

El extracto de hojas de olivo tiene efectos antitumorales contra el neuroblastoma a través de la inhibición de la proliferación celular y la inducción de la apoptosis

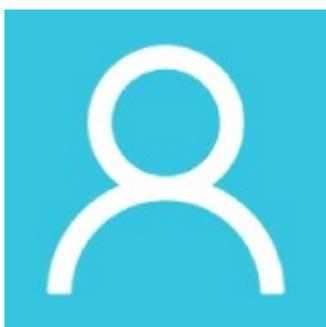
por



[fabio morandi](#)



1,+ ,



[Verónica Bensa](#)



2,+ ,



[Enzo Calarco](#)



2 ,



[fabio pastorino](#)



2

,



[patricia perri](#)



2

,



[María Valeria Corrás](#)



2

,



Mirco Ponzoni



² y



Chiara Brignole



^{2,*}

¹

Laboratorio de Células Madre y Centro de Terapia Celular, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, 16147 Génova, Italia

²

Laboratorio de Terapias Experimentales en Oncología, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, 16147 Génova, Italia

*

Autor a quien debe dirigirse la correspondencia.

†

Estos autores contribuyeron igualmente a este trabajo.

Editora académica: Sadia Afrin

Nutrientes **2021**, *13* (7), 2178; <https://doi.org/10.3390/nu13072178>

Recibido: 10 junio 2021 / Aceptado: 21 junio 2021 / Publicado: 24 junio 2021

Resumen

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más frecuente en la edad pediátrica. El pronóstico para los pacientes con NB de alto riesgo sigue siendo malo y son deseables nuevas estrategias de tratamiento. El extracto de hoja de olivo (OLE) está constituido por compuestos fenólicos, cuyos efectos beneficiosos para la salud fueron reportados. Aquí, los efectos antitumorales de OLE se investigaron in vitro en un panel de líneas celulares NB en términos de (i) reducción de la viabilidad celular; (ii) inhibición de la proliferación celular a través de la detención del ciclo celular; (iii) inducción de apoptosis; y (iv) inhibición de la migración celular. Además, también se realizaron experimentos de citotoxicidad mediante la combinación de OLE con el quimioterápico topotecán.

OLE redujo la viabilidad celular de las células NB de manera dependiente del tiempo y la dosis en modelos 2D y 3D. Las células NB expuestas a OLE sufrieron inhibición de la proliferación celular, que se caracterizó por una detención de la progresión del ciclo celular en la fase G0/G1 y por la acumulación de células en la fase sub-G0, que es peculiar de la muerte apoptótica. Esto fue confirmado por un aumento dependiente de la dosis de las células de anexina V+ (peculiar de la apoptosis) y una regulación al alza de los niveles de proteína de las caspasas 3 y 7. Además, OLE inhibió la migración de células NB. Finalmente, la eficacia antitumoral del topotecán quimioterapéutico, en términos de reducción de la viabilidad celular, mejoró enormemente con su combinación con OLE. En conclusión, OLE tiene actividad antitumoral contra NB al inhibir la proliferación y migración celular e inducir la apoptosis. Esto fue confirmado por un aumento dependiente de la dosis de las células de anexina V+ (peculiar de la apoptosis) y una regulación al alza de los niveles de proteína de las caspasas 3 y 7. Además, OLE inhibió la migración de células NB. Finalmente, la eficacia antitumoral del topotecán quimioterapéutico, en términos de reducción de la viabilidad celular, mejoró enormemente con su combinación con OLE. En conclusión, OLE tiene actividad antitumoral contra NB al inhibir la proliferación y migración celular e inducir la apoptosis.

Palabras clave: [extracto de hoja de olivo](#) ; [fitoquímicos](#) ; [neuroblastoma](#) ; [efectos antitumorales](#) ; [combinación de drogas](#)

1. Introducción

El neuroblastoma (NB), un cáncer pediátrico derivado de la cresta neural, es el tumor sólido extracraneal más común de la infancia y representa aproximadamente el 7 % de todas las neoplasias malignas diagnosticadas antes de los 15 años [1 , 2]. Es el cáncer más común diagnosticado durante el primer año de vida, con una mediana de edad al momento del diagnóstico de 17 meses [2]. Una amplia heterogeneidad clínica caracteriza la enfermedad del NB, que va desde casos de regresión espontánea hasta una enfermedad altamente metastásica ya en el momento del diagnóstico. Con base en la estadificación de la enfermedad y la evaluación de los factores de riesgo, el grupo internacional de riesgo de NB (INRG) estratifica a los pacientes en riesgo muy bajo, bajo, intermedio y alto. Esta clasificación responde al tipo de tratamiento a realizar [3]. Hasta la fecha, el pronóstico para los pacientes afectados por NB de alto riesgo sigue siendo malo. De hecho, aunque la aplicación de un esquema de tratamiento intensivo, que implica una fase de quimioterapia de inducción seguida de cirugía, terapia mieloablativa combinada con trasplante de células madre hematopoyéticas y radioterapia local, y mantenimiento con anticuerpos anti-disialogangliósido (GD2) más isotrenoína, la tasa de supervivencia para pacientes con NB de alto riesgo es inferior al 50% [3]. Este escenario desafía a los investigadores a encontrar nuevas terapias para respaldar los regímenes de tratamiento estándar de atención, con el objetivo de mejorar el resultado clínico de estos niños.

Los compuestos naturales representaron durante mucho tiempo la principal fuente de agentes terapéuticos [4]. Históricamente, se han empleado ampliamente para la prevención y cura de enfermedades físicas y mentales [5]. Además, también han tenido una importancia fundamental en el descubrimiento de fármacos [6].

Es de destacar que muchos de los medicamentos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y/o por la Agencia Médica Europea (EMA) se basan en derivados de plantas [7]. Los alcaloides de Vinca, derivados de la planta de bígaro Catharanthus roseus y el terpeno Paclitaxel de Taxus baccata, se encuentran entre los agentes terapéuticos derivados de plantas más exitosos aprobados para uso clínico en oncología [8].

Ha vuelto a surgir en los últimos años. Como consecuencia, la industria farmacéutica invirtió enormes recursos, económicos y de otro tipo, lo que llevó a una rama de la industria en auge [9].

Las moléculas bioactivas derivadas de plantas, también llamadas fitoquímicos, se encuentran ampliamente distribuidas en frutas, semillas, verduras, legumbres y hojas. Se ha informado que la dieta mediterránea contribuye al bienestar y tiene efectos protectores contra las enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares, así como contra el cáncer [10 , 11 , 12]. En concreto, el consumo de aceite de oliva virgen extra (AOVE) en la dieta conlleva efectos protectores en la población mediterránea. Estas propiedades beneficiosas se pueden atribuir al alto contenido de moléculas bioactivas, la mayoría de las cuales son compuestos fenólicos (por ejemplo, oleuropeína, tirosol e hidroxitirosol), dentro del AOVE [13]. Es de destacar que el extracto de hoja de olivo (OLE) se caracteriza por una concentración aún mayor de compuestos fenólicos con respecto al AOVE [13]. De hecho, las hojas de olivo están constituidas principalmente por secoiridoides (p. ej., oleuropeína, dimetiloleuropeína), flavonoides (p. ej., apigenina y luteolina), así como otros fenoles (p. ej., hidroxitirosol, tirosol).

Se demostró que los compuestos fenólicos contenidos en OLE son responsables de la inhibición de la proliferación celular y la inducción de la apoptosis, in vitro, en diferentes modelos tumorales (es decir, cáncer de mama, tumor pancreático y leucemia) [13 , 14 , 15 , 16]. Además, OLE mejora la respuesta de las células de glioblastoma a los tratamientos estándar mediante la modulación de la expresión de miARN [17]. Con estos antecedentes, aquí investigamos los efectos antitumorales y los mecanismos de acción relativos de OLE en modelos monocapa (2D) y tridimensionales (3D) de NB in vitro. Además, también se investigaron los efectos de la combinación de OLE con topotecán, que es un quimioterapéutico utilizado para el tratamiento de pacientes con NB de alto riesgo en recaída o refractarios (topotecán más temozolomida, protocolo TOTEM, [18]).

2. Materiales y métodos

2.1. Líneas celulares

Líneas celulares NB humanas (HTLA-230, IMR-32, SH-SY5Y y SK-N-AS [19 , 20 , 21 , 22]), células HA-CAT (queratinocitos humanos [23]) y células B-end (células endoteliales de cerebro murino [24]) se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (D-MEM) y RPMI-1640 complementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS), 50 UI/mL de penicilina G, 50 µg/mL sulfato de estreptomina y L-glutamina 2 mM. Las células se analizaron periódicamente para detectar la contaminación por micoplasma mediante el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y se caracterizaron mediante la evaluación de la morfología y la proliferación celular, y también se autenticaron mediante el perfilado repetido en tándem corto múltiplex de BMR Genomics (Padua, Italia).

2.2. Extracto de hoja de olivo (OLE)

En este estudio, utilizamos un extracto acuoso de hoja de olivo (OLE; OLIVUM, EvergreenLife, San Giovanni al Natisone, Italia), que contiene oleuropeína, hidroxitirosol, tirosol, ácido elenólico y rutina, según se evaluó mediante cromatografía líquida de alta resolución-masa. espectrometría (HPLC-MS) por los fabricantes. La concentración media de cada elemento individual se informa en [la Tabla 1](#) .

Tabla 1. Concentración media de fitoquímicos contenidos en OLE.

2.3. Proliferación celular: carboxifluoresceína succinimidil éster (ensayo CFSE)

Las líneas celulares de NB se etiquetaron con CFSE, siguiendo las instrucciones del fabricante (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y luego se sembraron en placas de 6 pozos ($1.8-2.8 \times 10^5$ células / pozo, dependiendo la línea celular utilizada). El día después de la siembra, las células se trataron con dosis crecientes (50–300 μ M) de OLE, que se administraron en función de la concentración de oleuropeína en el extracto. Después de 72 h (h) de tratamiento, las células se recolectaron y analizaron por citometría de flujo (FCM).

2.4. Apoptosis: ensayo de anexina-V

Las líneas celulares NB se sembraron en placas de 6 pocillos ($1,8-2,8 \times 10^5$ células/pocillo, según la línea celular utilizada). El día después de la siembra, las células se trataron con OLE (50–300 μ M). Después de 72 h, las células se recolectaron y procesaron para la detección de apoptosis mediante el kit Annexin V-FITC (Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. En algunos experimentos, las células, antes de ser tratadas con OLE, fueron pretratadas con el inhibidor de pan-caspasas Q-VD-OPh (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) a una concentración de 30 μ M durante 30 min.

2.5. citotoxicidad

2.5.1. Ensayo de viabilidad celular de sal de tetrazolio (MTS) en cultivo 2D

Las líneas celulares NB y las células de control sanas (HA-CAT y B-end) se sembraron en placas de 96 pocillos ($4-9,6 \times 10^3$ células/pocillo, según la línea celular utilizada). El día después de la siembra, las células se trataron con OLE, por cuadruplicado para cada condición experimental, como ya se detalló anteriormente. Después de 48 a 120 h, las células se procesaron para determinar los efectos citotóxicos mediados por el tratamiento con OLE. Se utilizó el ensayo de compuestos de tetrazolio MTS, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (CellTiter 96® Ensayo acuoso de proliferación celular en solución única, Promega Italia, Milán, Italia). El compuesto de tetrazolio MTS es convertido por células metabólicamente activas para producir un formazán coloreado, cuya cantidad es proporcional al número de células viables. En algunos experimentos, las líneas celulares NB y las células de control sanas se trataron con OLE durante 18 h (a saber, experimentos de "tratamiento corto"). Luego, se eliminó el OLE y las células se recuperaron con medio completo fresco durante 54 y 102 h adicionales. En el momento del punto final, 72 y 120 h respectivamente, se utilizó el ensayo MTS.

En un conjunto separado de experimentos, las células NB sembradas como se describe anteriormente se trataron con una combinación de OLE y topotecan (TOPO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Las dosis de TOPO se eligieron sobre la base de la literatura [25]. Después de 96 h de tratamiento, las células se sometieron al ensayo MTS para determinar los efectos citotóxicos. Luego, los resultados fueron analizados mediante el uso del software en línea Compusyn (disponible en <http://www.combosyn.com> (consultado el 10 de junio de 2021)/, Combosyn, Inc., Paramus, NJ, EE. UU.), con el objetivo para evaluar la sinergia, la adicción y/o el antagonismo entre OLE y TOPO.

2.5.2. Ensayo CellTiter-Glo® en cultivo 3D

Las líneas celulares NB IMR-32 y SH-SY5Y (2×10^3 y 1×10^3 , respectivamente) se sembraron en placas de 96 pocillos de unión ultrabaja (Corning, Steuben, NY, EE. UU.). Después de un cultivo de tres días, cuando se formó un solo esferoide por pozo, las células se trataron continuamente por cuadruplicado para cada condición experimental, con OLE como ya se detalló anteriormente. Después de 72 y 120 h, los esferoides se transfirieron a placas de 96 pocillos de paredes negras y se analizaron para determinar la viabilidad celular mediante el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo®^{3D} (Promega, Italia, Milán, Italia).

También se usaron esferoides tumorales para evaluar la posible combinación de OLE y TOPO en términos de reducción de la viabilidad celular. La combinación de OLE y TOPO, que condujo al mejor resultado en el modelo 2D (OLE 200 μ M + TOPO 10 nM), se utilizó como ensayo de prueba de concepto en el modelo 3D. Como ya se ha descrito anteriormente, el tratamiento se administró de forma continua cuando se formó un único esferoide por pocillo. Después de 96 h, se determinó la viabilidad celular de cada esferoide tumoral.

2.6. Análisis del ciclo celular

Las líneas celulares NB (IMR-32 y HTLA-230) se sembraron en placas de 6 pocillos ($2,8 \times 10^5$ y 3×10^5 células/pocillo, respectivamente). El día después de la siembra, las células se trataron con 200 y 300 μM de OLE. Luego, 72 h más tarde, las células se recolectaron y marcaron con Nuclear Green CCS1 (abcam, Cambridge, Reino Unido) para monitorear la progresión del ciclo celular en células vivas. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, las células se incubaron con Nuclear Green durante 1 h a 37 °C. Luego, FCM evaluó la progresión del ciclo celular.

2.7. Señalización

Las líneas celulares de NB se sembraron en placas de 6 pocillos, como ya se mencionó anteriormente. El día después de la siembra, las células se trataron con 200 y 300 μM de OLE, como ya se describió anteriormente. Después de 72 h de tratamiento, las células se recolectaron y procesaron para la evaluación de señalización celular por FCM. En concreto, se determinó la expresión de caspasa 3 escindida, caspasa 7 escindida, caspasa 8 escindida, p53, ciclina D1, Bcl-2, fosfo-Bcl-2, NF-kB p65 y fosfo-NF-kB p65, según el instrucciones del fabricante (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, EE. UU.).

2.8. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Para la detección de ROS totales, se marcaron líneas celulares NB (IMR-32 y [HTLA](#) -230) con H2DCFDA (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. placas bien negras (2×10^4 células/pozo). H2DCFDA es un colorante no fluorescente permeable a las células que, en presencia de ROS, se oxida y se vuelve verde fluorescente. El día después de la siembra, las células se trataron con concentraciones crecientes de OLE. Después de 24 h de exposición a OLE, las placas se centrifugaron (1400 rpm durante 7 min). Luego, las células se lavaron y recuperaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). La producción de ROS se determinó mediante la medición de la fluorescencia verde (485 nm/535 nm, excitación/emisión).

2.9. Migración: Prueba de Scratch

Las líneas celulares NB IMR-32 y SH-SY5Y (8×10^5 y $4,5 \times 10^5$, respectivamente) se sembraron en placas de 6 pocillos. Dos días después de la siembra, cuando las células estaban casi confluentes, se hizo una herida vertical a través de la monocapa celular, usando una punta de pipeta de 200 μL . Luego, las células se trataron con OLE (200 y 300 μM). En el momento del tratamiento (T0) y a las 4, 24, 36 y 48 h, se fotografiaron las células y se determinó y registró el ancho del rasguño mediante el uso del software ImageJ (Rasband, WS; ImageJ, US. National Institutes de Salud, Bethesda, MD, EE. UU., <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2012; consultado el: 2019–2020).

2.10. Estadísticas

Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces con resultados similares. Cada condición experimental, para los ensayos realizados en placas de 96 pocillos, se llevó a cabo por cuadruplicado.

Los hallazgos diferenciales entre los grupos experimentales se determinaron mediante análisis de varianza unidireccional, con la prueba de comparación múltiple de Tukey, utilizando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software v5.0, San Diego, CA, EE. UU.). Las diferencias de pendiente del ensayo de migración se determinaron mediante el uso de GraphPad Prism 5.

3. Resultados

3.1. El extracto de hoja de olivo (OLE) tiene efectos citotóxicos en un panel de líneas celulares NB

Los efectos citotóxicos de OLE se evaluaron in vitro en un panel de líneas celulares NB humanas. [La figura 1](#) muestra que todas las células NB analizadas son sensibles al tratamiento con OLE, en diferente medida y de forma dosis-dependiente. Específicamente, la viabilidad celular de las células IMR-32 y HTLA-230 se redujo con la dosis más baja de OLE, mientras que solo las concentraciones más altas de OLE afectaron significativamente la viabilidad celular de SH-SY5Y y SK-N-AS.

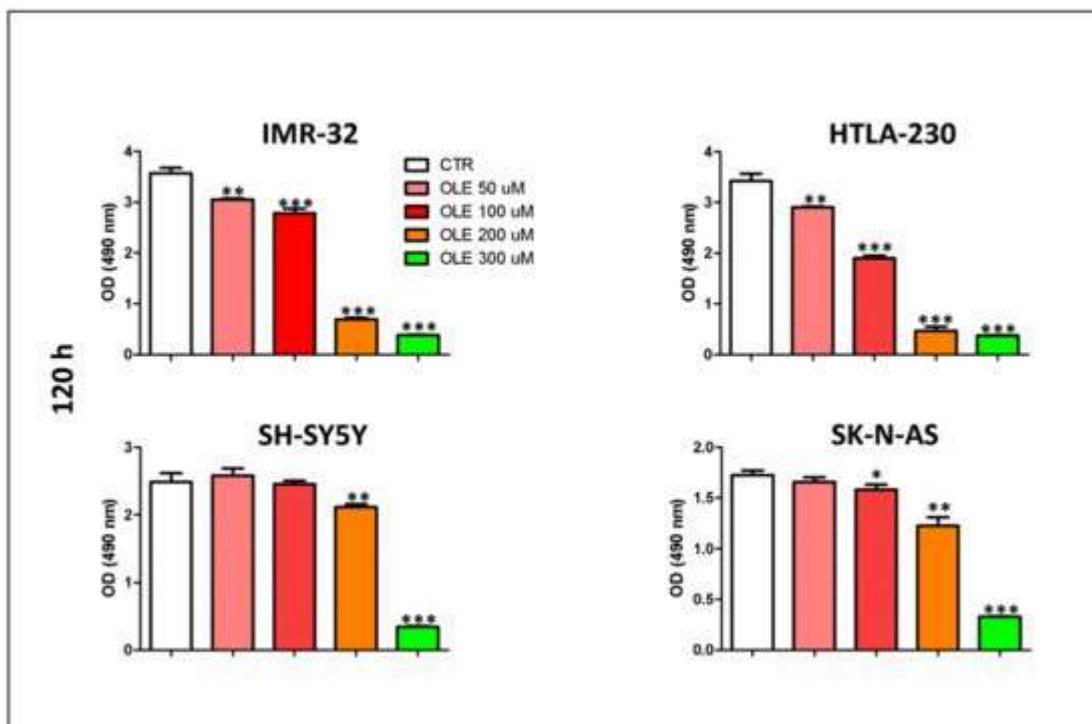


Figura 1. Efectos dependientes de la dosis del tratamiento con OLE sobre la viabilidad celular de las células NB. Los datos representan los resultados de los ensayos MTS realizados después de 120 h de tratamiento con OLE. La densidad óptica (OD, a 490 nm) se registró mediante el uso del lector de microplacas TECAN, Infinite 200 (Tecan Life Sciences). Los datos se expresan como media \pm DE de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente a CTR). CTR: controlar; OLE: extracto de hoja de olivo; uM: micromolar; nm: nanómetro; h: horas.

Se realizó además un experimento de curso de tiempo, enfocado solo en las dos dosis principalmente efectivas (200 y 300 μ M). [La figura 2](#) muestra que OLE afectó la viabilidad celular de las células NB también de forma dependiente del tiempo. Las líneas celulares IMR-32 y HTLA-230 fueron, como se esperaba, más sensibles al tratamiento con OLE en comparación con SH-SY5Y y SK-N-AS, cuya viabilidad celular se redujo solo después de un tiempo más largo de exposición a OLE.

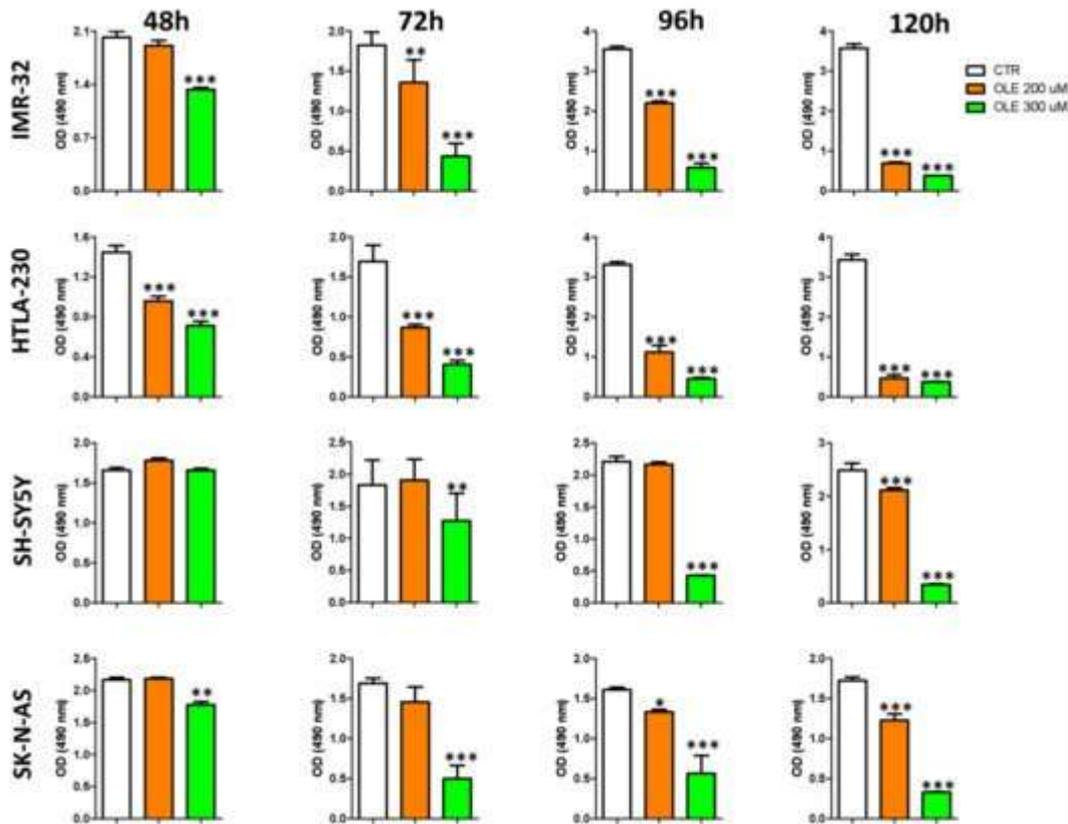


Figura 2. Efectos dependientes del tiempo del tratamiento con OLE sobre la viabilidad celular de las células NB. El ensayo MTS se realizó después de 48, 72, 96 y 120 h de tratamiento con OLE. La densidad óptica (OD, a 490 nm) se registró mediante el uso del lector de microplacas TECAN, Infinite 200 (Tecan Life Sciences). Los datos se expresan como media \pm DE de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente a CTR). CTR: controlar; OLE: extracto de hoja de olivo; μ M: micromolar; h: horas; nm: nanómetro.

Los experimentos realizados en líneas celulares sanas (B-end y HA-CAT) revelaron que solo la dosis de OLE de 300 μ M resultó en una reducción moderada de la viabilidad celular en una de las dos líneas celulares de control analizadas después de un tiempo de exposición prolongado (120 h; [Figura complementaria S1](#)).

Teniendo en cuenta la posible limitación del uso in vivo de OLE en concentraciones de μ M en el tratamiento de la enfermedad de NB, se realizaron experimentos de tratamiento breve. Como se ilustra en [la Figura complementaria S2A,B](#), la exposición de tratamiento corto fue casi ineficaz contra las células de control sanas, mientras que las células NB expuestas durante 18 h a OLE sufrieron una reducción significativa de la viabilidad celular dependiente de la dosis en ambos puntos finales analizados.

También se realizaron experimentos en un sistema de cultivo 3D, que se asemeja a las características peculiares de los tumores sólidos y refleja y predice mejor la respuesta a una terapia dada. [La Figura 3](#) muestra los resultados de los experimentos citotóxicos realizados en esferoides tumorales IMR-32 y SH-SY5Y. OLE mantuvo su capacidad para reducir significativamente la viabilidad celular de los esferoides NB de una manera dependiente de la dosis y el tiempo en las dos dosis principalmente efectivas (200 y 300 μ M).

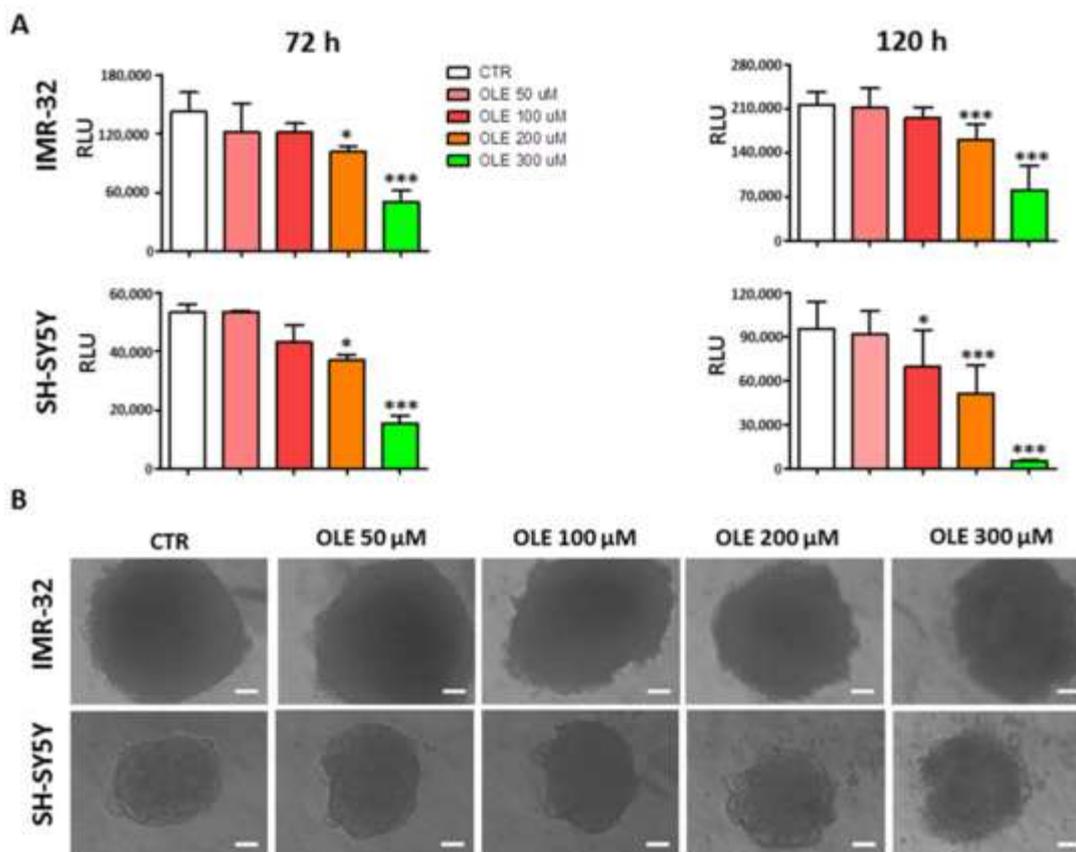


Figura 3. Efectos dependientes de la dosis y el tiempo del tratamiento con OLE sobre la viabilidad de los esferoides NB. (**A**) Viabilidad celular determinada en los puntos de tiempo indicados, gracias al ensayo CellTiter-Glo[®] 3D Cell Viability. La luminiscencia, producida solo por células metabólicamente activas, fue registrada por TECAN Infinite 200 y registrada como unidad de luminiscencia relativa (RLU). Los datos se expresan como media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ frente a CTR). (**B**) Imágenes representativas de microscopía de contraste de fase de esferoides tomadas 120 h después del tratamiento con OLE. Se utilizó el programa de procesamiento ImageJ. Barra de escala: 100 μ m. CTR: controlar; OLE: extracto de hoja de olivo; μ M: micromolar; h: horas.

3.2. OLE inhibe la proliferación celular de líneas celulares NB a través de una detención del ciclo celular G0/G1

Las líneas celulares NB tratadas con dosis crecientes de OLE durante 72 h sufrieron una reducción de la proliferación celular dependiente de la dosis, según lo evaluado por el ensayo CFSE ([Figura 4 A](#)). Nuevamente, dicho efecto se logró principalmente con 200 y 300 μ M de OLE y fue más evidente en las células IMR-32 y HTLA-230 que en las células SH-SY5Y y SK-N-AS. Por lo tanto, la progresión del ciclo celular se investigó más a fondo en las dos líneas celulares anteriores. Tanto las células IMR-32 como las HTLA-230 pasaron a una detención del ciclo celular G0/G1 después de 72 h de tratamiento con 200 y 300 μ M de OLE ([Figura 4B](#)). Esto estuvo acompañado por la desaparición casi completa de la fase S y la reducción progresiva de la fase G2/M en ambas líneas celulares analizadas. Además, como resultado de la detención del ciclo celular G0/G1, el tratamiento con OLE determinó un aumento significativo de células en la fase sub-G0 ([Figura 4 B](#)). Además, la detención de G0/G1 se correlacionó con una regulación al alza dependiente de la dosis de p53 de tipo salvaje y la expresión de la proteína ciclina-D1 ([Figura complementaria S3A,B](#)).

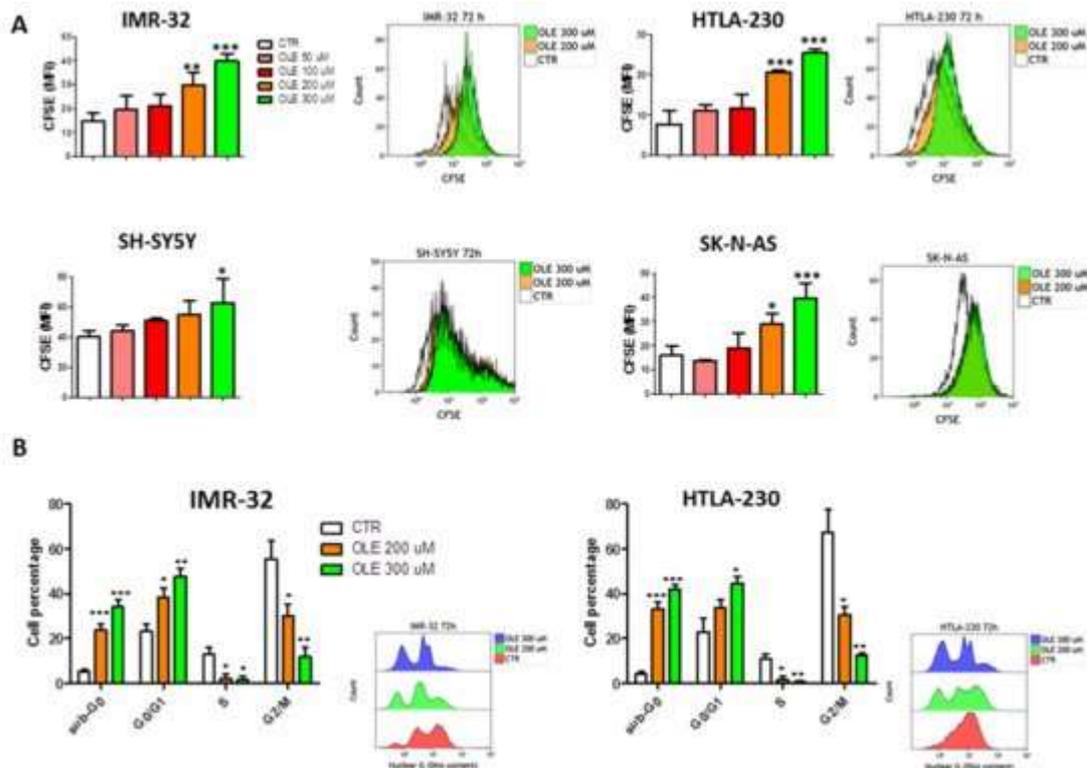


Figura 4. Inhibición de la proliferación celular, a través de una detención del ciclo celular G0/G1, mediada por tratamiento con OLE. (**A**) La intensidad de fluorescencia verde de Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) fue registrada por FCM. Según la dilución del colorante, más fluorescencia significa menos proliferación. Los recuadros muestran experimentos FCM representativos del ensayo CFSE. (**B**) Progresión del ciclo celular de IMR-32 y HTLA-230 determinada por marcado Nuclear Green. Los recuadros muestran un ensayo de progresión del ciclo celular representativo, analizado por FCM. Los datos se expresan como media \pm DE de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente a CTR). CTR: controlar; OLE: extracto de hoja de olivo; uM: micromolar; MFI: intensidad de fluorescencia media.

3.3. OLE induce la apoptosis de las células NB

Se realizaron experimentos adicionales para evaluar si el porcentaje creciente de células sub-G0 (es decir, apoptóticas) después de la exposición a OLE estaba relacionado con la inducción de apoptosis en células NB. Como se muestra en la [Figura 5A](#) y [la Figura complementaria S4A](#), las células tratadas con OLE sufrieron una apoptosis dependiente de la dosis, como se destaca por el aumento del porcentaje de células Anx-V+, que fue significativo, en comparación con las células de control, en las dosis más altas de OLE utilizadas. Además, en todas las líneas celulares NB analizadas, el tratamiento con OLE condujo a una activación dependiente de la dosis de las caspasas ejecutoras 3 y 7 ([Figura 5 B, C](#) y [Figura complementaria S4B, C](#)). Finalmente, la muerte celular apoptótica inducida por el tratamiento con OLE se rescató significativamente mediante el pretratamiento de las células con el inhibidor de pan-caspasas Q-VD-OPh, lo que respalda aún más los resultados obtenidos ([Figura complementaria S5A, B](#)). Se realizaron experimentos para evaluar las vías de señalización involucradas en la muerte celular apoptótica. El aumento significativo de los niveles de expresión de la proteína caspasa 8 escindida indica claramente la participación de la vía extrínseca ([Figura complementaria S6A, B](#)). Por otro lado, la regulación positiva significativa de fosfo-Bcl-2, solo con la dosis más alta de OLE (300 μ M) utilizada, parece sugerir también la activación contemporánea de la vía apoptótica intrínseca ([Figura complementaria S6A,B](#)). Esta última vía podría estar implicada como consecuencia del aumento de la producción de ROS totales en respuesta al tratamiento con OLE ([Figura complementaria S7](#)).

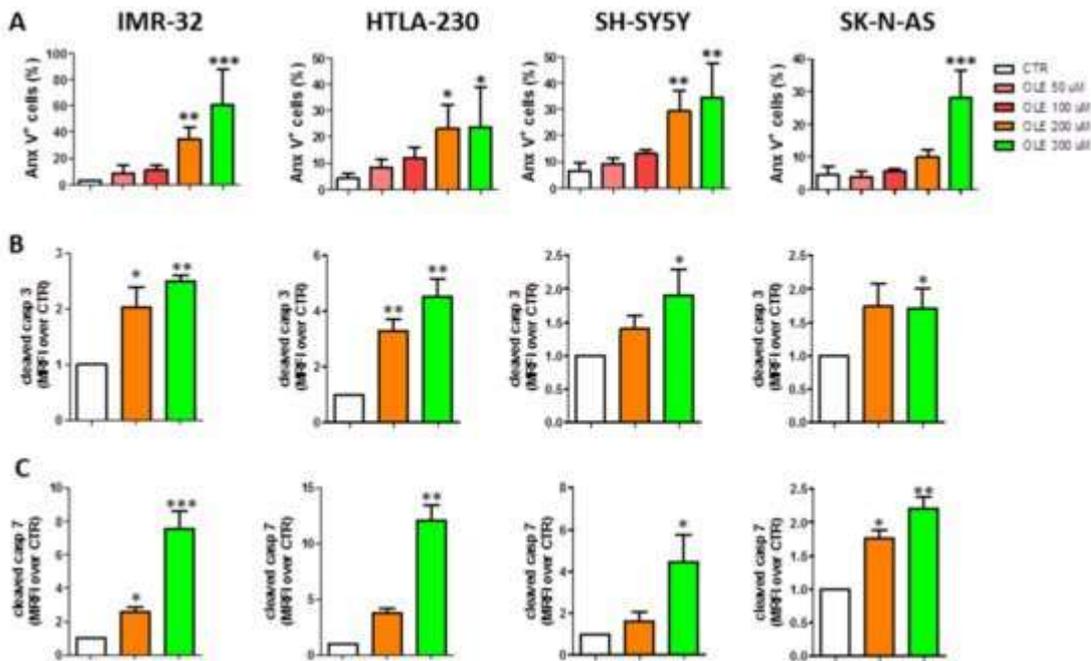


Figura 5. Inducción dependiente de la dosis de apoptosis de células NB después del tratamiento con OLE. (**A**) Células Anx-V+ determinadas por FCM. Niveles de expresión de proteínas de las caspasas verdugo 3 (**B**) y 7 (**C**) evaluados por FCM. Los datos se expresan como media \pm DE de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente a CTR). OLE: extracto de hoja de olivo; CTR: controlar; μ M: micromolar; MRFI: relación media de intensidad de fluorescencia.

3.4. OLE activa la vía NF- κ B

Para investigar si el tratamiento con OLE puede estar involucrado en las vías inflamatorias, también investigamos los niveles de expresión de proteínas de NF- κ B y fosfo-NF- κ B. Como se muestra en [la Figura complementaria S8](#), el tratamiento con OLE condujo a una mayor expresión de fosfo-NF- κ B, mientras que la forma nativa de NF- κ B permaneció inalterada.

3.5. OLE inhibe la migración de células IMR-32 y SH-SY5Y

El ensayo de rascado, realizado en células NB IMR-32 y SH-SY5Y, demostró que el tratamiento con OLE inhibe la migración de células NB. De hecho, después de la exposición a OLE, las células IMR-32 y SH-SY5Y no lograron curar completamente la herida creada en la monocapa celular, con respecto a las células de control no tratadas, durante un período de 48 h ([Figura 6](#)). Al aplicar el análisis de regresión lineal para comparar las curvas de cierre de heridas, resultó que las pendientes de las células tratadas con OLE (ya sea a 200 o 300 μ M) fueron significativamente diferentes con respecto a las de las células de control no tratadas ($p < 0,0001$, ya sea para IMR-32 o SH-SY5Y). El ancho de la herida de las células tratadas con OLE fue significativamente mayor que en las células no tratadas en los puntos de tiempo de 24, 36 y 48 h ([Figura 6](#) y [Figura complementaria S9](#)).

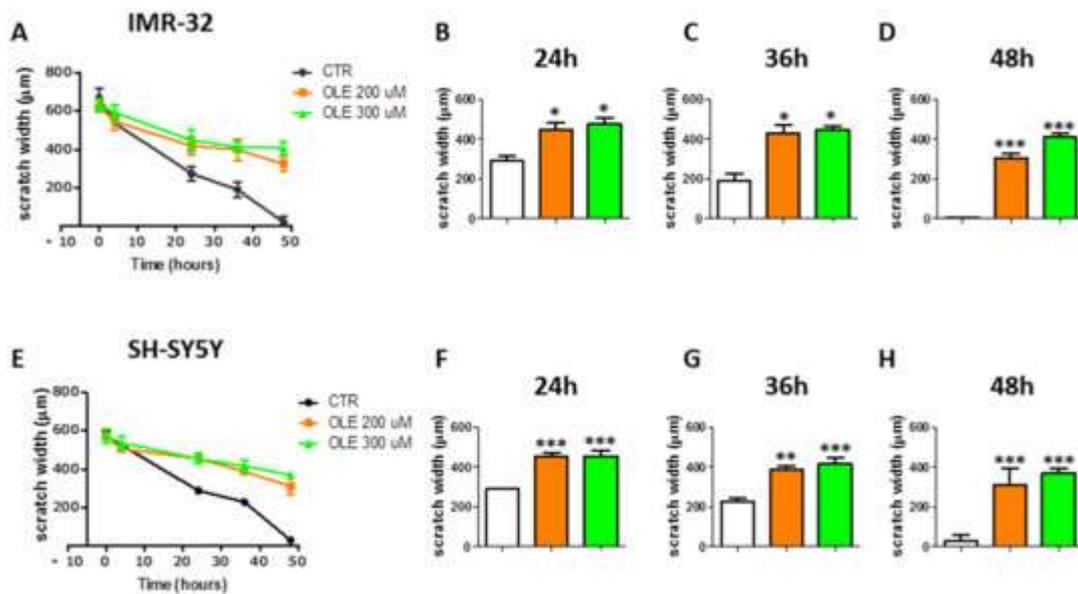


Figura 6. Efectos de OLE sobre la migración de células NB. (**A**) y (**E**) representan las curvas de cierre de heridas de CTR frente a células tratadas con OLE de IMR-32 y SH-SY5Y, respectivamente. (**B – D**) y (**F – H**) muestran las diferencias de ancho de la herida entre los grupos experimentales en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresan como media \pm DE de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente a CTR). CTR: controlar; OLE: extracto de hoja de olivo; μM : micromolar; μm : micrómetro; h: horas.

3.6. OLE Sinergiza con Topotecan contra las Células NB

Se realizaron experimentos de prueba de concepto de combinación de fármacos con el objetivo de determinar si OLE podría apoyar la quimioterapia convencional en el tratamiento de pacientes con NB de alto riesgo en recaída. Se combinaron entre sí dosis crecientes de OLE (50, 100, 200 μM) y topotecan (TOPO, 1, 5, 10 nM [25]). La Figura 7 A,B muestra los resultados obtenidos al usar “drogas” como agentes únicos o en combinación, respectivamente. Los efectos de la combinación de fármacos se determinaron gracias al teorema de Chou y Talalay [27]. Los valores del índice de combinación (IC) permiten distinguir entre sinergismo (IC < 1), adicción (IC = 1) y antagonismo (IC > 1). Como se muestra en la Figura 7C, la administración combinada de OLE y TOPO a células IMR-32, durante 96 h de tratamiento, condujo a efectos sinérgicos generalizados excepto en dos puntos con un IC > 1. Más en detalle, la mayor parte de la combinación OLE-TOPO analizada produjo ya sea sinergismo (rango de IC = 0,3-0,7) o sinergismo moderado (rango de IC = 0,7-0,85). Además, las dos combinaciones (OLE 50 μM + TOPO 1 nM, IC = 1,1 y OLE 100 μM + TOPO 1 nM, IC = 1,07) con un IC > 1 produjeron un efecto casi adictivo, en el que el valor de IC estuvo entre 0,9 y 1.1 [27]. La mejor combinación que produjo resultados sinérgicos (OLE 200 μM + TOPO 10 nm, CI = 0,31) también se probó contra esferoides de la línea celular IMR-32. Esta combinación redujo significativamente la viabilidad celular de los esferoides tumorales en comparación con cada fármaco utilizado solo, lo que confirma aún más los resultados obtenidos en los ensayos basados en monocapa (Figura 7 D).

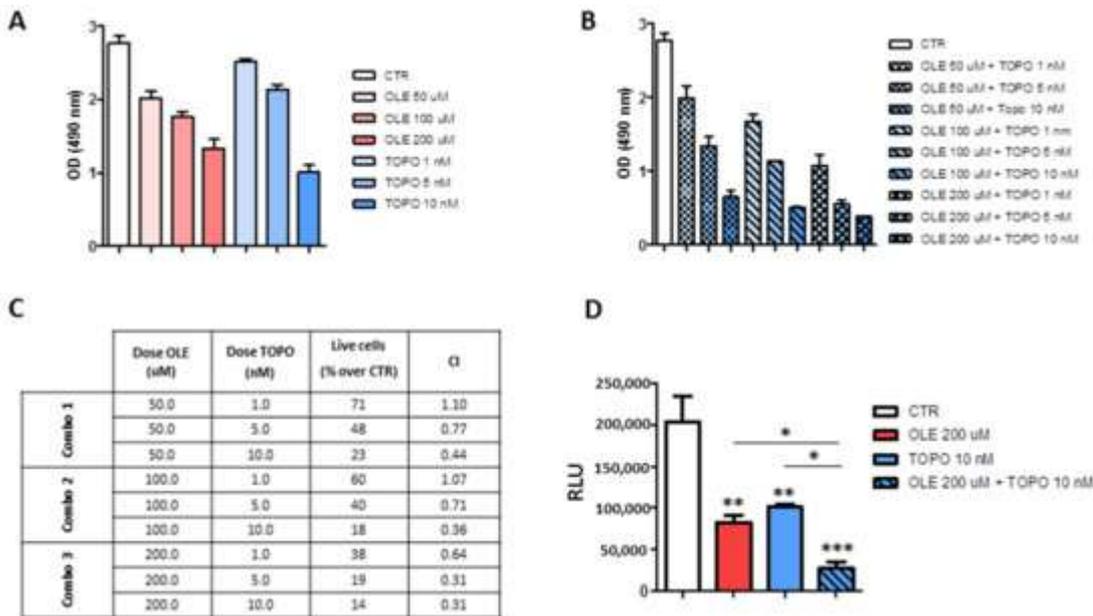


Figura 7. Efectos de la combinación de OLE y topotecán sobre la viabilidad celular de las células IMR-32 y SH-SY5Y. (**A**) Ensayo MTS que muestra los efectos de los fármacos individuales. (**B**) Ensayo MTS que muestra los efectos de la combinación de fármacos. (**C**) Tabla que muestra los valores del índice de combinación (IC) para cada combinación OLE-TOPO. Combo 1 = OLE 50 μ M más TOPO 1, 5 y 10 nM; Combo 2 = OLE 100 μ M más TOPO 1, 5 y 10; Combo 3 = OLE 200 μ M más TOPO 1, 5 y 10. CI < 1 significa sinergismo. IC > 1 significa antagonismo. IC = 1 significa adicción. (**D**) Ensayo de viabilidad que muestra los efectos de OLE y TOPO, como fármacos individuales y en combinación, en esferoides tumorales de la línea celular IMR-32. Los datos se expresan como media \pm SD de tres experimentos independientes (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001). CTR: controlar; OLE: extracto de hoja de olivo; TOPO: topotecán; μ M: micromolar; nM: nanomolar; DO: densidad óptica; RLU: unidad de luminiscencia relativa.

4. Discusión

Hasta donde sabemos, este estudio demuestra por primera vez los efectos antitumorales del extracto de hoja de olivo (OLE) contra las células NB al investigar la viabilidad celular, la proliferación celular, la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la migración in vitro. Hasta la fecha, solo un informe examinó la eficacia antitumoral de la única molécula bioactiva oleuropeína contenida en OLE contra la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y [28], pero no se informa nada sobre el extracto completo.

De hecho, OLE tiene la peculiaridad de estar constituido por una amplia variedad de compuestos fenólicos, cuyos efectos beneficiosos para la salud han sido reportados [29 , 30]. Varios estudios se centraron en los principales constituyentes de OLE (es decir, oleuropeína, hidroxitirosol) como moléculas individuales y demostraron sus propiedades antitumorales en diferentes modelos tumorales [13]. Se demostró que la oleuropeína, el compuesto fenólico más abundante presente en la OLE, es eficaz para inducir la apoptosis mediante la detención del ciclo celular y la activación de una cascada de señalización mitocondrial en las células HeLa [31]. Además, la oleuropeína indujo la apoptosis e inhibió la proliferación celular de la línea celular de hepatoma humano HepG2 [32]. Más recientemente, las propiedades proapoptóticas de la oleuropeína también fueron confirmadas por Antognelli et al., quienes demostraron que la oleuropeína induce la apoptosis en una línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas (A549) a través de la regulación positiva de la glioxalasa 2 mitocondrial [33]. También se informaron efectos antitumorales para el hidroxitirosol (HT), que redujo la proliferación de células de adenocarcinoma de colon humano a través de la inhibición de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) 1/2 y la ciclina D1 [34]. Además, la HT también fue eficaz contra las células de cáncer de próstata a través de la inducción de la apoptosis y la detención del ciclo celular [35]. La luteolina y la apigenina, aunque menos concentradas, también demostraron su potencial como agentes antitumorales [36 , 37].

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido más común de la edad pediátrica. La curación de los pacientes con NB de alto riesgo sigue siendo un reto, y parece interesante la posibilidad de encontrar complementos alimenticios dotados de propiedades antitumorales y que se utilicen como adyuvantes en terapias combinadas. El extracto de hoja de

olivo entero merece mucha atención, ya que debido a la cooperación de diferentes moléculas bioactivas, podría tener propiedades antitumorales incluso más pronunciadas que cualquier compuesto tomado como agente único.

Aquí, la OLE administrada sobre la base de la concentración de oleuropeína condujo a una reducción de la viabilidad celular dependiente del tiempo y la dosis en un panel de líneas celulares NB humanas. La sensibilidad variable de las células NB a OLE refleja la amplia heterogeneidad de los tumores NB [38]. Desde un punto de vista traslacional, el uso de una concentración μM de OLE plantea la cuestión de la posible toxicidad en tejidos normales. En la actualidad, el conocimiento sobre el perfil de seguridad de OLE en humanos aún es limitado, incluso si se informa que generalmente es confiable y no tóxico incluso en dosis altas [39 , 40]. Aquí, se demostró que OLE no es tóxico contra las células de control sanas, según lo evaluado comparando la exposición prolongada y continua a OLE frente al tratamiento a corto plazo. Estos resultados son alentadores, y aunque se necesitan estudios de seguridad y toxicología más profundos para futuras aplicaciones clínicas traslacionales, parece que el uso de OLE como adyuvante podría ser beneficioso pero no tóxico al usar una ventana terapéutica adecuada.

Los sistemas de cultivo monocapa (2D) han sido durante décadas los mejores modelos para la prueba de fármacos; sin embargo, los resultados obtenidos fueron frecuentemente inconsistentes al pasar a los modelos in vivo. Los esferoides tumorales imitan mejor las características arquitectónicas de los tumores sólidos en comparación con los 2D. Se caracterizan por una estructura compleja que recapitula la complejidad de los tumores sólidos en términos de interacción célula a célula, interconexión célula a matriz extracelular, acceso diferencial al oxígeno y a los nutrientes por parte de las capas celulares de la estructura, y el diferencial tasa de crecimiento de las capas [41]. Todas estas características, junto con su potencial para reflejar y predecir mejor la respuesta a la terapia, llevaron a los esferoides tumorales a emerger como un modelo adecuado para la detección de fármacos contra el cáncer [42]. Los experimentos citotóxicos, realizados en esferoides tumorales confiables y reproducibles, demostraron que OLE redujo la viabilidad de las células tumorales de manera dependiente del tiempo y la dosis, lo que confirma y valida los resultados obtenidos en cultivos 2D. Estos resultados traslacionales allanan el camino para futuros experimentos en entornos 3D más complejos y dinámicos y en modelos preclínicos in vivo.

Según un estudio anterior realizado en melanoma [43], nuestro trabajo demuestra que OLE es capaz de inhibir la proliferación de células NB mediante la detención del ciclo celular en la fase G₀/G₁. Por el contrario, se informó que la oleuropeína inhibía la proliferación celular de células de hepatoma humano y células de cáncer de colon a través de una detención del ciclo celular en fase G₂/M [44 , 45]. Este hallazgo subyace a que OLE, debido a la cooperación de diferentes moléculas bioactivas, puede actuar a través de diferentes mecanismos con respecto a las moléculas individuales. Nuestros resultados también demuestran que las células NB expuestas a OLE experimentan una muerte celular apoptótica dependiente de la dosis, que se correlaciona con una mayor expresión de las caspasas ejecutoras 3 y 7, en acuerdo parcial con estudios previos realizados en melanoma [43].

Las investigaciones realizadas para desentrañar las principales vías de señalización activadas en respuesta al tratamiento con OLE indican claramente la activación de la vía apoptótica extrínseca, que se destaca por el aumento de la expresión de la forma escindida de la caspasa 8. Cabe señalar que nuestros datos también demuestran el aumento expresión de fosfo-Bcl-2 a la dosis más alta de OLE. Este resultado abre a varias hipótesis. De hecho, la fosforilación de Bcl-2 puede ser una consecuencia de la producción de ROS en respuesta al tratamiento con OLE, lo que finalmente lleva a activar también la vía apoptótica intrínseca [46]. Por otro lado, la fosforilación de Bcl-2 podría representar un mecanismo implementado por las células para contrarrestar el daño del ADN relacionado con el estrés oxidativo, como se informó anteriormente [47]. De hecho, las ROS totales, pero no las ROS mitocondriales, aumentaron con el tratamiento con OLE (datos no mostrados).

Además, el tratamiento de las células NB con OLE condujo a la activación de la vía NF- κ B, que también está implicada, entre otras cosas, en la señalización de la inflamación [48 , 49]. El aumento de la fosforilación de NF- κ B tras el tratamiento con OLE podría sugerir la activación de una cascada proinflamatoria. Tal especulación necesita más investigaciones in vivo para ser confirmada. Una de las características clave de una molécula bioactiva anticancerígena es también interferir con el proceso de migración de las células cancerosas, que es responsable de la progresión y metástasis del cáncer. En estudios anteriores, se informó que la oleuropeína y el hidroxitirosol pueden inhibir la migración de diferentes tipos de células cancerosas [28 , 50 , 51]. De acuerdo, aquí demostramos que OLE es capaz de inhibir significativamente la migración de células NB, lo que corrobora aún más su eficacia antitumoral.

Nuestro estudio, realizado en un panel de líneas celulares NB humanas, concuerda en su mayoría con los hallazgos previos de Secme et al. [27], quienes demostraron los efectos antitumorales de la oleuropeína frente a la línea celular SH-SY5Y NB. A partir de los resultados obtenidos, no es posible indicar si OLE fue ventajoso en términos de efectos antitumorales en comparación con el agente único oleuropeína. Sin embargo, podemos subrayar que OLE demostró ser eficaz también en un horario de administración corto. Además, el extracto acuoso presenta varias ventajas frente a la oleuropeína para futuras aplicaciones clínicas. De hecho, desde un punto de vista clínico, el extracto acuoso podría administrarse fácilmente por vía oral, lo cual es una característica particularmente importante para un "fármaco" adyuvante que se utilizará en oncología pediátrica. Por el contrario, la solubilidad de la oleuropeína podría requerir el desarrollo de formulaciones farmacológicas específicas para que sea fácilmente administrable [47].].

El objetivo final de este estudio fue investigar la cooperación potencial de OLE y el topotecán quimioterapéutico, que se utiliza en la práctica clínica para tratar pacientes afectados por NB en recaída o refractarios. La posibilidad de combinar quimioterapéuticos con fitoquímicos, que podrían aumentar su índice terapéutico y tener un perfil tóxico seguro, suena interesante y prometedora, especialmente para pacientes con NB recidivante/refractario. La capacidad de OLE para aumentar la respuesta de las células tumorales a los tratamientos estándar ya se ha demostrado en glioblastoma [17] y melanoma [43]. Aquí mostramos que la combinación de OLE y topotecan llevó a fomentar los efectos antitumorales en un ensayo de monocapa, con valores de índice de combinación que van desde la sinergia hasta la adición. Estos resultados fueron confirmados y respaldados por experimentos de prueba de concepto realizados contra esferoides tumorales NB, donde la combinación de OLE y TOPO redujo significativamente la viabilidad celular de los esferoides tumorales en comparación con cada fármaco utilizado solo.

5. Conclusiones

En conclusión, los resultados in vitro que se muestran aquí se abren a investigaciones preclínicas más profundas antes de considerar la posibilidad de trasladar la administración de OLE al entorno clínico y probablemente mejorar, en combinación con los tratamientos estándar, el resultado clínico de los pacientes con NB de alto riesgo. .

Materiales complementarios

Los siguientes están disponibles en línea en <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu13072178/s1>, Figura S1: Efectos de la exposición a largo plazo al tratamiento con OLE sobre la viabilidad celular del control sano; Figura S2: Efectos de la exposición de tratamiento corto a OLE en la viabilidad celular de células NB y controles sanos; Figura S3: regulación positiva de los niveles de expresión de la proteína p-53 y ciclina-D1 después del tratamiento con OLE; Figura S4: inducción de apoptosis y regulación positiva de la expresión de caspasas 3 y 7 después del tratamiento con OLE. Figura S5: Rescate de la muerte celular apoptótica inducida por OLE mediante pretratamiento con el inhibidor de pan caspasas Q-VD-OPh. Figura S6: Regulación positiva de caspasa 8 escindida y fosfo-Bcl-2 después del tratamiento con OLE. Figura S7: Aumento de la producción de ROS totales después del tratamiento con OLE. Figura S8: Regulación positiva de fosfo-NF-kB después del tratamiento con OLE. Figura S9: inhibición de la migración de las líneas celulares IMR-32 y SH-SY5Y después del tratamiento con OLE.

Contribuciones de autor

Conceptualización: FM, FP, MP, CB; Metodología: VB y EC; Investigación: VB, FM y CB; Redacción—Preparación del borrador original: CB; Redacción—Revisión y edición: FM, FP, MP, MVC y PP Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Fondos

El estudio fue apoyado por subvenciones de la Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC): Investigator Grant n. 18474 a MP y n. 24397 a FP y Ministero della Salute, Ricerca Corrente 2021 a Istituto Giannina Gaslini.

Declaración de la Junta de Revisión Institucional

No aplica.

Declaración de consentimiento informado

No aplica.

Declaración de disponibilidad de datos

No aplica.

Expresiones de gratitud

VB y EC son beneficiarios de una beca ONLUS de la Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma y la Associazione Oncologia Pediatrica E Neuroblastoma (OPEN). Agradecemos a Torrasi C. por facilitarnos el Extracto de Hoja de Olivo (OLIVUM, EvergreenLife). Agradecemos a BioRender.com (<https://biorender.com/> ; fecha de acceso: marzo-junio de 2021) que se utilizó para crear el resumen gráfico.

Conflictos de interés

Los Autores declaran no tener conflicto de intereses.

Referencias

1. Brodeur, GM Neuroblastoma: conocimientos biológicos sobre un enigma clínico. *Nat. Rev. Cáncer* **2003** , 3 , 203–216. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
2. Maris, JM Avances Recientes en Neuroblastoma. *Nuevo ingl. J.Med.* **2010** , 362 , 2202–2211. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[Versión verde](#)]
3. Matthay, KK; Maris, JM; Schleiermacher, G.; Nakagawara, A.; Mackall, CL; Diller, L.; Weiss, W. Neuroblastoma. *Nat. Dis. rev. Remilgado.* **2016** , 2 , 16078. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Atanasov, AG; Waltenberger, B.; Pferschy-Wenzig, E.-M.; Linder, T.; Wawrosch, C.; Uhrin, P.; Temml, V.; Wang, L.; Schwaiger, S.; Heiss, EH; et al. Descubrimiento y reabastecimiento de productos naturales derivados de plantas farmacológicamente activos: una revisión. *Biotechnología. Adv.* **2015** , 33 , 1582–1614. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[Versión verde](#)]
5. Yuan, H.; Ma, Q.; Vosotros, L.; Piao, G. La Medicina Tradicional y la Medicina Moderna a partir de Productos Naturales. *Moléculas* **2016** , 21 , 559. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Versión verde](#)]
6. Mishra, BB; Tiwari, VK Productos naturales: un papel en evolución en el descubrimiento de fármacos futuros. *EUR. J.Med. química* **2011** , 46 , 4769–4807. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Cragg, GM; Pezzuto, JM Los Productos Naturales como Fuente Vital para el Descubrimiento de Agentes Quimioterapéuticos y Quimiopreventivos del Cáncer. *Medicina. Príncipe Practica* **2015** , 25 , 41–59. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
8. seca, LMA; Pinto, DCGA Metabolitos secundarios de plantas como agentes anticancerígenos: éxitos en ensayos clínicos y aplicación terapéutica. *En t. J. Mol. ciencia* **2018** , 19 , 263. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Versión verde](#)]
9. Nasri, H.; Baradarán, A.; Shirzad, H.; Rafieian-Kopaei, M. Nuevos conceptos en nutracéuticos como alternativa a los productos farmacéuticos. *En t. J. anterior Medicina.* **2014** , 5 , 1487–1499. [[Google Académico](#)] [[PubMed](#)]
10. jardinero, H.; Caunca, MR Dieta Mediterránea en la Prevención de Enfermedades Neurodegenerativas. *actual Nutrición Rep.* **2018** , 7 , 10–20. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
11. Martínez-González, MA; Gea, A.; Ruiz-Canela, M. Dieta Mediterránea y Salud Cardiovascular. *Circ. Res.* **2019** , 124 , 779–798. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
12. Barak, Y.; Fridman, D. Impacto de la dieta mediterránea en el cáncer: revisión de literatura enfocada. *Genoma del Cáncer. Proteoma.* **2017** , 14 , 403–408. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Versión verde](#)]

13. Jefe, A.; obispo, Kansas; Marlow, G.; Barnett, MPG; Ferguson, LR Evidencia para respaldar el efecto anticancerígeno del extracto de hoja de olivo y direcciones futuras. *Nutrients* **2016** , 8 , 513. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Versión verde](#)]
14. Ruzzolini, J.; Peppicelli, S.; Andreucci, E.; Bianchini, F.; Scardigli, A.; Romani, A.; La Marca, G.; Nediani, C.; Calorini, L. Oleuropeína, el polifenol principal del extracto de hoja de *Olea europaea*, tiene un efecto anticancerígeno en las células de melanoma BRAF humano y potencia la citotoxicidad de las quimioterapias actuales. *Nutrients* **2018** , 10 , 1950. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[Versión verde](#)]
15. Orfebre, CD; Bonos, RD; Jankowski, H.; Weidenhofer, J.; Stathopoulos, CE; cucaracha, PD; Scarlett, CJ Los biofenoles de oliva, la oleuropeína y el hidroxitirosol, reducen selectivamente la proliferación, influyen en el ciclo celular e inducen la apoptosis en las células de cáncer de páncreas. *En t. J. Mol. ciencia* **2018** , 19 , 1937. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[Versión verde](#)]
16. Samet, I.; Han, J.; Jlaiel, L.; Sayadi, S.; Isoda, H. El extracto de hoja de oliva (*Olea europaea*) induce la apoptosis y la diferenciación de monocitos/macrófagos en células de leucemia mielógena crónica humana K562: información sobre el mecanismo subyacente. *Oxidativo Med. Célula. Longev.* **2014** , 2014 , 1–16. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[Versión verde](#)]
17. Tezcan, G.; Tunca, B.; Bekar, A.; Budak, F.; Sahin, S.; Cecener, G.; Egeli, U.; Taskapiloglu, MO; Kocaeli, H.; Tolunay, S.; et al. El extracto de hoja de *Olea europaea* mejora la respuesta al tratamiento de las células madre de GBM al modular la expresión de miARN. *Soy. J. Cáncer Res.* **2014** , 4 , 572–590. [[Google académico](#)]
18. Manada, F.; Basta, NO; McNally, RJ; Tweddle, DA Una revisión sistemática de la quimioterapia de reinducción para niños con neuroblastoma de alto riesgo recidivante. *EUR. J. Cáncer* **2019** , 111 , 50–58. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Versión verde](#)]
19. Ponzoni, M.; Curnis, F.; Brignole, C.; Bruno, S.; Guarnieri, D.; Sitia, L.; Marotta, R.; Sacchi, A.; Bauckneht, M.; Buschiazzo, A.; et al. Mejora de la orientación tumoral mediante quimioterapia: nanopartículas cargadas. *Pequeño* **2018** , 14 , e1802886. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
20. Pastorino, F.; Di Paolo, D.; Piccardi, F.; Nico, B.; Ribatti, D.; Daga, A.; Baio, G.; Neumaier, CE; Brignole, C.; Loi, M.; et al. Eficacia antitumoral mejorada de la doxorubicina liposomal dirigida a la vasculatura de grado clínico. *clin. Cáncer Res.* **2008** , 14 , 7320–7329. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Versión verde](#)]
21. Cossu, I.; Botton, G.; Loi, M.; emionita, L.; Bartolini, A.; Di Paolo, D.; Brignole, C.; Piaggio, F.; Perri, P.; Sacchi, A.; et al. Los nanoportadores dirigidos al neuroblastoma mejoran la administración y penetración de fármacos, retrasan el crecimiento tumoral y anulan la difusión metastásica. *Biomateriales* **2015** , 68 , 89–99. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
22. Di Paolo, D.; Pastorino, F.; Brignole, C.; Corrás, MV; emionita, L.; Cilli, M.; Tamma, R.; Priddy, L.; Amaro, A.; Ferrari, D.; et al. La reposición combinada de miR-34a y let-7b mediante nanopartículas dirigidas inhibe el crecimiento tumoral en modelos preclínicos de neuroblastoma. *Pequeño* **2020** , 16 . [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
23. Seo, MD; Kang, T.-J.; Lee, C.-H.; Lee, A.-Y.; Noh, M. Los queratinocitos HaCaT y los queratinocitos epidérmicos primarios tienen diferentes perfiles transcripcionales de genes asociados a la envoltura cornificada para las citocinas de células T auxiliares. *Biomol. El r.* **2012** , 20 , 171–176. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Versión verde](#)]
24. Garlanda, C.; Parravicini, C.; Sironi, M.; De Rossi, M.; de Calmanovici, RW; Carozzi, F.; Bussolino, F.; Colotta, F.; Mantovani, A.; Vecchi, A. Crecimiento progresivo en ratones inmunodeficientes y reclutamiento de células huésped por células endoteliales de ratón transformadas por antígeno T de polioma de tamaño medio: Implicaciones para la patogénesis de tumores vasculares oportunistas. *proc. nacional Academia ciencia EE . UU.* **1994** , 91 , 7291–7295. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Versión verde](#)]

25. Daniel, RA; Rozanska, AL; Tomás, HD; Mulligan, EA; Drew, Y.; Castelbuono, DJ; Hostomsky, Z.; Plummer, Urgencias; Cuerpo, A.; Tweddle, DA; et al. La inhibición de la poli(ADP-ribosa) polimerasa-1 mejora la actividad de la temozolomida y el topotecán contra el neuroblastoma infantil. *clin. Cáncer Res.* **2009** , *15* , 1241–1249. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Versión verde](#)]
26. Wu, D.; Yotnda, P. Producción y detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) en cánceres. *J. Vis. Exp.* **2011** , e3357. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
27. Chou, T.-C. Bases teóricas, diseño experimental y simulación computarizada de sinergismo y antagonismo en estudios de combinación de fármacos. *Farmacol. Rev.* **2006** , *58* , 621–681. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
28. Seçme, M.; Eroğlu, C.; Dodurga, Y.; Bağcı, G. Investigación del mecanismo anticancerígeno de la oleuropeína a través del ciclo celular y las vías apoptóticas en células de neuroblastoma SH-SY5Y. *Gene* **2016** , *585* , 93–99. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
29. Trípoli, E.; Giammanco, M.; Tabacchi, G.; Di Majo, D.; Giammanco, S.; La Guardia, M. Los compuestos fenólicos del aceite de oliva: Estructura, actividad biológica y efectos beneficiosos sobre la salud humana. *Nutrición Res. Rev.* **2005** , *18* , 98–112. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
30. Bulotta, S.; Celano, M.; Lepore, SM; Montalcini, T.; Pujía, A.; Russo, D. Efectos beneficiosos de los componentes fenólicos del aceite de oliva oleuropeína e hidroxitirosol: enfoque en la protección contra enfermedades cardiovasculares y metabólicas. *J. traducción Medicina.* **2014** , *12* , 219. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Versión verde](#)]
31. Yao, J.; Wu, J.; Yang, X.; Yang, J.; Zhang, Y.; Du, L. Apoptosis inducida por oleuropeína en células HeLa a través de una cascada apoptótica mitocondrial asociada con la activación de la quinasa c-Jun NH2-Terminal. *J. Pharmacol. ciencia* **2014** , *125* , 300–311. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[Versión verde](#)]
32. Yan, C.-M.; Chai, E.-Q.; Cai, H.-Y.; Miao, G.-Y.; Ma, W. La oleuropeína induce la apoptosis mediante la activación de caspasas y la supresión de la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa/proteína quinasa B en la línea celular de hepatoma humano HepG2. *mol. Medicina. Rep.* **2015** , *11* , 4617–4624. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Versión verde](#)]
33. Antognelli, C.; Frosini, R.; Santolla, MF; Peirce, MJ; Talesa, VN La apoptosis inducida por oleuropeína está mediada por la glioxalasa 2 mitocondrial en células NSCLC A549: un mecanismo interno y un posible papel no enzimático novedoso para una enzima antigua. *Oxidativo Med. Célula. Longev.* **2019** , *2019* , 1–10. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Versión verde](#)]
34. Corona, G.; Deiana, M.; Incani, A.; Vauzour, D.; Dessi, MA; Spencer, JPE El hidroxitirosol inhibe la proliferación de células de adenocarcinoma de colon humano a través de la inhibición de ERK1/2 y ciclina D1. *mol. Nutrición Alimentos Res.* **2009** , *53* , 897–903. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
35. Zubair, H.; Bhardwaj, A.; Ahmed, A.; Srivastava, SK; Kan, MA; Patel, GK; Singh, S.; Singh, AP El hidroxitirosol induce la apoptosis y la detención del ciclo celular y suprime múltiples vías de señalización oncogénicas en células de cáncer de próstata. *Nutrición Cáncer* **2017** , *69* , 932–942. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
36. Yan, X.; Qi, M.; Li, P.; Zhan, Y.; Shao, H. Apigenina en la terapia del cáncer: Efectos anticancerígenos y mecanismos de acción. *Biociencia celular.* **2017** , *7* , 1–16. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Versión verde](#)]
37. Imran, M.; Rauf, A.; Abu-Izneid, T.; Nadeem, M.; Shariati, MA; Khan, IA; Imran, A.; Orhan, IE; Rizwan, M.; Atif, M.; et al. Corrección de "Luteolina, un flavonoide, como agente anticancerígeno: una revisión" [Biomed. Farmacéutico. 112 (2019) 108612]. *biomedicina Farmacéutico.* **2019** , *116* , 109084. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
38. Brodeur, GM; Nakagawara, A. Base molecular de la heterogeneidad clínica en neuroblastoma. *J. Pediatría. hematol.* **1992** , *14* , 111–116. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]

39. Guex, CG; Reginato, FZ; Figueredo, KC; da Silva, A.; Pires, FB; Jesús, RDS; Lhamas, CL; Lopes, GH; Bauermann, LDF Evaluación de seguridad del extracto etanólico de hojas de *Olea europaea* L. después de la administración aguda y subaguda a ratas Wistar. *Reg. Toxicol. Farmacol.* **2018** , *95* , 395–399. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
40. Clewell, AE; Beres, E.; Vertesi, A.; Glávits, R.; Hirka, G.; Endres, JR; Murbach, TS; Szakonyiné, IP Evaluación exhaustiva de la seguridad toxicológica de un extracto de hojas de *Olea Europaea* L. (Bonolive™). *En t. J. Toxicol.* **2016** , *35* , 208–221. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Versión verde](#)]
41. Costa, CE; Moreira, AF; De Melo-Diogo, D.; Gaspar, VM; Carvalho, MP; Correia, IJ Esferoides tumorales 3D: Una visión general de las herramientas y técnicas utilizadas para su análisis. *Biotechnología. Adv.* **2016** , *34* , 1427–1441. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Breslin, S.; O'Driscoll, L. La relevancia del uso de cultivos celulares 3D, además de cultivos monocapa 2D, al evaluar la sensibilidad y la resistencia a los fármacos contra el cáncer de mama. *Oncotarget* **2016** , *7* , 45745–45756. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Versión verde](#)]
43. Mijatovic, SA; Timotijevic, GS; Miljković, Đ.; Radovic, JM; Maksimović-Ivanić, D.; Dekanski, D.; Stosic-Grujicic, S. Potencial antimelanoma múltiple del extracto seco de hoja de olivo. *En t. J. Cancer* **2010** , *128* , 1955–1965. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
44. Cheng, J.-S.; Chou, CT-T.; Liu, Y.-Y.; Sun, WC-C.; Shieh, P.; Kuo, D.-H.; Kuo, C.-C.; Jan, C.-R.; Liang, W.-Z. El efecto de la oleuropeína del extracto de hoja de olivo (*Olea europaea*) sobre la homeostasis del Ca²⁺, la citotoxicidad, la distribución del ciclo celular y la señalización de ROS en células de hepatoma humano HepG2. *Química alimentaria Toxicol.* **2016** , *91* , 151–166. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
45. Fernández-Arroyo, S.; Gómez-Martínez, A.; Rocamora-Reverte, L.; Quirantes-Piné, R.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Ferragut, J. Aplicación de nanoLC-ESI-TOF-MS para el análisis metabolómico de compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen extra en células de cáncer de colon tratadas. *J. Pharm. biomedicina Anal.* **2012** , *63* , 128–134. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
46. Redza-Dutordoir, M.; Averill-Bates, DA Activación de vías de señalización de apoptosis por especies reactivas de oxígeno. *bioquímica Biografía. Acta BBA Bioenergía.* **2016** , *1863* , 2977–2992. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
47. Chong, SJF; Iskandar, K.; Lai, JXH; Qu, J.; Raman, D.; Valentín, R.; Herbaux, C.; Collins, M.; Bajo, CCI; Loh, T.; et al. Serine-70 fosforilado Bcl-2 previene el daño del ADN inducido por el estrés oxidativo mediante la modulación del metabolismo redox mitocondrial. *Ácidos Nucleicos Res.* **2020** , *48* , 12727–12745. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
48. Lawrence, T. La vía del factor nuclear NF- κ B en la inflamación. *Harb de primavera fría. Perspectiva. Biol.* **2009** , *1* , a001651. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Versión verde](#)]
49. Taniguchi, K.; Karin, M. NF- κ B, inflamación, inmunidad y cáncer: mayoría de edad. *Nat. Rev. Immunol.* **2018** , *18* , 309–324. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Choupani, J.; Alivand, MR; Derakhshan, SM; Zaeifzadeh, M.; Khaniani, MS La oleuropeína inhibe la capacidad de migración a través de la supresión de la transición epitelial-mesenquimatosa y mejora sinérgicamente la apoptosis mediada por doxorubicina en las células MCF-7. *J. celular. Fisiol.* **2019** , *234* , 9093–9104. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
51. Lu, H.-Y.; Zhu, J.-S.; Zhang, Z.; Shen, W.-J.; Jiang, S.; Long, Y.-F.; Wu, B.; Ding, T.; Huan, F.; Wang, S.-L. El hidroxitirosol y la oleuropeína inhiben la migración y la invasión de células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 a través de la inducción de la autofagia. *Agentes contra el cáncer Med. química* **2020** , *19* , 1983–1990. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Nota del editor: MDPI se mantiene neutral con respecto a reclamos jurisdiccionales en mapas publicados y afiliaciones institucionales.

© 2021 por los autores. Licenciario MDPI, Basilea, Suiza. Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).