & Mumper, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* vol. 15 7313–7352 (2010).
16. Fernández-Bolaños, J. *et al.* Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or “alperujo.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6804–6811 (2002).
17. Vilaplana-Pérez, C., Auñón, D., García-Flores, L. A. & Gil-Izquierdo, A. Hydroxytyrosol and Potential Uses in Cardiovascular Diseases, Cancer, and AIDS. *Frontiers in Nutrition* vol. 1 (2014).
18. Briante, R. *et al.* *Olea europaea* L. leaf extract and derivatives: Antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 4934–4940 (2002).
19. Hu, T., He, X. W., Jiang, J. G. & Xu, X. L. Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* vol. 62 1449–1455 (2014).

20. Visioli, F., Bellomo, G. & Galli, C. *Free Radical-Scavenging Properties of Olive Oil Polyphenols. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* vol. 247 (1998).
21. Rodríguez-Gutiérrez, G. *et al.* Alperujo extract, hydroxytyrosol, and 3,4-dihydroxyphenylglycol are bioavailable and have antioxidant properties in vitamin E-deficient rats—a proteomics and network analysis approach. *Molecular Nutrition and Food Research* 56, 1131–1147 (2012).
22. Li, J. *et al.* The protective effects of hydroxytyrosol against ortho-phenylphenol-induced DNA damage in HepG2 cells. *Toxicology Mechanisms and Methods* 22, 432–437 (2012).
23. Filik, L. & Ozyilkan, O. Olive-oil consumption and cancer risk. *Eur J Clin Nutr* 57, 191–191 (2003).
24. Sirianni, R. *et al.* Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Molecular Nutrition and Food Research* 54, 833–840 (2010).
25. Rafehi, H. *et al.* Investigation into the biological properties of the olive polyphenol, hydroxytyrosol: Mechanistic insights by genome-wide mRNA-Seq analysis. *Genes and Nutrition* 7, 343–355 (2012).
26. Cornwell, D. G. & Ma, J. Nutritional benefit of olive oil: The biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* vol. 56 8774–8786 (2008).
27. Puel, C. *et al.* Major phenolic compounds in olive oil modulate bone loss in an ovariectomy/inflammation experimental model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 9417–9422 (2008).
28. Fitó, M. *et al.* Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: A randomized, crossover, controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition* 62, 570–574 (2008).

29. Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., García-Parrilla, M. C., Puertas, B. & Cantos-Villar, E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry* vol. 130 797–813 (2012).
30. Bulotta, S. *et al.* Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: Focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Translational Medicine* vol. 12 (2014).
31. Marrugat, J. *et al.* Effects of differing phenolic content in dietary olive oil on lipids and LDL oxidation: A randomized controlled trial. *European Journal of Nutrition* 43, 140–147 (2004).
32. González-Santiago, M. *et al.* One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis* 188, 35–42 (2006).
33. Rietjens, S. J., Bast, A. & Haenen, G. R. M. M. New insights into controversies on the antioxidant potential of the olive oil antioxidant hydroxytyrosol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7609–7614 (2007).
34. Libby, P., Ridker, P. M. & Hansson, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* vol. 473 317–325 (2011).
35. Granados-Principal, S. *et al.* Hydroxytyrosol ameliorates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with breast cancer. *Biochemical Pharmacology* 90, 25–33 (2014).
36. de Bock, M. *et al.* Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Polyphenols Improve Insulin Sensitivity in Middle-Aged Overweight Men: A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *PLoS ONE* 8, (2013).
37. Hamden, K. *et al.* Inhibitory action of purified hydroxytyrosol from stored olive mill waste on intestinal disaccharidases and lipase activities and pancreatic toxicity in diabetic rats. *Food Sci Biotechnol* 19, 439–447 (2010).

38. Medina, E., de Castro, A., Romero, C. & Brenes, M. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: Correlation with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4954–4961 (2006).
39. Lee-Huang, S., Zhang, L., Huang, P. L., Chang, Y. T. & Huang, P. L. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307, 1029–1037 (2003).
40. Mukherjee, S., Lekli, I., Gurusamy, N., Bertelli, A. A. A. & Das, D. K. Expression of the longevity proteins by both red and white wines and their cardioprotective components, resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. *Free Radical Biology and Medicine* 46, 573–578 (2009).
41. D'Angelo, S. *et al.* Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radical Biology and Medicine* 38, 908–919 (2005).
42. Costantini, F., di Sano, C. & Barbieri, G. The hydroxytyrosol induces the death for apoptosis of human melanoma cells. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 1–20 (2020).
43. Fabiani, R. *et al.* Anti-proliferative and pro-apoptotic activities of hydroxytyrosol on different tumour cells: The role of extracellular production of hydrogen peroxide. *European Journal of Nutrition* 51, 455–464 (2012).
44. Singh, R., Letai, A. & Sarosiek, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 20 175–193 (2019).
45. Menendez, J. A. *et al.* Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer* 7, (2007).

46. Hamdi, H. K. & Castellon, R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334, 769–778 (2005).
47. Goldsmith, C. D. *et al.* The olive biophenols oleuropein and hydroxytyrosol selectively reduce proliferation, influence the cell cycle, and induce apoptosis in pancreatic cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences* 19, (2018).
48. Omar, S. H. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica* vol. 78 133–154 (2010).
49. Rigacci, S. *et al.* Oleuropein aglycone induces autophagy via the AMPK/mTOR signalling pathway: a mechanistic insight. *Oncotarget* 6, 35344–35357 (2015).
50. Pazoki-Toroudi, H. *et al.* Targeting mTOR signaling by polyphenols: A new therapeutic target for ageing. *Ageing Research Reviews* vol. 31 55–66 (2016).
51. Song, H. *et al.* Dietary oleuropein inhibits tumor angiogenesis and lymphangiogenesis in the B16F10 melanoma allograft model: a mechanism for the suppression of high-fat diet-induced solid tumor growth and lymph node metastasis. *Oncotarget* vol. 8 [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/) (2017).
52. Samara, P. *et al.* New semi-synthetic analogs of oleuropein show improved anticancer activity in vitro and in vivo. *European Journal of Medicinal Chemistry* 137, 11–29 (2017).
53. Choupani, J., Alivand, M. R., M. Derakhshan, S., Zaeifizadeh, M. & S. Khaniani, M. Oleuropein inhibits migration ability through suppression of epithelial-mesenchymal transition and synergistically enhances doxorubicin-mediated apoptosis in MCF-7 cells. *Journal of Cellular Physiology* 234, 9093–9104 (2019).
54. Vanella, L. Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *International Journal of Oncology* 41, 31–38 (2012).
55. Han, J., Talorete, T. P. N., Yamada, P. & Isoda, H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology* 59, 45–53 (2009).

56. Cárdeno, A., Sánchez-Hidalgo, M., Rosillo, M. A. & de La Lastra, C. A. Oleuropein, a secoiridoid derived from olive tree, inhibits the proliferation of human colorectal cancer cell through downregulation of HIF-1 $\alpha$ . *Nutrition and Cancer* 65, 147–156 (2013).
57. Yao, J. *et al.* Oleuropein induced apoptosis in Hela cells via a mitochondrial apoptotic cascade associated with activation of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Journal of Pharmacological Sciences* 125, 300–311 (2014).
58. Liston, D. R. & Davis, M. Clinically relevant concentrations of anticancer drugs: A guide for nonclinical studies. *Clinical Cancer Research* vol. 23 3489–3498 (2017).
59. Shamsoum, H., Vlavcheski, F. & Tsiani, E. Anticancer effects of oleuropein. *BioFactors* vol. 43 517–528 (2017).
60. Fabiani, R. Anti-cancer properties of olive oil secoiridoid phenols: A systematic review of: In vivo studies. *Food and Function* vol. 7 4145–4159 (2016).
61. D'Angelo, S. *et al.* UVA irradiation induces l-isoaspartyl formation in melanoma cell. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1–9 (2001).
62. D'Angelo *et al.* Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. Drug metabolism and disposition. *Drug Metab Dispos.* 29, 1492–1498 (2001).
63. Auñón-Calles, D., Canut, L. & Visioli, F. Toxicological evaluation of pure hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology* 55, 498–504 (2013).
64. Brito, C. *et al.* The impact of olive oil compounds on the metabolic reprogramming of cutaneous melanoma cell models. *Molecules* 26, (2021).
65. Giard, D. J. *et al.* In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived from a Series of Solid Tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1417–1423 (1973).
66. Cuomo, M. *et al.* Production and Characterization of the Murine Monoclonal Antibody 2G10 to a Human T4-Tyrosinase Epitope. *J. Investig. Dermatol.* 96, 446–451 (1991).

67. Polini, B. *et al.* Oleocanthal and oleacein contribute to the in vitro therapeutic potential of extra virgin oil-derived extracts in non-melanoma skin cancer. *Toxicology in Vitro* 52, 243–250 (2018).
68. Ratushny, V., Gober, M. D., Hick, R., Ridky, T. W. & Seykora, J. T. From keratinocyte to cancer: The pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Investigation* vol. 122 464–472 (2012).
69. Müller, B. A. *Imatinib and Its Successors-How Modern Chemistry Has Changed Drug Development.* *Current Pharmaceutical Design* vol. 15 (2009).
70. Yadav, V. & Denning, M. F. Fyn is induced by Ras/PI3K/Akt signaling and is required for enhanced invasion/migration. *Molecular Carcinogenesis* 50, 346–352 (2011).
71. Jemec, G., Kemeny, L. & Miech, D. Non-Surgical Treatment of Keratinocyte Skin Cancer. *Springer Science & Business Media.* (2009).
72. Etnyre, D. *et al.* Targeting c-Met in melanoma: Mechanism of resistance and efficacy of novel combinatorial inhibitor therapy. *Cancer Biology and Therapy* 15, 1129–1141 (2014).